

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Roguljić

**Imunohistokemijska analiza izraženosti
antigena skupine rak-testis u neinvazivnim
duktalnim karcinomima dojke**

DISERTACIJA



Zagreb, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Ana Roguljić

**Imunohistokemijska analiza izraženosti
antigena skupine rak-testis u neinvazivnim
duktalnim karcinomima dojke**

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Zavodu za onkološku patologiju Klinike za tumore, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Božena Šarčević, dr. med.

prof. dr. sc. Antonio Juretić, dr. med.

Zahvaljujem prije svega svojim mentorima, prof. dr. sc. Boženi Šarčević na pravim savjetima, pozitivnoj energiji i svesrdnoj pomoći pri izradi ove disertacije, te prof. dr. sc. Antoniju Juretiću, koji me u najtežim trenucima hrabrio i bodrio te bio uz mene. Posebno zahvaljujem dr. sc. Miroslavu Banoviću, koji je imao dovoljno strpljenja za mene i moje ideje i bez kojeg ovaj rad ne bi bio to što je kao i doc.dr.sc. Slavici Sović. Zahvaljujem i svojoj obitelji na velikoj potpori i strpljivosti te svima onima koje zbog nekih razloga nisam imala mogućnosti spomenuti u zahvali.

POPIS OZNAKA I KRATICA

ACS: Američko društvo za rak (eng. *American Cancer Society*)

APC: stanice koje prezentiraju antigen (engl. *antigen presenting cells*, predočne stanice)

C/T TAA: karcinom/testis pridruženi antigeni (engl. *Cancer/Testis Tumor Associated Antigens*)

DCIS: duktalni neinvazivni karcinom dojke

FNA: aspiracija stanica (engl. *fine needle aspiration*)

GEP: analiza ekspresije gena (engl. *gene expression profiling*)

Gy: - Grej

HER2: receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

HLA - ljudski leukocitni antigeni (engl. *human leukocytes antigens*)

LCIS: lobularni neinvazivni karcinom dojke

MAGE: melanomu pridruženi antigen (engl. *melanoma associated antigen*)

MHC: glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

MRI: magnetska rezonancija

NCCN: engl. *National Comprehensive Cancer Network*

NK: stanice urođeni ubojice (eng. *natural killer*)

NY-ESO-1: engl. *New York esophageal-1 cancer antigen*

PCR: lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PBS: puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate-buffered saline*)

RT-PCR: reverzna transkriptaza PCR (engl. *reverse transcriptase PCR*)

SEREX: serološka analiza izraženosti rekombinantne tumorske cDNA s autognim serumom (engl. *serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries with autologous serum*)

SNLB: biopsija limfnog čvora čuvara (eng. *sentinel lymph node biopsy*)

TIL: tumor-infiltrirajući limfociti (engl. *tumor-infiltrating lymphocytes*)

TREG: regulacijski T limfociti (engl. *regulatory T cells*)

VNPI: Van Nuysov prognostički indeks (engl. *Van Nuys prognostic index*)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. DUKTALNI NEINVAZIVNI KARCINOM DOJKE.....	1
1.1.1. Definicija.....	1
1.1.2. Epidemiologija.....	1
1.1.3. Etiološki čimbenici.....	2
1.1.4. Dijagnoza	3
1.1.4.1. Fizički pregled.....	3
1.1.4.2. Mamografija.....	3
1.1.4.3. MRI (magnetska rezonancija).....	4
1.1.4.4. UZV (ultrazvuk).....	4
1.1.4.5. Biopsija.....	4
1.1.5. Patohistološke karakteristike neinvazivnog duktalnog karcinoma dojke.....	5
1.1.5.1. Makroskopski izgled.....	5
1.1.5.2. Mikroskopski izgled.....	5
1.1.5.3. Posebni/rijetki tipovi DCIS-a.....	9
1.1.5.4. Diferencijalna dijagnoza.....	10
1.1.5.5. Pagetova bolest dojke (bradavice).....	11
1.1.5.6. Molekularni tipovi duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke.....	11
1.1.6. Prognoza i prognostički čimbenici.....	12
1.1.7. DCIS kao prekursor invazivnog karcinoma dojke.....	15
1.1.8. Liječenje.....	17

1.1.8.1. Kirurgija.....	18
1.1.8.2. Radioterapija.....	19
1.1.8.3. Sistemna terapija.....	20
1.2. IMUNOLOGIJA TUMORA.....	21
1.2.1. Teorije imunološkog nadzora.....	21
1.2.2. Imunološki odgovor organizma na tumorske stanice.....	23
1.2.3. Tumorski mikrookoliš.....	25
1.2.4. Tumorski antigeni.....	26
1.2.5. Rak-testis antigeni.....	27
1.2.5.1. Antigeni MAGE.....	29
1.2.5.2. Antigeni NY-ESO.....	30
2. HIPOTEZA.....	31
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	32
3.1 OPĆI CILJEVI.....	32
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI.....	32
4. MATERIJALI I METODE.....	33
4.1. Bolesnici.....	33

4.2. Metode.....	33
4.2.1. Patohistološki postupak.....	33
4.2.2. Imunohistokemijski postupak	34
4.2.3. Imunohistokemijski protokol	35
4.2.4. Analiza imunohistokemijskog bojenja.....	36
4.2.5. Statistička obrada podataka.....	37
5. REZULTATI.....	38
5.1. Statistička analiza podataka.....	39
6. RASPRAVA.....	58
7. ZAKLJUČCI.....	63
8. SAŽETAK.....	65
9. SUMMARY.....	68
10. LITERATURA.....	69
11. KRATKA BIOGRAFIJA.....	86

1. Uvod

1.1. Duktalni neinvazivni karcinom dojke

1.1.1. Definicija

Duktalni neinvazivni karcinom dojke (DCIS) nastaje u mliječnim vodovima dojke neoplastičnom proliferacijom epitelnih stanica. On ne probija bazalnu membranu i ne invadira okolnu vezivnu stromu, a nalazi se unutar mliječnih vodova okružen slojem nekontinuiranih mioepitelnih stanica te intaktnom bazalnom membranom (1). Duktalni neinvazivni karcinom je neobvezni prekursor invazivnog karcinoma dojke te u 40% i više slučajeva prelazi u invazivni karcinom dojke ako se ne liječi.

1.1.2. Epidemiologija

Posljednjih tridesetak godina incidencija neinvazivnog karcinoma dojke je u porastu. Taj porast je u najvećoj mjeri povezan s upotrebom probirne mamografije kao i s prelaskom s film-mamografije na digitalnu mamografiju (2-4).

Prema podacima Američkog društva za rak (ACS, engl. *American Cancer Society*), u SAD-u se godišnje dijagnosticira približno 60 290 novih slučajeva neinvazivnog karcinoma dojke, od kojih većinu čini duktalni neinvazivni karcinom dojke (5). Po učestalosti je taj karcinom manje čest od invazivnog, ali kao i kod invazivnog učestalost raste s dobi, a najveća incidencija je zabilježena kod žena u dobi od 70 - 79 godina (5).

U Sjedinjenim Američkim Državama u razdoblju od 2007. do 2011. incidencija neinvazivnog dukalnog karcinoma dojke, bez obzira na dob, bila je 25,8 % na 10 000 stanovnika, a najviša je bila u dobnoj skupini od 70 do 79 godina te je iznosila 843 na 100 000 stanovnika (5).

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2013. godini je u Hrvatskoj od karcinoma dojke oboljelo 2557 žena, a umrlo njih 994; incidencija iznosi 115,3/100 000 stanovnika (6). U Hrvatskoj karcinom dojke je najčešći rak u žena. Nažalost, ne postoji sustavna baza podataka o incidenciji dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke u Hrvatskoj, no prema kliničkim praćenjima i zapažanjima, ona prati svjetske podatke o incidenciji.

1.1.3. Etiološki čimbenici

Etiološki čimbenici koji povećavaju rizik za nastanak duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke isti su kao i za nastanak invazivnog karcinoma dojke (7).

Etiološki čimbenici su :

1. Opterećena obiteljska anamneza
2. Pretilost
3. Nuliparitet
4. Kasna dob kod prvog porođaja
5. Kasna dob kod nastupa menopauze (poslije pedesete godine)
6. Gust žljezdani parenhim (visoki denzitet) dojki na mamografskim snimkama
U retrospektivnoj analizi koja je obuhvatila 6 studija u koje je ukupno uključeno 100 00 žena nađena je veza između visokog denziteta dojki i rizika za nastanak DCIS-a. Rizik je bio najveći kod žena koje su bile mlađe od 55 godina (8).
7. Dugogodišnje uzimanje nadomjesne hormonske terapije u menopauzi
Jedna od najvećih retrospektivnih studija koja je razmatrala odnos između dugogodišnjeg uzimanja nadomjesne hormonske terapije i nastanka neinvazivnog duktalnog karcinoma dojke dovela je do zaključka da je uzimanje kombinirane terapije (estrogen + progestin) povezano s povećanim rizikom za nastanak DCIS-a (9).
8. Prisutnost BRCA 1 i BRCA 2 mutacije. Duktalni neinvazivni karcinom dojke dio je i nasljednog sindroma (dojka/jajnik nasljedni sindrom - HBOC) povezan s BRCA 1 i BRCA 2 mutacijama (10).

1.1.4. Dijagnoza dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke

Konačnu dijagnozu dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke predstavlja patohistološka dijagnoza koja se postavlja na temelju histološke analize bioptičkog uzorka. Put do dijagnoze je složen i uključuje fizikalni pregled, slikovnu, citološku i patohistološku dijagnostiku.

1.1.4.1. Fizikalni pregled

Fizikalni pregled uključuje inspekciju i palpaciju dojki. Dukalni neinvazivni karcinom dojke može se prezentirati kao palpabilna masa u dojci, no u današnje vrijeme dukalni neinvazivni karcinom dojke se sve rjeđe otkriva isključivo fizikalnim pregledom zbog uvođenja programa probirne mamografije.

1.1.4.2. Mamografija

Porast u incidenciji dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke može se zahvaliti uvođenju probirne mamografije i prelasku s film-mamografije na digitalnu mamografiju. Uvođenje probirne mamografije omogućilo je otkrivanje dukalnog neinvazivnog karcinoma u asimptomatskom stadiju te je razdoblje u kojem se neinvazivni karcinom otkrivao jedino kad je bio palpabilan i simptomatski - iscjedak na bradavici, postalo prošlost (11-12).

Dukalni neinvazivni karcinom dojke na mamografskim snimkama najčešće se prezentira u obliku kalcifikata. Najčešći tip kalcifikata su tzv. "casting" kalcifikati (lijevak ili razbacani) koji se nalaze u čak 50-75% slučajeva (13). Taj tip kalcifikata najčešće je povezan s duktalnim neinvazivnim karcinomom dojke visokog gradusa. Osim "casting" kalcifikata, za DCIS su karakteristični i linearni kalcifikati, koji su karakteristični za komedo tip karcinoma, te zrnati kalcifikati, karakteristični za non komedo tip karcinoma. Povremeno se dukalni neinvazivni karcinom može manifestirati kao obična masa ili asimetrija bez prisutnosti kalcifikata (8%) (14).

1.1.4.3. MRI (magnetska rezonancija)

Klinička uloga magnetske rezonancije u dijagnostici duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke nije tako važna kao kod invazivnog karcinoma dojke. Unatoč tome što je u brojnim studijama i analizama dokazana veća osjetljivost MRI-ja (79.3%) u odnosu na standardni postupak - mamografiju (69%), ta pretraga još nije uvrštena u smjernice NCCN-a (15). Prema NCCN-u, osjetljivost MRI-ja za DCIS visokog gradusa je i veća od 98% (16), no smatra se da još ne postoje dovoljno pouzdani dokazi koji upućuju na to da MRI pridonosi povećanju postotka negativnog kirurškog ruba ili smanjenju broja mastektomija. Naprotiv, vrlo često dovodi do brojnih dijagnostičkih postupaka i analiza koje odgađaju kirurški zahvat, a u obzir treba uzeti i cijenu pretrage (17).

1.1.4.4. Ultrazvuk (UZV)

Ultrazvuk ima važno mjesto u dijagnostici DCIS-a. On se koristi kod core-biopsija mamografski otkrivenih promjena te je stoga nezaobilazan dio dijagnostičkog postupka. Osim toga, uz kvalitetan ultrazvuk i vještog radiologa može se koristiti za identifikaciju samog procesa unutar duktalnih kanalića kao i sitnih mikrokalcifikata (18).

1.1.4.5. Biopsija

Biopsija suspektne promjene jedan je od ključnih postupaka u dijagnostičkom algoritmu. Postoji nekoliko vrsta biopsije, a u dijagnostici karcinoma dojke najčešće se koristi biopsija iglom. U biopsije iglom u širem smislu pripadaju FNA (engl. *fine needle aspiration*), stereotaktička biopsija i već spomenuta “core” biopsija. Osnovna razlika između te tri metode je u načinu izvođenja postupka i vrsti igle koja se koristi. Aspiracija stanica, tj. FNA, izvodi se tako da se tankom iglom ulazi kroz kožu te se na mamografski ili sonografski suspektom mjestu aspiriraju stanice koje se potom šalju na citološku analizu. Osnovna razlika između stereotaktičke i “core” biopsije je u tome što se stereotaktička izvodi uz pomoć mamograma, a “core” biopsija najčešće uz pomoć ultrazvuka. U jednoj i drugoj metodi koristi se široka igla

kojom se uzme komadić tkiva na suspektom mjestu te se pošalje na patohistološku analizu. Najčešće se uzima 4-6 uzoraka. Danas je “core biopsija” zlatni standard u dijagnozi karcinoma dojke općenito.

1.1.5. Patohistološke karakteristike duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke

1.1.5.1. Makroskopski izgled

Makroskopski duktalni neinvazivni karcinom dojke najčešće nije prepoznatljiv golim okom, tj. ne stvara jasno vidljive karakteristične lezije. Iznimka je DCIS visokog gradusa s komedo nekrozom i neki slučajevi solidnog papilarnog DCIS-a.

1.1.5.2. Mikroskopski izgled

Duktalni neinvazivni karcinom dojke mikroskopski je vrlo heterogena bolest. Prema najnovijim smjericama, duktalni neinvazivni karcinom dojke patohistološki se dijeli prema stupnju diferenciranosti u tri podskupine: dobro, srednje i slabo diferenciran tip, uzimajući u obzir morfološke karakteristike i izgled jezgre. S obzirom na obrazac proliferacije koji je prisutan, postoje i histološke podvrste duktalnog neinvazivnog karcinoma: kribriformni, komedo, solidni, mikropapilarni i papilarni - mješoviti tip. Ta vrsta podjele danas ima više povijesnu ulogu.

Prema stupnju diferenciranosti, duktalni neinvazivni karcinom dojke može se podijeliti na:

1. *dobro diferencirani*: tumorska gnijezda čine nakupine malih pravilnih stanica s okruglim jezgrama veličine oko 1.5-2 eritrocita (19). Stanice su jasno odvojene i pokazuju polarizaciju, a nukleoli nisu prominentni.
2. *umjereno diferencirani*: tumorske stanice se ne mogu svrstati u dobro diferencirane kao ni u slabo diferencirane. Jezgre pokazuju umjeren pleomorfizam, ali manji nego kod slabo diferenciranih tumorskih stanica. Obrazac proliferacije je najčešće solidni ili kribriformni te postoji umjereni stupanj polarizacije (20).

3. *slabo diferencirani*: stanice su velike i pleomorfne, vrlo često s multiplim prominentnim nukleolima. Jezgre su u promjeru veće od 2,5 eritrocita (19). Obrazac proliferacije je najčešće solidan uz prisutnost komedo nekroze s ili bez mikrokalcifikata. Stanice najčešće ne pokazuju polarizaciju.

Prisutnost nekroze u duktalnom neinvazivnom karcinomu dojke povezana je s lošijom prognozom. Najčešće su prisutna dva tipa nekroze:

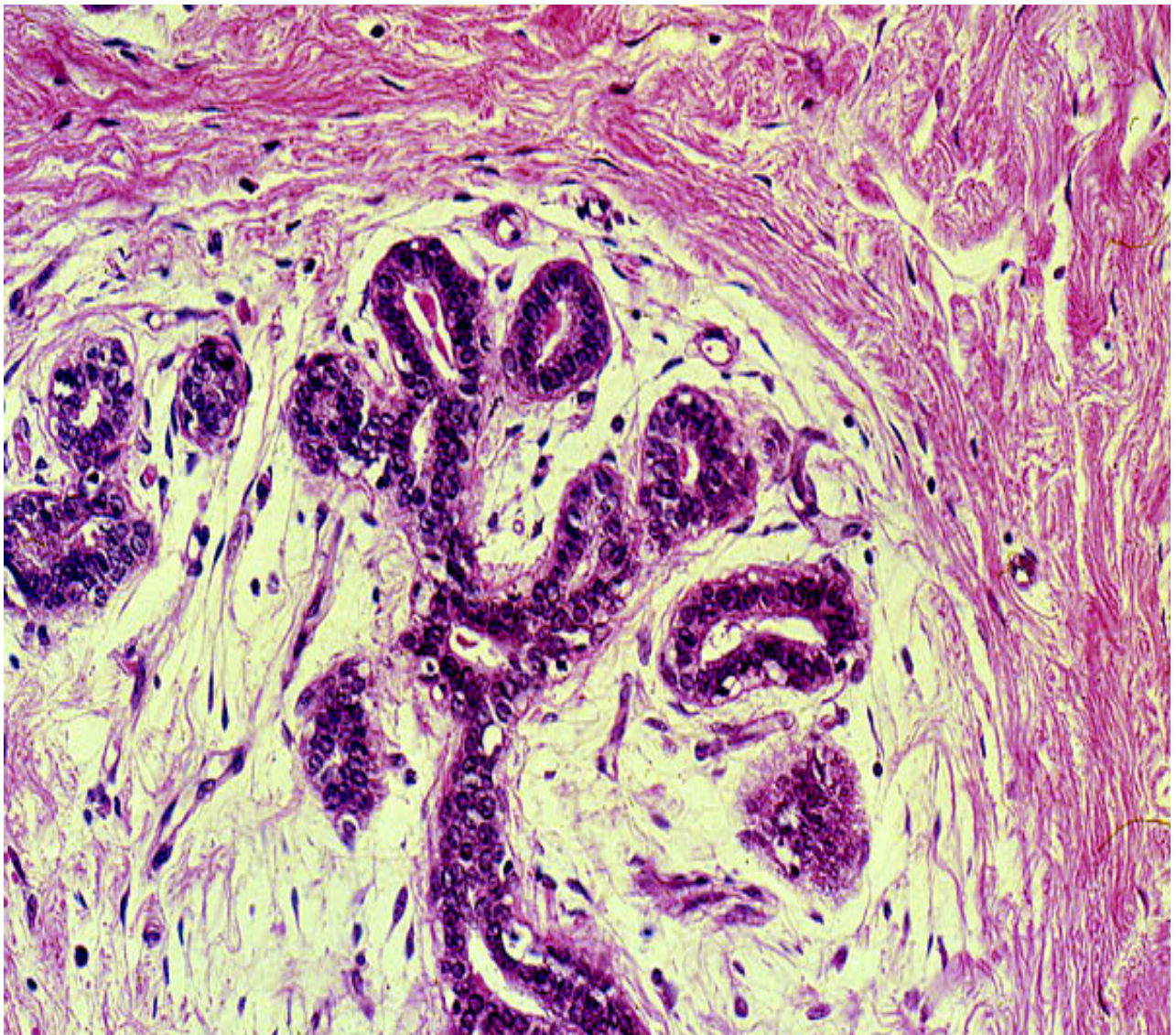
1. *komedo nekroza* - vidljiva je centralna nekroza koja je okružena slojem stanica (stanice "duhovi") i staničnim debrisom (21). Barem jedan mliječni vod mora u potpunosti biti ispunjen nekrotičnim stanicama koje su okružene normalnim stanicama da bi se postavila dijagnoza komedo nekroze. Taj tip nekroze smatra se nepovoljnim prognostičkim čimbenikom.
2. *nekomedo nekroza* - prisutne su samostalne nekrotične (apoptične) stanice koje su nasumično razbacane.

Histološki podtipovi dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke s obzirom na obrazac proliferacije su:

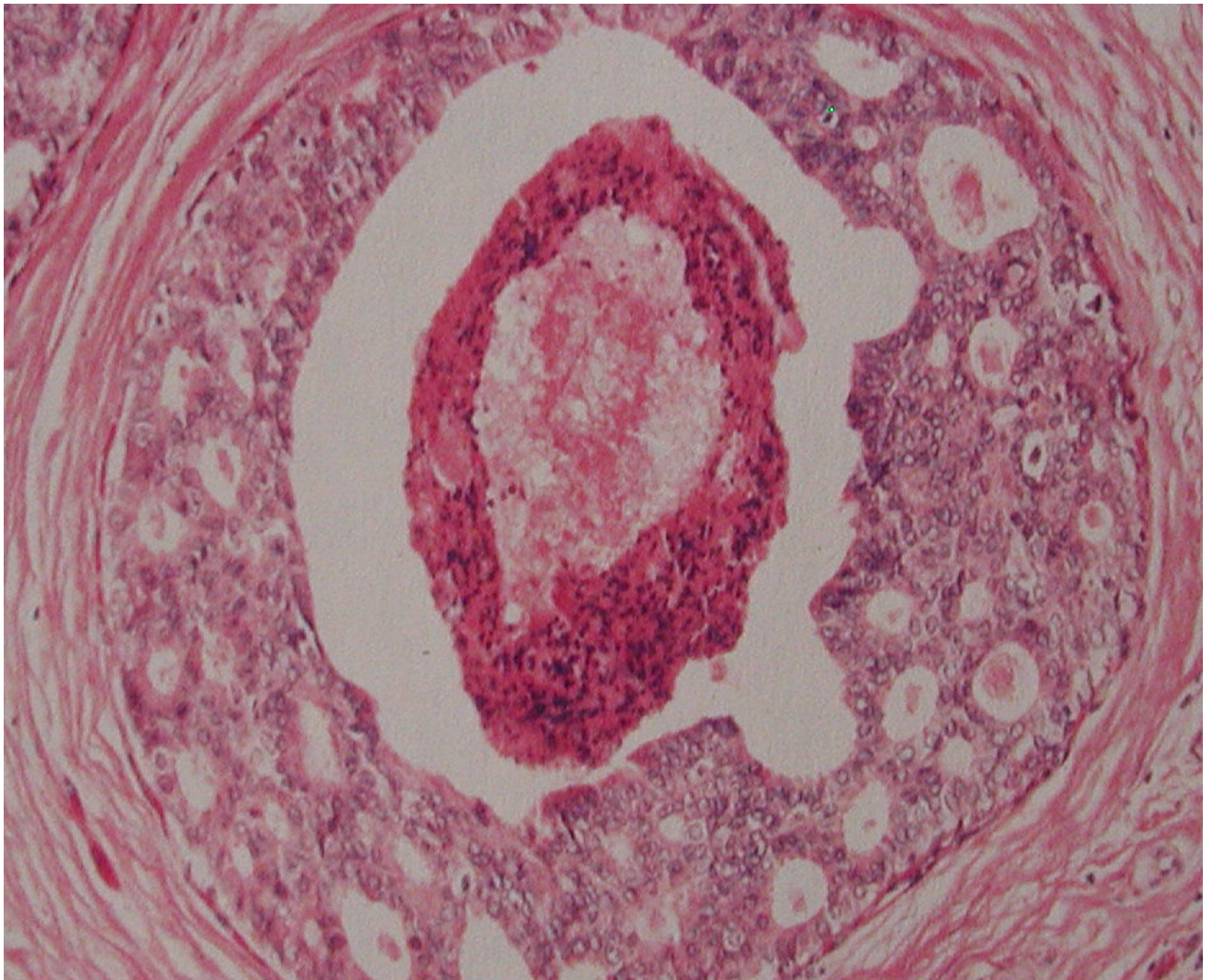
1. *kribriformni* - među tumorskim stanicama unutar duktusa postoji procijep pa stanice izgledaju kao da su u valovima. Taj histološki podtip karakterističan je za DCIS niskog i srednjeg gradusa
2. *komedo* - tumorske stanice u potpunosti ispunjavaju duktuse te je karakteristična prisutnost komedo nekroze. Taj tip proliferacije karakterističan je za DCIS visokog gradusa (Slika 1.)
3. *solidni* - stanice se slično grupiraju kao u komedo podtipu, no komedo nekroza nije prisutna
4. *papilarni* - stanice se grupiraju u oblik sličan paprati

5. mikropapilarni - stanice su grupirane tako da duktusi izgledaju dilatirano, a dobiva se dojam da stanice imaju oblik lukova (Slika 2.)

Papilarni i mikropapilarni podtip karakteristični su za srednji i visoki gradus. Za mikropapilarni podtip DCIS-a smatra se da je najmaligniji. Za histološke podtipove karakteristično je da se ne moraju javljati pojedinačno, već da u tumoru mogu postojati različiti obrasci proliferacije, tj. različiti histološki podtipovi odnosno više njihovih oblika.



Slika 1. DCIS (histološki podtip: mikropapilarni gr I, HE 40x). S ljubaznošću iz privatne arhive prof.dr.sc.Božene Šarčević,dr. med.



Slika 2. DCIS (histološki podtip: komedo gr III, HE 40x). S ljubaznošću iz privatne arhive prof.dr.sc.Božene Šarčević,dr. med.

1.1.5.3. Posebni/rijetki podtipovi DCIS-a

Osim već navedenih, postoje i rijetki podtipovi dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke koji mikroskopski izgledaju drukčije od spomenutih, tzv. standardnih tipova DCIS-a. No ti podtipovi ne pokazuju razliku u kliničkoj manifestaciji i tijeku bolesti u odnosu na histološki najučestalije tipove DCIS-a pa ne postoji razlika u liječenju.

1. Apokrini DCIS (ADCIS): za taj tip DCIS-a karakteristične su velike apokrine stanice, koje imaju obilnu eozinofilnu citoplazmu s velikom jezgrom te povećanim prominentnim nukleolima.
2. “Clear cell” DCIS: karakteriziran je stanicama koje imaju izrazito svijetlu citoplazmu.
3. Neuroendokrini DCIS: tumorske stanice izgledom podsjećaju na karcinoid. Najčešće se prepoznaje nakon imunohistokemijskog bojenja na neuroendokrine markere: kromogranin, PGP 9.5 i sinaptofizin (22). Taj tip DCIS-a najčešće se javlja u starijih žena te se prezentira kao krvavi iscjedak iz bradavice.
4. DCIS-stanice poput prstena pečatnjaka : to je vrlo rijedak podtip DCIS-a. Karakteriziraju ga stanice koje imaju oblik prstena pečatnjaka, a obrazac proliferacije je najčešće solidni ili papilarni (23).
5. Cistični i mukozni DCIS: te dvije rijetke vrste DCIS-a su varijante mikropapilarnog tipa DCIS-a. Stanice izlučuju mucinozni sekret koji dovodi do distenzije stanice.

Patohistološki izvještaj ključan je element u donošenju odluke o liječenju dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke. On mora sadržavati informacije o gradusu jezgre, prisutnosti i tipu nekroze, obrascu proliferacije, informacije o polarizaciji stanice, veličini lezije, lokalizaciji kalcifikacija, statusu ER receptora te statusu kirurških rubova (24).

1.1.5.4. Diferencijalna dijagnoza

Kod postavljanja patohistološke dijagnoze dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke u obzir treba uzeti i neke druge patohistološke dijagnoze koje mikroskopski imaju sličan izgled. To su:

1. Atipična duktalna hiperplazija

Atipična duktalna hiperplazija (ADH) je lezija koja ima neke slične karakteristike kao i DCIS niskog histološkog gradusa (25-26), no zbog karakterističnih obilježja atipične duktalne hiperplazije dijagnoza nije toliko zahtjevna.

2. Lobularni neinvazivni karcinom dojke (LCIS)

Ponekad je teško razlikovati LCIS od solidnog DCIS-a niskog histološkog gradusa te treba posegnuti za imunohistokemijom (E-kadherin) zato što je DCIS E-kadherin pozitivan, a LCIS nije.

Nakon provedenog imunohistokemijskog bojenja vrlo lako se može razlučiti o kojoj je leziji riječ.

3. Pleomorfni LCIS i DCIS visokog histološkog gradusa

Razlikovanje ta dva tipa in situ karcinoma je zahtjevnije zbog vrlo velike sličnosti stanica. Imunohistokemija je metoda izbora za razlikovanje ta dva tipa in situ karcinoma.

4. Mikroinvazivni karcinom

Mikroinvazivni karcinom definira se kao dominantni ekstenzivni DCIS kod kojeg je na jasno odvojenom fokusu, ili više njih, vidljiva invazija u podležecu vezivnu stromu do 1 mm (27). Ta pojava je vrlo rijetka i zapravo se veže za DCIS visokog histološkog gradusa, dok je kod DCIS-a niskog histološkog gradusa vrlo rijetka (28).

1.1.5.5. Pagetova bolest dojke (bradavice)

Pagetovu bolest dojke otkrio je u 19. stoljeću britanski liječnik Sir James Paget, koji je prvi utvrdio povezanost između promjena u bradavici i karcinoma dojke pa je bolest po njemu i dobila ime. To je rijedak oblik karcinoma dojke koji zahvaća bradavicu i kožu oko bradavice (areolu). Bolest karakteriziraju okrugle, velike stanice, tzv. Pagetove stanice, koje se mogu naći u epidermisu bradavice i/ili areole. Ono što je karakteristično za Pagetovu bolest je da je najčešće praćena duktalnim neinvazivnim karcinomom ili invazivnim karcinomom dojke (29). Ako je u podlozi duktalni neinvazivni karcinom, najčešće se radi o HER2 pozitivnom DCIS-u visokog gradusa.

1.1.5.6. Molekularni tipovi duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke

Razvojem oligonukleotidnih mikročipova (engl. microarray) omogućen je postupak analize izraženosti gena (GEP) koji je korišten za analizu prognoze bolesnica oboljelih od karcinoma dojke, a cilj je bio identificirati bolesnice s dobrom prognozom kod kojih se ne bi trebala provoditi adjuvantna kemoterapija (30-31). Prva takva studija koju su vodili Sørlie i suradnici (32-33), identificirala je ukupno 5 intrinzičnih (molekularnih) podtipova karcinoma dojke s različitim kliničkim ishodom koristeći 456 cDNA klonove. Ta podjela ima podlogu u činjenici da razlike u izraženosti gena između subtipova dojke utječu na fundamentalne razlike između karcinoma na molekularnoj razini (34).

Molekularni (intrinzični) tipovi karcinoma dojke su:

1. bazalni tip/triple negativan (ER -, PgR -, HER2 -)
2. luminal A (ER +, Her2 -)
3. luminal B (ER +, Her 2 + ili Her2 -)
4. Her2 - obogaćeni tip (ER -, PR - i Her2 +)
5. normal-like

Ti molekularni tipovi karakteristični su za invazivni karcinom dojke, ali se svi oni mogu naći i kod neinvazivnog dukalnog karcinoma dojke, no s različitom učestalošću (25). Molekularni tipovi su u korelaciji s gradusom DCIS-a. Duktalni neinvazivni karcinom niskog gradusa povezan je s luminalnim fenotipom i pozitivnim hormonskim receptorima, a tumori višeg gradusa povezani su s negativnim hormonskim receptorima, bazalnim fenotipom i pozitivnim HER2 statusom.

1.1.6. Prognoza i prognostički čimbenici

Prognoza dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke odlična je ako se liječi. U slučaju da se ne liječi, 40% i više prelazi u invazivni karcinom dojke.

Prognostički čimbenici dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke su:

1. dob kod dijagnoze DCIS-a
2. histološki gradus tumora
3. prisutnost komedo nekroze
4. veličina tumora
5. pozitivni kirurški rub
6. status steroidnih receptora (ER i PR)
7. Her-2 izraženost
8. Novi biološki prognostički čimbenici

Dob

Mlađe bolesnice imaju lošiju prognozu od onih starijih. Kod njih se u većem postotku javljaju lokalni recidivi, a razlog tomu je što su kod mlađih bolesnica najčešće posrijedi tumori koji imaju lošije patohistološke i molekularne karakteristike.

Histološki gradus

Prema histološkom gradusu, duktalni neinvazivni karcinom se dijeli na dobro, srednje i slabo diferencirani tip. Tumori višeg gradusa imaju lošiju prognozu te su često povezani s nekim drugim lošijim prognostičkim čimbenicima.

Komedo nekroza

Prisutnost komedo nekroze u duktalnom neinvazivnom karcinomu povezana je s lošijom prognozom. Komedo nekroza se češće javlja kod mlađih pacijentica koje imaju viši histološki gradus tumora (35).

Veličina tumora

Veličina tumora povezana je s brojem recidiva u bolesnica kojima je dijagnosticiran duktalni neinvazivni karcinom dojke. Katkad je teško odrediti veličinu lezije jer se duktalni neinvazivni karcinom dojke širi kroz duktalni sustav dojke trodimenzionalno (5). Veličina tumora i status kirurških rubova dva su nezavisna prognostička čimbenika recidiva (36).

Kirurški rub

Kirurški rub jedan je od važnijih prognostičkih čimbenika neinvazivnog duktalnog karcinoma dojke. Pozitivni rub povezan je s većim brojem recidiva te je veličina ruba obvezno navedena u patohistološkom nalazu. Rub od 10 mm dugo se vremena smatrao negativnim, no vrlo često je ishod kirurškog liječenja zbog takvog ruba bio lošiji kozmetički učinak. Prema novom konsenzusu, koji je postignut u kolovozu 2016. godine, rub od 2 mm smatra se dovoljnim kod žena koje se liječe segmentektomijom i radioterapijom. Tu smjernicu zasad su prihvatile tri velike organizacije: ASCO, ASTRO i SSO (37).

Status steroidnih receptora (ER i PR)

Steroidni receptori su prvi temeljito istraženi biološki markeri kod karcinoma dojke, a danas se zna da odgovor na hormonsku terapiju ovisi o statusu estrogenskih receptora (38). Brojna istraživanja su pokazala da je izraženost estrogenskih (ER) i progesteronskih (PR) receptora u obrnutoj korelaciji s histološkim gradusom dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke (39-44). Negativni steroidni receptori povezani su s lošijom prognozom i većim brojem lokalnih recidiva, što je potvrđeno brojnim studijama (38).

HER-2 izraženost

Iako je status HER-2 prognostički čimbenik invazivnog karcinoma dojke, kod DCIS-a važnost tog biomarkera nije do kraja razjašnjen pa status HER-2 nije uvršten u prognostičke čimbenike dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke (45). Danas su u tijeku istraživanja koja ispituju ulogu statusa receptora HER-2 kod neinvazivnog karcinoma dojke, no prema NCCN-u, njegovo rutinsko određivanje nije potrebno jer ne utječe na tijek liječenja.

Novi biološki prognostički čimbenici

Osim navedenih prognostičkih čimbenika postoje još neki čija je važnost još predmet istraživanja. Među najistraživanijim čimbenicima u dukalnom neinvazivnom karcinomu dojke su proliferacijski marker Ki 67, markeri stanične regulacije i apoptotički markeri (ciklin D1, ciklin A, p16, p21 p53, Bcl2 i c-myc) te COX 2. Za mnoge od njih, unatoč pojedinačnim istraživanjima koja su pokazala povezanost s lokalnim recidivom, nije utvrđeno da su nezavisni prediktori lokalnog povrata bolesti u DCIS-u. Čimbenici za koje je dokazano da su nezavisni prognostički čimbenici povrata bolesti su p21 i p53. P21 je protein, ciklin-ovisan inhibitor kinaze (CKI) koji ima važnu ulogu u staničnoj regulaciji (38). Provenzano i sur. (46) su dokazali da su pacijenti s lokalnim povratom bolesti češće imali pozitivan p21 (54% nasuprot 15% s negativnim p21). P53 je tumor-supresorski gen, koji je odgovoran za apoptozu stanice, a neka su istraživanja pokazala da je njegova izraženost povećana kod komedo tipa DCIS-a te da je povezana s visokim histološkim gradusom (47-49). U jednoj multivarijantnoj analizi promatrana

je kombinacija nekoliko bioloških čimbenika (p16, Ki67 i COX-2) te je dokazano da je fenotip p16(+)COX-2(-)Ki67(+) snažan prediktor lokalnog povrata bolesti kod dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke (50).

1.1.7. DCIS kao prekursor invazivnog karcinoma dojke

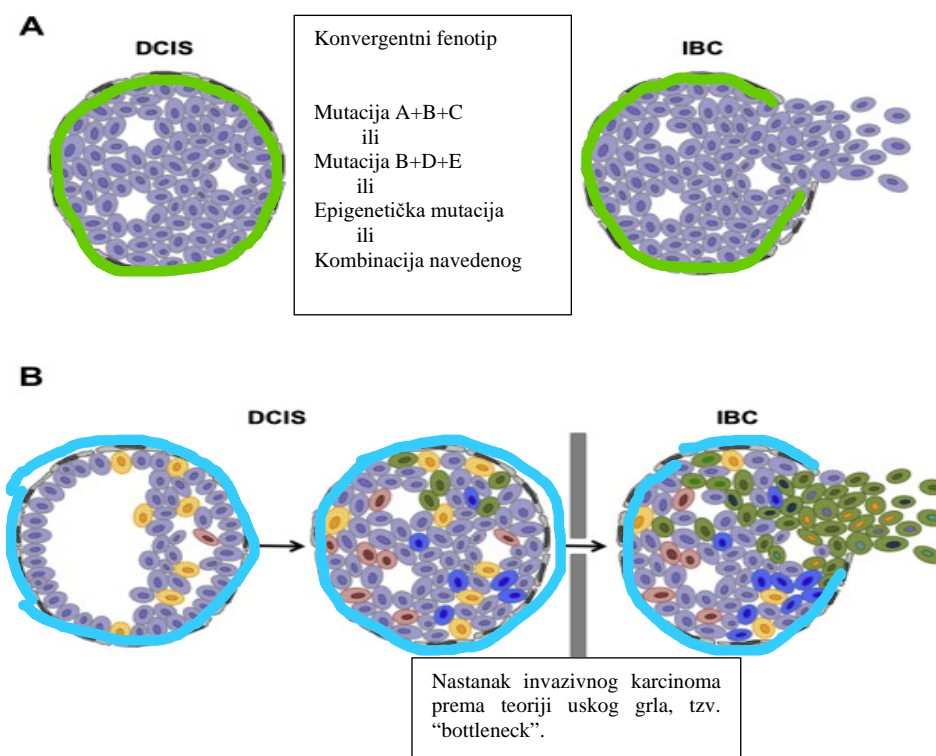
Duktalni neinvazivni karcinom dojke je neobvezni prekursor invazivnog karcinoma dojke. Ako se neinvazivni duktalni karcinom ne otkrije ili ne liječi, u čak 40% slučajeva prelazi u invazivni karcinom dojke. Osnovna histološka razlika između neinvazivnog dukalnog karcinoma dojke i invazivnog je sloj intaktnih mioepitelnih stanica te intaktna bazalna membrana, koji su karakteristični za neinvazivni duktalni karcinom. No markeri koji bi definirali “rizične tipove” dukalnog neinvazivnog karcinoma koji imaju veću mogućnost da postanu invazivni duktalni karcinom dojke još nisu otkriveni.

Sam proces, tj. što se točno dogodi i kako neinvazivni duktalni karcinom dojke prelazi u invazivni karcinom dojke, već je dugo predmet mnogih istraživanja. Dugo vremena je bilo općeprihvaćeno mišljenje da su mioepitelne stanice čuvari, tzv. *gatekeeper*, koji imaju supresivni efekt na neinvazivni duktalni karcinom dojke, a gubitak tog efekta dovodi do progresije u invazivni karcinom (51-55). Razvojem molekularne biologije i napretkom u istraživanjima razvile su se brojne teorije koje su pokušale objasniti taj proces, no možemo ih svesti na dvije: gensku i epigenetičku (okolišnu).

Prema okolišnoj teoriji, mikrookoliš (fibroblasti, mioepitelne stanice i leukociti) ili tumorska stroma aktivno sudjeluju u procesu progresije dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke u invazivni (18). Zagovornici genske teorije, s druge strane, smatraju da u tumorskoj stanici dolazi do aberacija gena zbog kojih duktalni neinvazivni karcinom prelazi u invazivni. Brojne studije su pokušale identificirati gene koji sudjeluju u tom procesu progresije te zapravo omogućiti personalizirano liječenje pacijenata kojima je dijagnosticiran duktalni neinvazivni karcinom dojke. Međutim, istraživanja nisu donijela željeni rezultat jer na transkripcijskom nivou nisu nađeni geni koji bi bili specifično vezani za rizične skupine DCIS-a (56-57).

Dvije teorije koje na specifičiji način pokušavaju objasniti proces progresije, a danas su općeprihvaćene, su teorija konvergentnog fenotipa i *bottleneck* teorija, tj. teorija uskog grla

(Slika 3). Obje u obzir uzimaju genske, somatske i/ili epigenetičke promjene koje na kraju dovode do nastanka invazivnog karcinoma dojke (55).



Slika 3. Hipotetski modeli progresije DCIS-a u invazivni karcinom dojke. Modificirano s obzirom na referencu (55).

Prema konvergentnoj teoriji, brojne somatske, genske i /ili epigenetičke mutacije dovode do promjene fenotipa, tj. stjecanja bioloških svojstava koja su potrebna za progresiju od neinvazivnog u invazivni karcinom dojke. Naravno, te promjene se razlikuju od pacijenta do pacijenta, ali na kraju vode do istog rezultata, tj. progresije DCIS-a u invazivni karcinom dojke (58).

Druga široko prihvaćena teorija je teorija uskog grla, tzv. *bottleneck*. Prema toj teoriji, kad nastane duktalni neinvazivni karcinom dojke, brojne somatske mutacije generiraju se u stanicama. Razvijaju se različiti subklonovi, a samo oni subklonovi koji sadržavaju specifičan set mutacija, prolaze kroz “usko grlo” i dovode do nastanka invazivnog karcinoma dojke (55).

1.1.8. Liječenje

Duktalni neinvazivni karcinom dojke liječi se kirurški, radioterapijom i hormonskom terapijom. Liječenje dukalnog neinvazivnog karcinoma vrlo često je izazov za kliničara i nije uvijek jednostavno odlučiti kako liječiti pacijenta, tj. koju vrstu liječenja odabrati. U želji da se odabere optimalni način liječenja te smanji broj pretretiranih i subtretiranih žena razvijen je Van Nuysov prognostički indeks. Prva verzija tog indeksa razvijena je 1996. godine i uzimala je u obzir tri čimbenika: veličinu tumora, veličinu ruba (udaljenost između tumora i ruba materijala) te patohistološku klasifikaciju (histološki gradus i prisutnost, tj. odsutnost komedo nekroze). Radna grupa Sveučilišta Južne Kalifornije ažurirala je Van Nuysov prognostički indeks 2003. godine te je uvrstila dob među prognostičke čimbenike (59).

Svaki čimbenik se boduje od jedan do tri te se na kraju gleda konačan zbroj. Bolesnice s niskim zbrojem, od 4 do 6, su kandidati samo za poštedno kirurško liječenje. Ako je zbroj od 7 do 9, bolesnice su kandidati za kirurško liječenje i radioterapiju, a kod bolesnica s visokim zbrojem, od 10 do 12 trebalo bi razmisliti o mastektomiji (Tablica 1).

Tablica 1. VNPI prognostički indeks (2003.). Modificirano s obzirom na referencu (60).

Bodovi	1	2	3
Veličina	15 mm	16-40	>40
Rub	10 mm	1-9	<1
Gradus	1/2 bez nekroze	1/2 s nekrozom	gradus 3
Dob	>60	40-60	<40

Zbroj 4, 5, 6 ili 7 s rubom ≥ 3 mm: samo ekscizija

Zbroj 7 s rubom < 3 mm, 8 s rubom ≥ 3 mm i 9 s ≥ 5 mm: ekscizija plus radioterapija

Zbroj 9 s rubom < 5 mm, 10, 11, 12: mastektomija

Međutim, unatoč tome što neki centri koriste Van Nuysov prognostički indeks (Velika Britanija) pri donošenju odluke o liječenju, taj indeks nije temeljen na dokazima te su potrebne daljnje studije na većem broju bolesnica koje bi utvrdile njegovu važnost i ulogu u donošenju odluke o liječenju (61).

1.1.8.1. Kirurgija

Duktalni neinvazivni karcinom dojke kirurški se može liječiti radikalnim pristupom koji podrazumijeva mastektomiju, tj. kompletno uklanjanje žljezdanog tkiva, ili konzervativnim pristupom, kada se provodi segmentektomija ili kvadrantektomija, tj. uklanjanje samo onog dijela dojke gdje se nalazi tumor. Odabir vrste zahvata ovisi o veličini tumora, patohistološkim karakteristikama, dobi pacijenta, a i o samoj želji pacijenta (59, 62). Biopsija limfnog čvora čuvara (SNLB) standardni je postupak kod invazivnog karcinoma dojke, no kod duktalnog neinvazivnog karcinoma ne radi se rutinski, već kod bolesnica kojima je na core biopsiji dokazan duktalni neinvazivni karcinom visokog gradusa ili kod kojih je predviđena mastektomija.

1.1.8.2. Radioterapija

Primjena radioterapije kod pacijenata koji su liječeni konzervativnim kirurškim pristupom danas je zlatni standard u liječenju dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke. Nakon radikalnog kirurškog zahvata provođenje radioterapije nije potrebno, osim u slučaju pozitivnog kirurškog ruba. Prva studija koja je dokazala učinkovitost radioterapije kod pacijenata s duktalnim neinvazivnim karcinomom dojke bila je studija NSABP B-17. Studija je pokazala da provođenje radioterapije nakon 15 godina praćenja smanjuje broj lokalnih recidiva u ipsilateralnoj dojci za čak 52% (HR, 0.48; 95% CI, 0.33-0.69, $P < 0.001$) (63). Nije utvrđen utjecaj radioterapije na ukupno preživljenje (OS) kao ni na smanjenje ukupnog mortaliteta.

U želji da se spriječi pretretiranost bolesnica s duktalnim neinvazivnim karcinomom dojke pokušala se identificirati podskupina bolesnica kod kojih radioterapija nakon poštednog kirurškog zahvata ne bi bila potrebna. Tu podskupinu bolesnica najbolje je definirala studija RTOG 9804 (mala veličina tumora: $< 2,5$ cm, kirurški rub od minimalno 3 mm, nizak ili srednji histološki gradus) (64). No provedene studije su dokazale da i kod bolesnica s duktalnim neinvazivnim karcinomom dojke povoljnih karakteristika primjena radioterapije smanjuje postotak recidiva u ipsilateralnoj dojci (64). Smatra se da je takav ishod studija zapravo povezan s činjenicom da se hormonska terapija kroz 5 godina ne ordinira svim bolesnicama s pozitivnim hormonskim receptorima, a koje imaju tumor povoljnih karakteristika jer su smjernice za liječenje hormonskom terapijom različite u različitim zemljama. Prema preporukama NCCN-a, odluka o tome da se radioterapija ne provodi ovisi o liječniku i o željama bolesnice (65).

Danas se kod pacijenata s duktalnim neinvazivnim karcinomom dojke primjenjuje 3D konformalna radioterapija. Najčešće se provodi standardno frakcioniranje, tj. 50Gy/25 frakcija uz standardnu dnevnu dozu od 2 Gy. U pojedinim slučajevima (mali tumor, nizak histološki gradus, pozitivni hormonski receptori) moguće je provoditi i hipofrakcioniranje.

Aplikacija dodatne doze na ležište tumora, tzv. *boost* dugo je vremena bila kontroverzna. Još uvijek su u tijeku dvije studije, TROG 07.01 studija i francuska Bonbis studija čiji je cilj istražiti ulogu dodatne doze na ležište tumora kod dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke. No 2016. godine na ASCU je objavljena retrospektivna studija koju su provodili M. S. Moran i sur. (66),

a koja je pokazala da dodavanje *boosta* kod bolesnica s duktalnim neinvazivnim karcinomom dojke ima istu ulogu kao i kod invazivnog karcinoma dojke.

1.1.8.3. Sistemna terapija

Bolesnice kojima je dijagnosticiran duktalni neinvazivni karcinom dojke u 50-75% slučajeva imaju pozitivne estrogenske i/ili progesteronske receptore (40, 67, 68). Prve studije koje su dokazale učinkovitost hormonske terapije kod bolesnica s duktalnim neinvazivnim karcinomom dojke bile su NSABP-17 i NSABP B-24. Rezultati studija su pokazali da upotreba hormonske terapije smanjuje rizik od pojave neinvazivnih i invazivnih lokalnih recidiva u ipsilateralnoj kao i u kontralateralnoj dojci, no razlika u ukupnom preživljenju nije zamijećena (38, 63, 69).

Prema današnjim smjernicama, u liječenju premenopauzalnih žena kao endokrina terapija koristi se tamoksifen, a kod postmenopauzalnih anastrozol, tj. inhibitori aromataze kroz pet godina. Učinkovitost anastrozola u liječenju bolesnica s duktalnim neinvazivnim karcinomom dojke dokazana je u studijama IBIS-II i NRG Oncology/NSABP-35 III. Te studije su pokazale da anastrozol nije inferioran tamoksifenu u liječenju postmenopauzalnih bolesnica pa je on postao zlatni standard u liječenju tih bolesnica (70). Kod bolesnica koje nemaju pozitivne hormonske receptore endokrina terapija se ne primjenjuje.

Uloga trastuzumaba u liječenju HER2 pozitivnih bolesnica s duktalnim neinvazivnim karcinomom dojke nije do kraja jasna pa se on rutinski i ne koristi (71-74). Duktalni neinvazivni karcinom koji je HER 2 pozitivan najčešće je praćen visokim histološkim gradusom, negativnim steroidnim receptorima te komedo nekrozom, tj. lošijim prognostičkim čimbenicima. Cilj studije NSABP-43, čiji su preliminarni rezultati objavljeni 2013. godine, a konačni se očekuju, jest razjasniti ulogu trastuzumaba u liječenju dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke. Cilj joj je dokazati da upotreba trastuzumaba smanjuje pojavu lokalnih recidiva kod HER2 pozitivnih bolesnica, a studija uspoređuje dvije skupine bolesnica; jednu koja se nakon konzervativnog kirurškog zahvata liječi samo radioterapijom i drugu kojoj se uz radioterapiju konkomitantno aplicira trastuzumab (75). U slučaju da ta studija zaista dokaže

učinkovitost trastuzumaba kod bolesnica s duktalnim neinvazivnim karcinomom dojke, to bi bio veliki napredak u liječenju bolesnica s tom dijagnozom.

1.2. Imunologija tumora

1.2.1. Teorije imunološkog nadzora

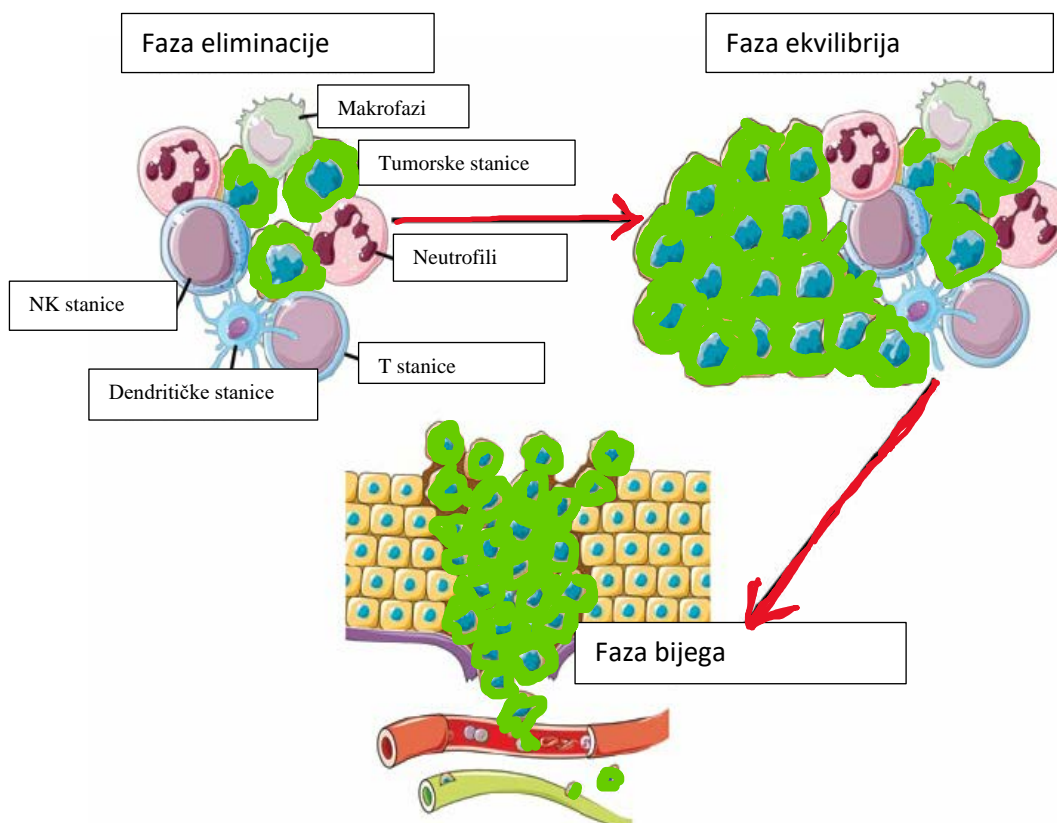
Imunosni sustav čine urođena i stečena imunost. Urođenu imunost predstavljaju fizičke barijere (kožni epitel i mukozne membrane), efektorne stanice (makrofazi, NK stanice, neutrofili, dendritičke stanice, eozinofili, mastociti, limfoidne stanice), mehanizmi prepoznavanja molekularnih uzoraka (*Toll-like receptori*) te humoralni mehanizmi (komplement, citokini i ostali proteini plazme). Stečena imunost je specifična, ona je usmjerena protiv točno određenog specifičnog antigena s kojim organizam dolazi u kontakt, a predstavljaju je limfociti B i T. Imunost povezana s limfocitima B zove se još i humoralna imunost te je posredovana antitijelima koja proizvode limfociti B, a imunost posredovana limfocitima T zove se i stanična.

Polovinom prošlog stoljeća znanstvenici Lewis Thomas i MacFarlan Burnet kreirali su teoriju tumorskog imunonadzora (engl. *Cancer immunosurveillance*) prema kojoj limfociti štite imunokompetentnog domaćina od tumora (76-77). Imunosni sustav mehanizmom imunonadzora eliminira većinu novonastalih tumora, a samo se oni tumori koji nemaju tumorske antigene zbog imunoselekcije razvijaju i rastu jer ih kao takve imunosni sustav ne prepoznaje (77). Međutim, unatoč početnom oduševljenju, ta teorija je ubrzo napuštena zbog nedostatka dokaza koji bi je potkrijepili.

Tehnološkim napretkom, razvojem genetički modificiranih miševa i monoklonskih antitijela došlo se do zaključka da je imunonadzor zapravo samo jedna dimenzija kompleksnog odnosa između imunosnog sustava i tumora (Dunn i sur., 2002., 2004.; Schreiber i sur., 2004.) (78). Istraživanja su dovela do razvoja teorije imunološkog uređivanja (engl. *Immunoediting*). Prema toj teoriji, tumor prolazi proces koji ima tri faze: eliminacija, ravnoteža i bijeg. Faza eliminacije bi zapravo odgovarala imunonadzoru. U toj fazi organizam urođenom i stečenom imunošću nastoji eliminirati tumorske stanice iz organizma. Većina tumora u toj fazi bude eliminirana, no neki tumori ostaju i ulaze u fazu ravnoteže, tj. ekvilibrija. U toj fazi organizam i dalje nastoji uništiti tumorske stanice no one koje su razvile rezistenciju i koje ne izazivaju jak imunološki

odgovor domaćina ostaju i nastavljaju se umnožavati. Tumorske stanice su karakteristične po tome što konstantno mijenjaju svoj fenotip, prilagođuju se i upravo zbog toga ne budu eliminirane. Nakon faze ravnoteže slijedi faza bijega. Stanice koje su izbjegle kontrolu sada su sposobne izazvati klinički vidljivu bolest (Slika 4).

Ta teorija i današnje shvaćanje tumorske imunosti počiva na pretpostavci da je imunološka reakcija zasnovana na mogućnosti organizma da prepozna "vlastito" i "ne vlastito" (engl. *self vs non-self*).



Slika 4. Teorija imunološkog uređivanja (immunoediting). Modificirano s obzirom na referencu (79)

1.2.2. Imunološki odgovor organizma na tumorske stanice

Danas se zna da u imunološkom odgovoru organizma na tumorske stanice sudjeluju urođena i stečena imunost. Osnovna uloga imunološkog sustava je održavanje homeostaze u organizmu, a to se postiže konstantnim imunonadzorom i započinjanjem upalnog odgovora u kojem sudjeluju urođena i stečena imunost (80). Neoplastička transformacija stanica inducira imunološki odgovor koji svojom aktivnošću može eliminirati početni tumor, no kad je ta eliminacija nepotpuna, tumorske stanice se nastavljaju razvijati što dovodi do klinički vidljive bolesti. Posebno mjesto u tom procesu zauzimaju citotoksični limfociti T koji su dio stečene imunosti. Citotoksični limfociti T su CD 8+ limfociti, koji su sposobni izazvati izravnu apoptozu stanice. Iako i NK stanice (*natural killers*) također dovode do apoptoze, tj. stanične smrti; citotoksični limfociti T su specifični po tome što prepoznaju točno određen antigen ako je prezentiran, tj. vezan uz molekulu MHC klase I, koja je prisutna na svim stanicama (81). Citotoksični limfociti T su pod kontrolom Treg limfocita preko interleukina IL-10, adenzina i drugih molekula koje ih inaktiviraju do anergičnog stanja, što prevenira nastanak autoimunih bolesti u zdravom organizmu (82-83).

Regulacijski limfociti T (*Treg*) odgovorni su za održavanje periferne tolerancije, preveniranje autoimunosti, limitiranje kroničnih upalnih bolesti kao i ograničavanje protu-tumorske imunosti potiskivanjem citotoksičnih limfocita T koji prepoznaju tumorske antigene (84). Dakle, u tumorskom okruženju imunoregulacijski limfociti T (*Treg*) inhibiraju antitumorsku aktivnost citotoksičnih T limfocita.

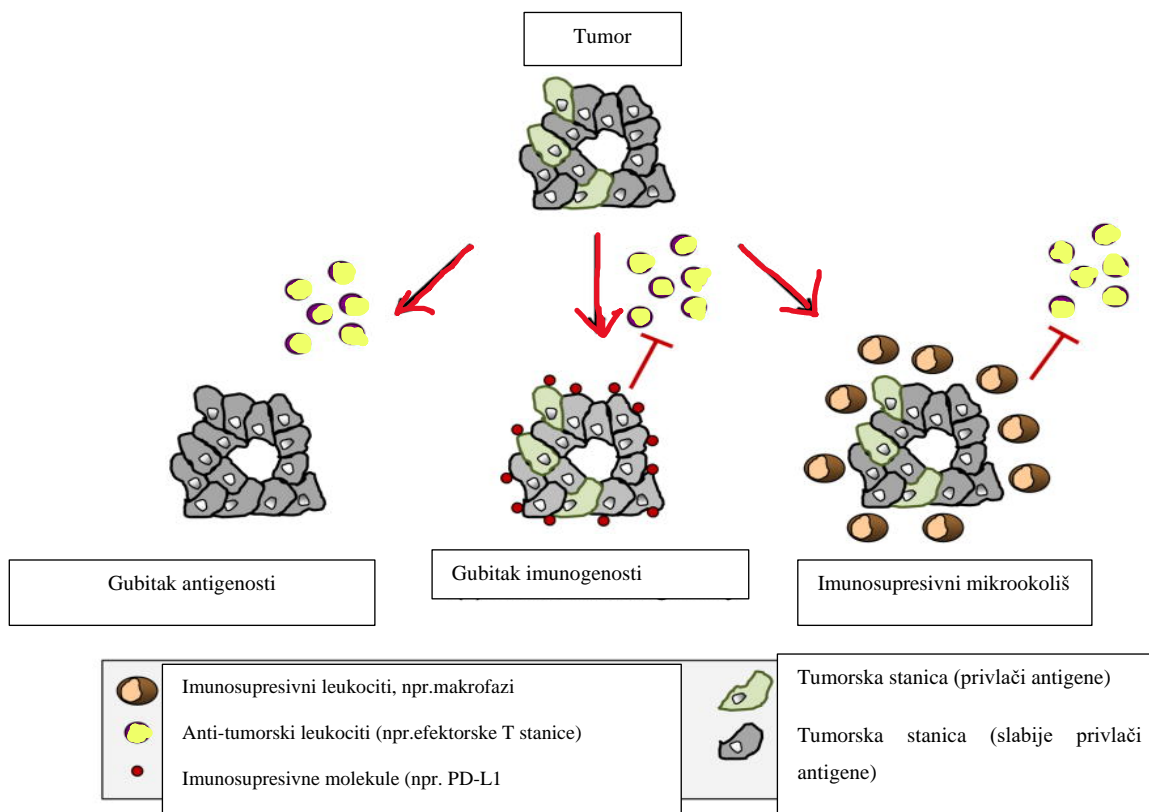
Zaključno, tumorske stanice na različite načine izbjegavaju imunološki nadzor i eradikaciju, a sve to dovodi do neograničenog rasta tumorskih stanica. Danas je poznato nekoliko mehanizama kojima tumorske stanice izbjegavaju imunološki odgovor domaćina (Slika 5):

- 1.) Neadekvatna prezentacija antigena, tj. interakcija TCR (*t-cell receptor*, stanični receptor T) nedovoljna za izazivanje produktivnog T staničnog odgovora. Uzrok tomu je najčešće smanjena izraženost MHC I molekula ili defekti u provođenju signala.
- 2.) Aberantna izraženost molekula koje utječu na preživljavanje limfocita T ili njihovu efektorsku funkciju, tj. nedovoljna izraženost kostimulacijskih molekula ili tumorska

produkcija inhibicijskih molekula. Primjerice, Fas ligand, koji eksprimiraju tumorske stanice, a dovodi do smrti citotoksičnih limfocita T kad se vežu na njega.

3.) Regulacija putem tumorske strome te stvaranje TGF- β i IL-10, čime se inducira anergija efektorskih stanica, a induciraju se Treg limfociti i APC koji toleriraju tumorske antigene.

Privlačenje i/ili indukcija Treg limfocita, kao mosta između protuupalnih citokina i tolerantnih APC (APC prema engl. *antigen presenting cells*, stanice koje prezentiraju antigen) je možda jedan od glavnih načina kojima tumor izbjegava imunološki nadzor (85).



Slika 5. Mehanizmi izbjegavanja imunološkog odgovora. Modificirano s obzirom na referencu (86)

1.2.3. Tumorski mikrokoliš

Tumorsko tkivo ne čine samo relativno homogene tumorske stanice, već brojne stanice u parenhimnom odjeljku i mreža stanica iz okoliša, tj. strome koje su nastale tijekom stupnjevitog procesa tumorigeneze (87). Tumorske i stromalne stanice su konstantno u interakciji, a parakrina signalizacija vjerojatno je ključna za regulaciju proliferacije, invazije, angiogeneze i metastatsko ponašanje tumorskih stanica. Stanice imunskog sustava koje se infiltriraju u tumor smatraju se njegovim integralnim dijelom.

Tumor-infiltrirajući limfociti (TIL) su mononuklearne imunsko stanice koje se infiltriraju u tumorsko tkivo, a opisane su kod različitih vrsta tumora, uključujući i tumor dojke (88). Oni se određuju na histološkim preparatima nakon standardnog hemalaun-eozin bojenja. Razlikuju se dvije vrste TIL-ova, stromalni i intratumorski. Stromalni se nalaze u stromi te nisu u izravnom kontaktu s tumorskim stanicama, za razliku od intratumorskih, koji su smješteni u tumorskim gnijezdima i imaju direktan kontakt s tumorskim stanicama, no bez kontakta sa stromalnim prostorom. Stromalni i intratumorski TIL-ovi razlikuju se po tome što ih čine različite populacije stanica (stanice T, stanice B, NK stanice, makrofazi) u različitom omjeru, ali uz najveću zastupljenost limfocita T. Vrsta i broj stanica, kao i uloga tumor-infiltrirajućih limfocita ovisi o vrsti tumora kao i o involviranom sijelu tumora (89). Prema nedavno objavljenim preporukama za standardiziranje i određivanje TIL-ova, određuju se stromalni tumor-infiltrirajući limfociti jer su klinički relevantniji i rezultat je reproducibilniji, tj. lakši za interpretaciju (90). Naime, intratumorski TIL-ovi su prisutni u znatno manjem broju slučajeva, heterogeniji su po sastavu te ih je vrlo teško odrediti samo standardnim hemalaun-eozin bojenjem bez upotrebe imunohistokemije ili imunofluorescencije. Kod karcinoma dojke prisutnost TIL-ova vezana je uz bolju prognozu i dulje preživljenje (91).

1.2.4. Tumorski antigeni

Tumorski antigeni su molekule koje stvaraju tumorske stanice, a kod imunokompetentnog domaćina izazivaju imunološki odgovor. Molekularnu prirodu antigena prepoznali su Lurquin i sur. (92) 1989. godine kad su mišji tumor specifični citotoksični limfociti T (CTL) prepoznali peptid koji je zapravo bio mutirani vlastiti protein na površini tumorske stanice.

Postoje dvije osnovne kategorije tumorskih antigena: tumor specifični antigeni (TSA) i tumor pridruženi antigeni (TAA) prema (engl. *tumor-associated antigens*). Tumor specifični antigeni (TSA) nikad se ne nalaze na zdravim stanicama i najčešće su posljedica mutacija karakterističnih za određeni tumor. Tumor pridruženi antigeni su prezentirani na tumorskim i na normalnim stanicama. Češći su od tumor specifičnih antigena, a zapravo su rezultat prekomjerne ili aberantne izraženosti nemutiranih proteina (92-94). Tumorski antigeni mogu se nalaziti na staničnoj membrani, u citoplazmi stanice ili u izvanstaničnoj tekućini (91-92). Idealan tumorski antigen trebao bi ispuniti četiri uvjeta (95):

1. visoka izraženost u tumorskim stanicama
2. izraženost u normalnim stanicama ne postoji
3. laka dostupnost cirkulaciji (vitalno važna za razvoj tumora)
4. prepoznatljivost za imunski sustav (citotoksični T limfociti)

Metoda detekcije tumorskih antigena koja se danas koristi je serološka analiza biblioteke cDNA (SEREX). Biblioteka cDNA (prema engl. *complementary DNA*) sadržava odsječke DNA iz uzorka tumora, a nastaje prepisivanjem uz pomoć enzima reverzne transkriptaze na kalupu izdvojene mRNA. Izlaganjem pripremljenog uzorka bolesnikovom serumu identificiraju se antigeni koji su izazvali humoralni odgovor s visokim titrom IgG protutijela. Metoda omogućava ne samo detekciju antigena na staničnoj površini, nego i intracelularnih antigena (96).

1.2.5. Rak-testis antigeni

Rak-testis antigeni pripadaju u skupinu tumora pridruženih antigena, (*Cancer/Testis Tumor Associated Antigens*). Fiziološki su izraženi tijekom embrionalnog razvoja, tj. u zametnim stanicama testisa, ovarija i trofoblasta. Nefiziološka izraženost tih antigena u stanicama nalazi se kod nekih zloćudnih tumora kao što su melanom, karcinom pluća, mokraćnog mjehura, jetre i dojke. Najpoznatiji i prvi otkriveni rak-testis antigen bio je MAGE-1 (*melanoma-associated antigene 1*) prije dvadesetak godina. Ta skupina antigena smatra se izrazito specifičnom, a specifičnost je u činjenici da se testisi smatraju imunološki privilegiranim mjestom. Naime, stanice sjemenika, zbog manjka izravnog dodira s imunosnim stanicama, nisu dostupne imunosnom sustavu (96). Na površini zametnih stanica nema izraženih molekula MHC razreda I (96). Upravo zbog toga prezentacija tih antigena limfocitima T nije moguća pa se rak-testis antigeni smatraju svojevrsnim neoantigenima koji su sposobni potaknuti imunosni sustav na specifičnu imunološku reakciju (97-98). Imunohistokemijska reakcija pokazuje najjaču MAGE izraženost u sjemenskim kanalićima - na spermatogonijama i na spermatocitima na svim razinama lumena kanalića. Što je stanica zrelija, imunohistokemijsko bojenje je slabije (99). U Sertolijevim stanicama i spermatidama nema proteina MAGE (100).

Danas je poznato više od 200 rak-testis antigena, a taj broj i dalje raste (101). Rak-testis antigeni se mogu podijeliti u dvije skupine s obzirom na kromosomsku lokalizaciju gena koji ih kodiraju (98). U prvoj skupini su geni locirani na X kromosomu koji su visoko specifični i imunogeni, a kodiraju proteine iz porodice MAGE, GAGE, SSX, CT 45 itd. (102-103). Drugu skupinu čine geni koji su smješteni na autosomima, a kodiraju proteine iz skupine BAGE, HAGE, SP17 itd. Ti antigeni su izraženi u mejotičkom i post-mejotičkom razdoblju te je njihova pojavnost u karcinomima generalno niža nego u prethodno navedenoj skupini. (104).

Zaključno, zajednička obilježja rak-testis antigena su (96, 105):

1. izraženost u normalnim testisima
2. pripadnost skupinama više sličnih gena (“obitelji gena”)
3. često se nalaze na X kromosomu
4. heterogena izraženost u karcinomima
5. signifikantna povezanost s tumorskom progresijom
6. imunogeničnost u bolesnika s karcinomom

Danas, identifikacijom tumorskih antigena koje imunski sustav prepoznaje (106-107) uz razumijevanje mehanizma prirodne T stanične imunosti (108) ušlo se u novo razdoblje, razdoblje ciljane, antigen specifične imunoterapije tumora posredovane citotoksičnim limfocitima T. Opisane su dugotrajne regresije tumora kod bolesnika liječenih indukcijom antigen specifičnih citotoksičnih limfocita (106, 109). Progresija tumora tijekom imunizacije nastaje ili gubitkom izraženosti antigena ili nestankom MHC I molekule na tumorskoj stanici (106, 109). Rak-testis antigeni zbog svojih karakteristika idealni su kandidati za razvoj imunoterapije. No unatoč tome što brojna klinička istraživanja nisu postigla željeni uspjeh i dala očekivane rezultate, za razliku od razvoja monoklonskih antitijela koja djeluju na imunološke kontrolne točke (*immune check point*), rak-testis antigeni i dalje su idealne mete liječenja, no potrebna su daljnja klinička istraživanja kako bi našli svoje zaslužno mjesto u svakodnevnoj praksi.

1.2.5.1. Antigeni MAGE

Antigeni MAGE (*melanoma-associated antigene*) su najistraživanija skupina rak-testis antigena. MAGE-1, koji je poslije preimenovan u MAGE-A1, bio je prvi C/T TAA, a otkriven je u stanicama melanoma 1991. godine (110). Danas se zna da postoje dvije vrste MAGE antigena. Geni koji kodiraju antigene iz skupine MAGE-1 locirani su na X kromosomu te su fiziološki izraženi u zametnim stanicama testisa, a nefiziološki u tumorskim stanicama. U prvoj grupi su MAGE -A, -B i -C, koji čine veliku MAGE porodicu (95). Geni MAGE A smješteni su na q terminalnom kraju X kromosoma (Xq28), (112-114). Produkt gena MAGE-1 je citoplazmatski protein klasteriran u paranuklearnim strukturama nalik organelama (114). U drugoj skupini su MAGE -D, -E, -F, -G, -H, -L i nekadin, a osnovno obilježje te skupine je da geni koji ih kodiraju nisu striktno vezani za X kromosom te nisu izraženi u tumorskim stanicama (115). Za drugu skupinu te velike porodice pretpostavlja se da je vezana za regulaciju, diferencijaciju i apoptozu neurona (116).

Antigeni iz skupine MAGE-A1 izraženi su u različitom postotku u raznim zloćudnim tumorima, a najčešće su izraženi u tumorskim stanicama karcinoma pluća nemalih stanica (NSCLC), tumorima mokraćnog mjehura, tumorima glave i vrata, tumorima jednjaka i sarkomima (117-123). Antigeni su često izraženi i u trostruko negativnom karcinomu dojke, multiplom mijelomu, Hodgkinovom limfomu itd. (51-53). Mnoga istraživanja su pokazala da je izraženost MAGE-A antigena u tumorskim stanicama povezana s lošijom prognozom (54). Poznato je više monoklonskih protutijela koja prepoznaju CT TAA, npr. protutijelo "77B2" prepoznaje MAGE-A1 antigen u tumorskim stanicama i stanicama spermatogonija (55-56). Za dokazivanje MAGE A3/4 može se koristiti monoklonsko protutijelo nazvano "57B", koje prepoznaje više genskih produkata MAGE-A skupine na svježe smrznutim preparatima (MAGE-A3, -A4, -A6 i -A12), odnosno MAGE-A3/4 u deparafiniranim preparatima.

Zbog svojih karakteristika antigeni MAGE su idealna meta za imunoterapiju. U razdoblju od 10-ak godina (2006. - 2016.) provedena su 44 istraživanja koja su kao ključnu riječ imala MAGE-A antigen (54). No istraživanja nisu postigla željeni rezultat. Zastumotid (GSK2132231A) peptidno rekombinantno cjepivo MAGE-A3 ispitivano je kod pacijenata s melanomom i karcinomom pluća (NSCLC), no većina istraživanja je prekinuta u fazi II i III jer Zastumotid nije pokazao znatniji utjecaj na preživljenje pacijenata (124).

1.2.5.2. Antigeni NY-ESO

Antigeni iz porodice NY-ESO otkriveni su potkraj devedesetih godina, a geni koji ih kodiraju smješteni su na X kromosomu (CTAG1B gen). Najpoznatiji predstavnik te grupe je NY-ESO-1 antigen, koji je jedan od najimunogenijih CT TAA antigena, a smješten je na Xq28 r kromosomu (125). Osnovni produkt tog gena je NY-ESO-1 antigen, tj. protein od 180 aminokiselina, veličine 18 kDA, s izrazito glicinom bogatom N-terminalnom regijom te ekstremno hidrofobnom C-terminalnom regijom, koja se može zamijeniti za transmembransku domenu (126). Inicijalno je NY-ESO-1 (*New York esophageal squamous cell carcinoma*) otkriven u krvi pacijenta s karcinomom pločastih stanica jednjaka (96) te je ubrzo postao jedan od glavnih kandidata imunoterapijskog liječenja kao i u mogućoj antitumorskoj vakcinaciji (96). NY-ESO-1 antigen fiziološki je izražen u zametnim stanicama testisa te nije prisutan u somatskim stanicama (isključujući nesignifikantnu izraženost u stanicama placentе, mozga, timusa i uterusa) te je upravo zbog toga idealan kandidat za primjenu imunoterapije (126). Taj antigen je poseban po tome što može spontano inducirati humoralni i T-specifični odgovor kod nekih bolesnika koji imaju određene podtipove tumora (127). NY-ESO-1 izražen je u 1/3 - 1/4 bolesnika s melanomom, kod bolesnika s tumorima jednjaka, jetre, pluća, mokraćnog mjehura, ovarija, želuca i prostate; a u manjem postotku je izražen kod bolesnika s tumorima pankreasa, bubrega, kolorektalnim te limfomima (124-125). Taj antigen je u visokom postotku izražen kod sinovijalnog sarkoma, vrlo agresivnog tipa tumora s lošom prognozom (128). Nekoliko studija istraživalo je i izraženost antigena NY-ESO-1 u tumoru dojke, a rezultati su pokazali da je ona varirala između 2,1 - 40% (129-133).

Titar NY-ESO-1 protutijela povećava se s progresijom bolesti, a smanjuje s regresijom (134). Za imunohistokemijsko dokazivanje izraženosti antigena NY-ESO-1 može se koristiti monoklonsko protutijelo nazvano "D8.38" (134).

Najviše istraživanja, a neka su još u tijeku, rađeno je kod pacijenata sa sinovijalnim sarkomom i melanomom (124). U tim istraživanjima ispituje se učinkovitost cjepiva (NY-ESO-1/ISCOMATRIX™), a istraživanja su zbog početnih dobrih rezultata nastavljena te se konačni rezultati još očekuju.

2. Hipoteza

U prognostički nepovoljnijim neinvazivnim duktalnim karcinomima dojke (viši gradus jezgre, centralna nekroza, veći tumor i negativni steroidni receptori) očekuje se izraženost rak-testis antigena iz skupine MAGE (multi-MAGE-A, MAGE-A1 i MAGE-A10) i NY-ESO-1.

3. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja mogu se podijeliti na opći cilj i specifične ciljeve:

3.1. Opći cilj

Cilj istraživanja je utvrditi imunohistokemijsku izraženost rak-testis antigena (iz skupine MAGE-A: multi-MAGE-A, MAGE-A1, MAGE-A10 i NY-ESO-1) u neinvazivnim duktalnim karcinomima dojke.

3.2. Specifični ciljevi

1. Istražiti povezanost izraženosti proteina iz skupine MAGE-A (multi-MAGE-A, MAGE-A1, MAGE-A10) i NY-ESO-1 s patohistološkim prognostičkim i prediktivnim čimbenicima za duktalni neinvazivni karcinom dojke (izraženost estrogenskih i progesteronskih receptora, gradus jezgre, veličina tumora, centralna nekroza i udaljenost od kirurškoga ruba).
2. Definirati limfocitnu infiltraciju u postojećem materijalu (postoji, ne postoji).
3. Utvrditi eventualnu povezanost između limfocitne infiltracije i izraženosti istraživanih proteina.

4. Materijali i metode

4.1. Bolesnici

U istraživanju se koristio arhivski materijal Zavoda za onkološku patologiju Klinike za tumore, KBC-a Sestre milosrdnice, bolesnica operiranih u istoj ustanovi zbog duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke u razdoblju od 2007. - 2014. godine. Sve preparate je pregledao patolog te su ponovno određeni patohistološki čimbenici za duktalni neinvazivni karcinom dojke (ER i PR receptori, veličina tumora, gradus jezgre, prisutnost centralne nekroze te udaljenost od ruba). U planu je prvotno bila analiza 90 bolesnica s duktalnim neinvazivnim karcinomom dojke (podijeljenih u tri skupine prema stupnju diferenciranosti tumora- gradusu, u svakoj skupini je trebalo biti po 30 bolesnica). Zbog nedostupnosti materijala analizirane su 83 bolesnice. No bez obzira na manji uzorak od onoga koji je bio predviđen, dobiveni rezultati su statistički vjerodostojni te manji uzorak nije utjecao na njih što je naknadno potvrđeno analizom snage testa. Kod svih bolesnica učinjen je poštediti operativni zahvat (segmentektomija, lumpektomija) te je kod svih provedena radioterapija. Endokrinu terapiju (tamoksifen ili inhibitor aromataze) primale su one bolesnice čiji je tumor bio hormonski ovisan. Bolesnice su imale između 40 i 70 godina (srednja vrijednost 57.4). Iako u prijavi teme nije navedeno, osim prediktivnih i prognostičkih čimbenika koji su navedeni u odlomku Ciljevi istraživanja, u analizu je uvršten i parametar lokalni recidiv. Bolesnice su praćene u razdoblju između 1 i 8 godina (medijan 5.02 godina) te su neke od njih unutar tog razdoblja razvile lokalni recidiv. S obzirom na to da su verificirana i tri različita načina izraženosti analiziranih rak-testis antigena u tumorskom materijalu (citoplazmatsko bojenje, bojenje jezgre, istodobno bojenje citoplazme i jezgre) analiziran je i odnos načina izraženosti i patohistoloških i prediktivnih čimbenika duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke.

4.2. Metode

4.2.1. Patohistološki postupak

Materijal je obrađen standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 μ m, deparafiniranje i bojenje standardnom metodom hemalaun eozin (HE). Tumorsko tkivo je

pregledano svjetlosnim mikroskopom kako bi se provjerila prethodno postavljena patohistološka dijagnoza te odredili prognostički čimbenici (izraženost estrogenskih i progesteronskih receptora, gradus jezgre, veličina tumora, središnja nekroza i udaljenost od kirurškoga ruba) i provjerila TNM klasifikacija. Postotak estrogenskih i progesteronskih receptora u materijalu određen je imunohistokemijskom analizom (metoda izbora), s obzirom na postotak pozitivnih stanica i intenzitet bojenja (27). Za parametar veličina tumora izračunata je prosječna vrijednost s obzirom na podatke o veličini tumora kod svake promatrane bolesnice pa je prema dobivenoj prosječnoj vrijednosti veličina tumora podijeljena u dvije skupine (< 1.2 mm i > 1.2 cm). Tumor-infiltrirajući limfociti (TIL) su određeni u postojećem materijalu prema postojećim smjernicama i definirani kao postoji/ne postoji, a smatrani su pozitivnima ako su bili prisutni u $\geq 50\%$ materijala (135-136)

4.2.2. Imunohistokemijski postupak

Za imunohistokemijsku analizu učinjena su četiri dodatna reza primarnog tumora uz primjenu četiriju monoklonskih protutijela. Protutijela koja su korištena u ovom istraživanju nisu komercijalna, već su dar dr. G. Cesarea Spagnolija iz Sveučilišne bolnice u Baselu, Švicarska (hibridomi koji stvaraju protutijela uzgojeni su u njegovom laboratoriju). U istraživanju su korištena sljedeća protutijela:

1. nerazrijeđeni supernatant hibridoma koji stvara mišje monoklonsko protutijelo mAb77B (MAGE-A1), mAb57B (multi-MAGE-A), mAb 3GA11 (MAGE-A10) (Department of Surgery and Research, University of Basel, Switzerland, dr. G. Spagnoli), (117, 138-140)
2. mišje monoklonsko protutijelo D8.38 za NY-ESO-1 (Department of Surgery and Research, University of Basel, Switzerland, dr. G. Spagnoli) (141)

Imunohistokemijska analiza obavljena je aparatima za imunohistokemijsko bojenje DAKO autostainer Universal staining system (metodom MSIP) prema preporuci proizvođača. Imunohistokemijski postupak proveden je u Zavodu za onkološku patologiju Klinike za tumore. Kao pozitivna vanjska kontrola upotrijebljen je tumor (melanom), kao negativna kontrola koristilo se normalno tkivo bez dokazane izraženosti tih proteina (dojka). Kako tumori

sadržavaju i dijelove normalnog tkiva i stanice koje se ne boje, ti dijelovi su poslužili kao negativna unutarnja kontrola.

4.2.3. Imunohistokemijski protokol

Imunohistokemijska analiza je provedena na sljedeći način:

1. Iz parafinskih blokova duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke narezani su rezovi debljine 5 mikrometara i nanesen su na silanizirana mikroskopska stakalca (DAKO, Danska)
2. Stakalca su sušena su u termostatu 20 minuta na 60°C
3. Preparati su potom deparafinirani i tretirani u mikrovalnoj pećnici na 800 W 3x5 minuta u 10 mmol/l citratnom puferu uz pH 6,0
4. Nakon toga su stakalca isprana u puferu PBS (Phosphate-Buffered Saline) pH 7,2 i tretirana s H₂O₂ (Dako-No.S 2023) 5 minuta radi inaktivacije endogene peroksidaze
5. Stakalca su isprana u puferu PBS, a nakon toga slijedi upotreba primarnih protutijela (anti-multi-MAGE-A/MAGE-A10/MAGE-A1 i anti-NY-ESO-1) u nerazrijeđenoj formi i inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom 90 minuta
6. Slijedi ispiranje u puferu PBS, nakon čega se nakapa biotinizirano sekundarno protutijelo (EnVision FLEX, High pH Kit, katološki broj 8010; Dako) kroz 45 minuta
7. Nakon 45 minutne inkubacije s primarnim protutijelom te njegova ispiranja, nastali antigen-protutijelo kompleks vizualiziran je primjenom univerzalnog sekundarnog protutijela konjugiranog s peroksidazom (Dako-No.K 0690) u trajanju od 30 minuta. Svi reagensi za imunohistokemijsko bojenje sadržani su u vizualizacijskom paketu EnVision Flex High pH (K8010, Dako Danska).

8. Slijedi ispiranje u puferu PBS i 10-minutna inkubacija s DAB (diaminobenzidin) kromogenom (Dako-No.K 3468) u aparatu Autostainer Link 48 (Dako) prema uputama proizvođača.

9. Stakalca su prebojena Hemalaunom (Dako-No.S 2020), isprana u tekućoj vodi i dehidrirana (96% alkohol, apsolutni alkohol).

10. Potom se stakalca izbistre u ksilolu, uklapaju u Kanada balzam te pokrivaju pokrovnim stakalcem.

4.2.4. Analiza imunohistokemijskog bojenja

Rezultati imunohistokemijskog bojenja za proteine multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1 i NY-ESO-1 izraženi su semikvantitativno, određivanjem imunohistokemijskog indeksa bojenja (IB) uzimajući u obzir intenzitet reakcije te određujući postotak neprijeporno imunoreaktivnih stanica. Intenzitet reakcije i postotak imunoreaktivnih stanica određivan je na cijelom odabranom rezu kroz tumor.

Intenzitet reakcije (bojenja) označen je kao:

0 - za odsutnost reakcije

1 - za slabo izraženu reakciju

2 - za umjereno izraženu reakciju

3 - za izrazito pozitivnu reakciju.

Postotak imunoreaktivnih stanica određen je kao:

0 - za odsutnost reakcije

1 - za slabo izraženu reakciju, do 10% pozitivnih tumorskih stanica

2 - za umjereno izraženu reakciju, od 10% do 50% pozitivnih tumorskih stanica

3 - za jako izraženu reakciju, preko 50% pozitivnih tumorskih stanica

Imunohistokemijski indeks bojenja (IIB) dobio se kao umnožak intenziteta reakcije (IR) i postotka reaktivnih stanica (PRS): $IIB = IR \times PRS$. Skupine dobivene određivanjem imunohistokemijskog indeksa bojenja utvrđene su u skladu s naputcima iz literature na temelju kojih se rezultati dijele u četiri skupine (142):

0 - odsutnost reakcije

I - slabo izražena reakcija (IIB - umnožak iznosi 1, 2 ili 3)

II - umjereno jaka reakcija (IIB - umnožak iznosi 4 ili 6)

III - izrazito jaka reakcija (IIB - umnožak iznosi 9)

4.2.5. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu korišten je statistički računalni program Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD), MedCalc (inačica 15.8.0, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija) te IBM SPSS (inačica 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD). Učinjena je deskriptivna statistika izraženosti proteina iz porodice MAGE-A (multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1) i NY-ESO-1 s obzirom na patohistološke karakteristike dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke (veličina tumora, gradus tumora, R1, tj. udaljenost od kirurškog ruba, prisutnost centralne nekroze, postojanje limfocitne infiltracije te lokalnog recidiva - naknadno). ROC analizom (*Receiver Operatin Characteristic Curve*) ocijenjena je valjanost dijagnostičke metode za određivanje ER, PR, multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1 i NY-ESO-1. Analizom je dobiveno da je granični kriterij za multi-MAGE-A $>20\%$, za MAGE-A10 >0 , za MAGE-A1 <0 , a za NY-ESO-1 $>20\%$ (Tablica 2). Prema analizi, savršeni su testovi za rak-testis antigen NY-ESO-1. Najnepouzdaniji test je za MAGE-A1, zatim multi-MAGE-A i MAGE-A10. Za analizu povezanosti između patohistoloških karakteristika dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke, bojenja i TIL-a korišten je Pearsonov hi kvadrat test te Fisherov egzaktni test. Procjena snage povezanosti prikazana je kao omjer šansi (engl. *odds ratio*, OR) s pripadajućim 95% intervalom pouzdanosti (engl. *confidence interval*). Razina signifikantnosti postavljena je na $\alpha < 0.05$.

5. Rezultati

U istraživanju su analizirane 83 bolesnice, dok sedam bolesnica zbog nedostupnosti materijala nije bilo moguće uključiti u istraživanje.

Zbog potreba statističke analize podataka podatci su grupirani unutar svake velike skupine. Za parametar veličina tumora izračunata je prosječna vrijednost s obzirom na podatke o veličini tumora kod svake promatrane bolesnice pa je, s obzirom na dobivenu prosječnu vrijednost, veličina tumora podijeljena u dvije skupine (< 1.2 cm i > 1.2 cm), a podatak o gradusu tumora grupiran u skupinu jedan, gdje su bolesnice s gradusom I, te skupinu dva gdje su bolesnice s gradusom II i III. Ostala obilježja su grupirana ovisno o tome jesu li prisutna ili nisu u analiziranom materijalu kao da i ne (prikazano u tablici 1.). U istraživanje je uključeno 18 bolesnica (22%) iz skupine jedan (gradus I) te 65 bolesnica (78%) iz skupine dva (gradus II i III). Pozitivne estrogenske receptore imalo je njih 59 (71%), a negativne 24 (29%). Slično je bilo i s progesteronskim receptorima, pozitivne receptore imale su njih 52 (63%), a negativne 31 (37%). Limfocitna infiltracija bila je prisutna kod 38 bolesnica (46%). Zastupljenost drugih parametara u istraživanom (pregledanom) materijalu navedena je u tablici broj 1. Naknadno je dodan parametar lokalnog recidiva u promatranoj skupini. U inicijalnoj prijavi teme taj parametar nije naveden. Bolesnice su praćene između jedne i osam godina (medijan 5.02 godina). S obzirom na to da su verificirana tri različita načina izraženosti analiziranih rak-testis antigena u tumorskom materijalu (citoplazmatsko bojenje, bojenje jezgre, istodobno bojenje citoplazme i jezgre) analiziran je i odnos načina izraženosti i patohistoloških i prediktivnih čimbenika dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke.

5.1. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Tablica 2. Raspodjela ispitivanih čimbenika

Parametar		B (%)
Veličina tumora	<1,2 cm	50 (60)
	>1,2 cm	33 (40)
Gradus	1	18 (22)
	2+3	65 (78)
Centralna nekroza	Ne	34 (41)
	Da	49 (59)
TIL	Ne	45 (54)
	Da	38 (46)
multi-MAGE-A	Ne	13 (16)
	Da	70 (84)
MAGE-A10	Ne	42 (51)
	Da	41 (49)
MAGE-A1	Ne	6 (7)
	Da	77 (93)
NY-ESO-1	Ne	21(27)
	Da	62 (74)
ER	Ne	24 (29)
	Da	59 (71)
PR	Ne	31(37)
	Da	52 (63)
R1	Ne	39 (47)
	Da	44 (53)
Bojenje citoplazme	Ne	28 (34)
	Da	55 (66)
Bojenje jezgre	Ne	75 (90)
	Da	8 (10)
Bojenje citoplazme i jezgre	Ne	68 (82)
	Da	15 (18)
Lokalni recidiv	Ne	76 (92)
	Da	7 (8)

B - broj, % - postotak; TIL - tumor-infiltrirajući limfociti; rak-testis antigeni: multi-MAGE-A, MAGE-A1, MAGE-A10 i NY-ESO-1; ER i PR- steroidni receptori; R1- pozitivan kirurški rub

ROC analizom (*Receiver Operating Characteristic Curve*) ocijenjena je valjanost dijagnostičke metode za multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1 i NY-ESO-1. Za čimbenike multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1 i NY-ESO-1 određena je prijelomna vrijednost ili engl. *cut off* točke. Prijelomne vrijednosti su vrijednosti koje predstavljaju optimalan odnos između osjetljivosti i specifičnosti dijagnostičkog testa, a najbolji odnos je onaj gdje ima najmanje lažno pozitivnih i najmanje lažno negativnih rezultata. Analizom je dobiveno da je granični kriterij za multi-MAGE-A >20%, za MAGE-A10 >0, za MAGE-A1 <0, a za NY-ESO-1 >20%. Prema analizi, savršen je test za antigen NY-ESO-1. Najnepouzdaniji test je za MAGE-A1, zatim multi-MAGE-A i MAGE-A10.

Tablica 3. Prijelomne vrijednosti, tj. *cut off* točke

Čimbenik	Osjetljivost %	Specifičnost %	Granični kriterij (<i>cut off</i>) %
multi-MAGE-A	97,7	47,5	>20
MAGE-A10	100	66,7	>0
MAGE-A1	6,8	87,5	<0
NY-ESO-1	100	96	>20

Tablica 4. Izraženost antigena multi-MAGE-A, MAGE-A1, MAGE-A10 i NY-ESO-1 u duktalnom neinvazivnom karcinomu dojke (DCIS)

Jačina izraženosti	multi-MAGE-A	MAGE-A1	MAGE-A10	NY-ESO-1
0	6	2	30	17
I	7	4	12	4
II	45	24	21	26
III	25	53	20	36
Ukupno	83	83	83	83

0-odsustvo reakcije

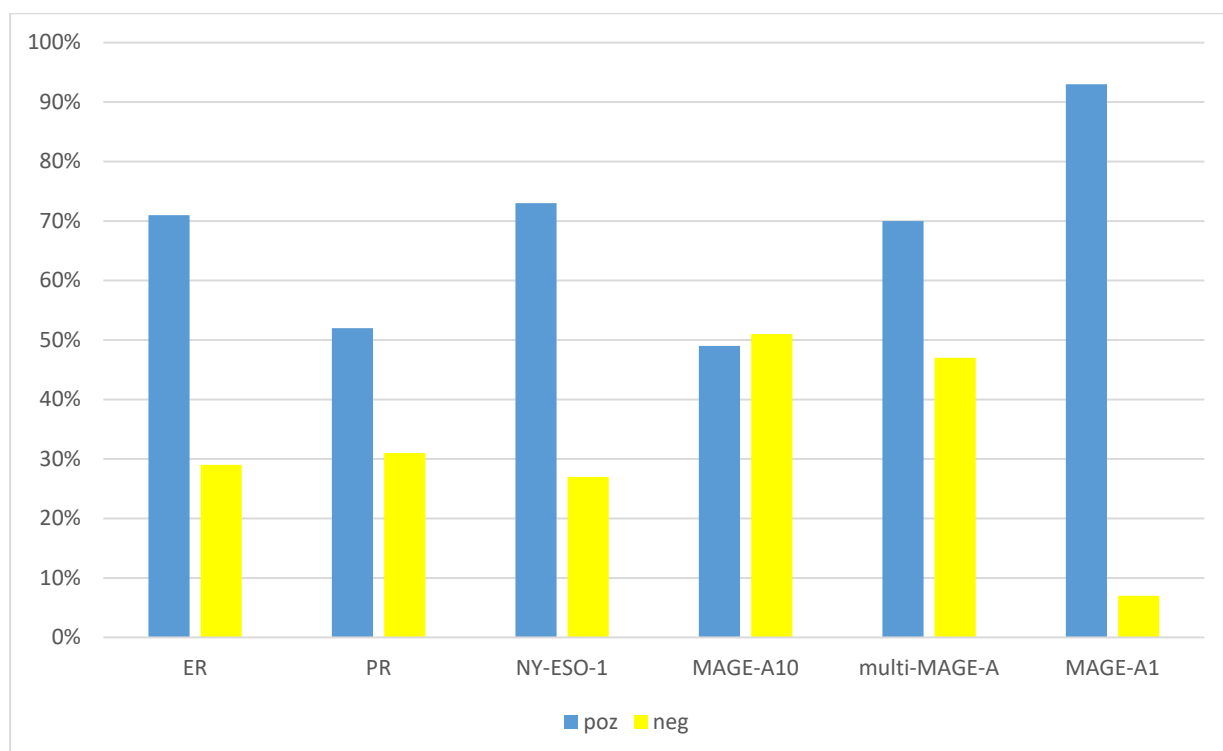
I-slabo izražena reakcija (umnožak iznosi 1,2 ili 3)

II-umjereno jaka reakcija (umnožak iznosi 4 ili 6)

III-izrazito jaka reakcija (umnožak iznosi 9)

U Tablici 4 prikazana je izraženost antigena iz skupine MAGE (multi-MAGE-A, MAGE-A1 i MAGE-A10) i NY-ESO-1 s obzirom na imunohistokemijski indeks bojanja (II B) koji je umnožak intenziteta reakcije (IR) i postotka reaktivnih stanica (PRS): $IIB = IR \times PRS$.

Slika 6 grafički prikazuje zastupljenost patohistoloških čimbenika (ER i PR receptori) te rak-testis antigena (MAGE-A1, multi-MAGE-A, MAGE-A10 i NY-ESO-1) s obzirom na zastupljenost u promatranom patohistološkom materijalu.



Slika 6. Prikaz zastupljenosti čimbenika ER, PR, NY-ESO-1, MAGE-A10, multi-MAGE-A i MAGE-A1 kod analiziranih bolesnika

Tablica 5. Raspodjela broja bolesnica prema načinu bojenja u promatranom materijalu

Način bojanja u materijalu	Broj bolesnica (B)
Bojenje jezgre	8
Bojenje citoplazme	55
Simulatno bojenje citoplazme i jezgre	15
Negativna reakcija	5
Ukupno	83

U Tablici 5 prikazana je raspodjela načina bojanja s obzirom na broj bolesnica. Iz tablice je vidljivo da su kod 8 bolesnica navedeni antigeni (multi-MAGE-A, MAGE-A1, MAGE-A10 i NY-ESO-1) bojali samo jezgru, kod njih 55 samo citoplazmu, a kod 15 bolesnica bilo je prisutno simultano bojenje citoplazme i jezgre. Kod 5 bolesnica reakcija je bila negativna, tj. istraživani antigeni nisu bili prisutni na tumorskim stanicama.

Tablica 6. Raspodjela antigena multi-MAGE-A u tumoru prema prognostičkim i prediktivnim čimbenicima

PARAMETRI	multi-MAGE-A		UKUPNO	Pearson χ^2 ; P vrijednost (broj stupnjeva slobode = 1)
	Poz.70	Neg.13		
			83	
ER+	51	8	59	0,507*
ER-	19	5	24	
PR+	46	6	52	0,219*
PR-	24	7	31	
Centralna nekroza +	26	8	34	2,7; 0,1
Centralna nekroza-	44	5	49	
R1 +	38	6	44	0,29; 0,59
R1-	32	7	39	
TIL+	35	10	45	3,2; 0,074
TIL-	35	3	38	
gr 1	14	4	18	0,465*
gr 2+3	56	9	65	
pT<1,2 cm	40	10	50	1,79; 0,181
pT>1,2 cm	30	3	33	
bojenje DA	70	0		
bojenje NE	0	13		

* Fisherov egzaktni test P vrijednost

TIL - tumor-infiltrirajući limfociti; rak-testis antigeni - multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1, NY-ESO-1; ER i PR - steroidni receptori; R1 - pozitivni kirurški rub; P - vjerojatnost

Tablica 7. Raspodjela antigena MAGE-A1 u tumoru prema prognostičkim i prediktivnim čimbenicima

PARAMETRI	MAGE-A1		UKUPNO	Fisherov egzaktni test P vrijednost	Omjer izgleda (95% interval pouzdanosti)*
	Poz.77	Neg.6			
			83		
ER+	54	5	59	0,667	
ER-	23	1	24		
PR+	48	4	52	0,998	
PR-	29	2	31		
Centralna nekroza +	29	5	34	0,04	8,3 0,98-74,4
Centralna nekroza-	48	1	49		
R1 +	41	3	44	0,998	
R1-	36	3	39		
TIL +	41	4	45	0,683	
TIL-	36	2	38		
gr 1	15	3	18	0,113	
gr 2+3	62	3	65		
pT<1,2 cm	47	3	50	0,378	
pT>1,2 cm	30	3	33		
bojenje DA	77	0			
bojenje NE	0	6			

TIL - tumor-infiltrirajući limfociti; rak-testis antigeni - multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1, NY-ESO-1; ER i PR - steroidni receptori; R1 - pozitivni kirurški rub; P - vjerojatnost

Tablica 8. Raspodjela antigena MAGE-A 10 u tumoru prema prognostičkim i prediktivnim čimbenicima

PARAMETRI	MAGE-A10		UKUPNO	Pearson χ^2 ; P vrijednost (broj stupnjeva slobode = 1)
	Poz.41	Neg.42		
			83	
ER+	27	32	59	1,08;
ER-	14	10	24	0,299
PR+	22	30	52	2,8;
PR-	19	12	31	0,094
Centralna nekroza +	13	21	34	2,87;
Centralna nekroza-	28	21	49	0,09
R1 +	23	21	44	0,31;
R1-	18	21	39	0,578
TIL +	27	18	45	3,47;
TIL -	23	15	38	0,062
gr 1	7	11	18	1,02;
gr 2+3	34	31	65	0,313
pT<1,2 cm	26	24	50	0,34;
pT>1,2 cm	15	18	33	0,56
bojenje DA	41	0		
bojenje NE	0	42		

TIL - tumor-infiltrirajući limfociti; rak-testis antigeni - multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1, NY-ESO-1; ER i PR - steroidni receptori; R1 - pozitivni kirurški rub; P - vjerojatnost

Tablica 9. Raspodjela antigena NY-ESO-1 u tumoru prema prognostičkim i prediktivnim čimbenicima

PARAMETRI	NY-ESO-1		UKUPNO	Pearson χ^2 ; P vrijednost (broj stupnjeva slobode = 1)
	Poz.62	Neg.21		
			83	
ER+	44	15	59	0,01; 0,999
ER-	18	6	24	
PR+	40	12	52	0,36; 0,549
PR-	22	9	31	
Centralna nekroza +	26	8	34	0,10; 0,752
Centralna nekroza-	36	13	49	
R1 +	32	12	44	0,19; 0,663
R1-	30	9	39	
TIL +	32	13	45	0,67; 0,413
TIL -	30	8	38	
gr 1	15	3	18	0,384*
gr 2+3	47	18	65	
pT<1,2 cm	36	14	50	0,48; 0,488
pT>1,2 cm	26	7	33	
bojenje DA	62	0		
bojenje NE	0	21		

* Fisherov egzaktni test P vrijednost

TIL - tumor-infiltrirajući limfociti; rak-testis antigeni - multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1, NY-ESO-1; ER i PR - steroidni receptori; R1 - pozitivni kirurški rub; P - vjerojatnost

Za analizu ovisnosti između pojedinih tumorskih obilježja dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke (veličina tumora, gradus, centralna nekroza, limfocitna infiltracija, izraženost steroidnih receptora, R1, bojenje citoplazme, bojenje jezgre, bojenje citoplazme i jezgre, sveukupno bojenje i lokalni recidiv) i rak-testis antigena iz skupine MAGE-A (multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1) i NY-ESO-1 korišten je Pearsonov hi-kvadrat test i Fisherov egzaktan test. Procjena snage povezanosti prikazana je kao omjer izgleda (engl. *odds ratio*, OR) s pripadajućim 95% intervalom pouzdanosti (engl. *confidence interval*).

Statistička analiza je pokazala statistički signifikantnu povezanost između izraženosti MAGE-A1 antigena u tumoru i bolesnica kod kojih nije bila prisutna centralna nekroza. Veći je udio MAGE-A1 pozitivnih bolesnica u skupini centralna nekroza negativnih nego u skupini centralna nekroza pozitivnih (Fisher egzakt test $P = 0,04$). Od 34 bolesnice koje su imale prisutnu centralnu nekrozu u tumoru njih 29 je MAGE-A1 pozitivno, dok je od 49 bolesnica bez prisutnosti centralne nekroze u tumoru njih 48 MAGE-A1 pozitivno. Kod izračuna omjera izgleda donja granica kod 95% intervala pouzdanosti je neznatno niža od 1, no izgled da su centralna-nekroza negativni pozitivni na antigen MAGE-A1 u promatranoj populaciji može biti 74,4 puta viši (OR = 8,28 (CI95% 0,92 – 74,4)). Za neke promatrane varijable P vrijednost je granična, npr. izraženost antigena MAGE-A10 kod bolesnica koje su u tumore imale verificiranu prisutnost TIL-a ($P = 0,062$) što upućuje na mali uzorak.

Tablica 10. Raspodjela mjerenih parametara s obzirom na obrazac bojenja- bojenje citoplazme

Parametri	N=83 (100%)	Bojenje citoplazme			
		Neg	Poz	Pearson χ^2 ; P vrijednost (broj stupnjeva slobode = 1)	Omjer izgleda (95% interval pouzdanosti)
Veličina tumora					
< 1,2 cm	50 (60)	14 (28)	36 (72)	1,85	
> 1,2 cm	33 (40)	14 (42)	19 (58)	0,174	
Gradus					
1	18 (22)	6 (33)	12 (67)	0,999	
2+3	65 (78)	22 (34)	43 (66)	0,968	
Cent. nekroza					
Ne	34 (41)	8 (24)	26 (76)	2,68	
Da	49 (59)	20 (41)	29 (59)	0,101	
TIL					
Ne	45 (54)	12 (27)	33 (73)	2,2	
Da	38 (46)	16 (42)	22 (58)	0,138	
ER					
Ne	24 (29)	13 (54)	11 (46)	6,3	3,4
Da	59 (71)	15 (25)	44 (75)	0,012	1,3-9,4
PR					
Ne	31 (37)	15(48)	16 (52)	4,75	2,8
Da	52 (63)	13 (25)	39 (75)	0,029	1,1-7,2
R1					
Ne	39 (47)	9 (23)	30 (77)	3,74	2,5
Da	44 (53)	19 (43)	25 (57)	0,053	0,98-6,6
Lokalni rec.					
Ne	76 (92)	24 (32)	52(68)		
Da	7 (8)	4 (57)	3 (43)	*0,219	

* Fisherov egzaktni test P vrijednost

TIL - tumor-infiltrirajući limfociti; rak-testis antigeni - multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1, NY-ESO-1; ER and PR - steroidni receptori; R1- pozitivni kirurški rub

Tablica 11. Raspodjela mjerenih parametara s obzirom na obrazac bojenja- bojenje jezgre

Parametri	N=83 (100%)	Bojenje jezgre		
		Neg	Poz	Pearson χ^2 ; P vrijednost (broj stupnjeva slobode = 1)
Veličina tumora				
< 1,2 cm	50 (60)	47 (94)	3 (6)	*0,255
> 1,2 cm	33 (40)	28 (85)	5 (15)	
Gradus				
1	18 (22)	15 (83)	3 (17)	*0,362
2+3	65 (78)	60 (92)	5 (8)	
Cent. nekroza				
Ne	34 (41)	31 (91)	3 (9)	*0,998
Da	49 (59)	44 (90)	5 (10)	
TIL				
Ne	45 (54)	40 (89)	5 (11)	*0,721
Da	38 (46)	35 (92)	3 (8)	
ER				
Ne	24 (29)	22 (92)	2 (8)	*0,998
Da	59 (71)	53 (90)	6 (10)	
PR				
Ne	31 (37)	29 (93)	2 (7)	*0,704
Da	52 (63)	46 (88)	6 (12)	
R1				
Ne	39 (47)	36 (92)	3 (8)	*0,717
Da	44 (53)	39 (89)	5 (11)	
Lokalni rec.				
Ne	76 (92)	68 (89)	8 (11)	*0,612
Da	7 (8)	7 (100)	0 (0)	

* Fisherov egzaktni test P vrijednost

TIL - tumor-infiltrirajući limfociti; rak-testis antigeni - multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1, NY-ESO-1; ER and PR - steroidni receptori; R1- pozitivni kirurški rub

Tablica 12. Raspodjela mjerenih parametara s obzirom na obrazac bojenja- bojenje citoplazme i jezgre

Parametri	N=83 (100%)	Bojenje citoplazme i jezgre			
		Neg	Poz	Pearson χ^2 ; P vrijednost (broj stupnjeva slobode = 1)	Omjer izgleda (95% interval pouzdanosti)
Veličina tumora	50 (60)	42 (84)	8 (16)	0,546	
< 1,2 cm	33 (40)	26 (79)	7 (21)	0,36	
> 1,2 cm					
Gradus					
1	18 (22)	17 (94)	1 (6)	* 0,172	
2+3	65 (78)	51 (78)	14 (22)		
Cent. nekroza					
Ne	34 (41)	32 (94)	2 (6)	5,78	5,8
Da	49 (59)	36 (74)	13 (26)	0,016	1,2-27,6
TIL					
Ne	45 (54)	40 (89)	5 (11)	3,22	
Da	38 (46)	28 (74)	10 (26)	0,073	
ER					
Ne	24 (29)	15 (62)	9 (38)	*0,006	5,3
Da	59 (71)	53 (90)	6 (10)		1,6-17,3
PR					
Ne	31 (37)	21(68)	10 (32)	6,73	4,5
Da	52 (63)	47 (90)	5 (10)	0,010	1,4-14,7
R1					
Ne	39 (47)	35 (90)	4 (10)	3,04	
Da	44 (53)	33 (75)	11 (25)	0,081	
Lokalni rec.					
Ne	76 (92)	65 (85)	11(15)	*0,018	7,9
Da	7 (8)	3 (43)	4 (57)	0,005	1,5-40,2

* Fisherov egzaktni test P vrijednost

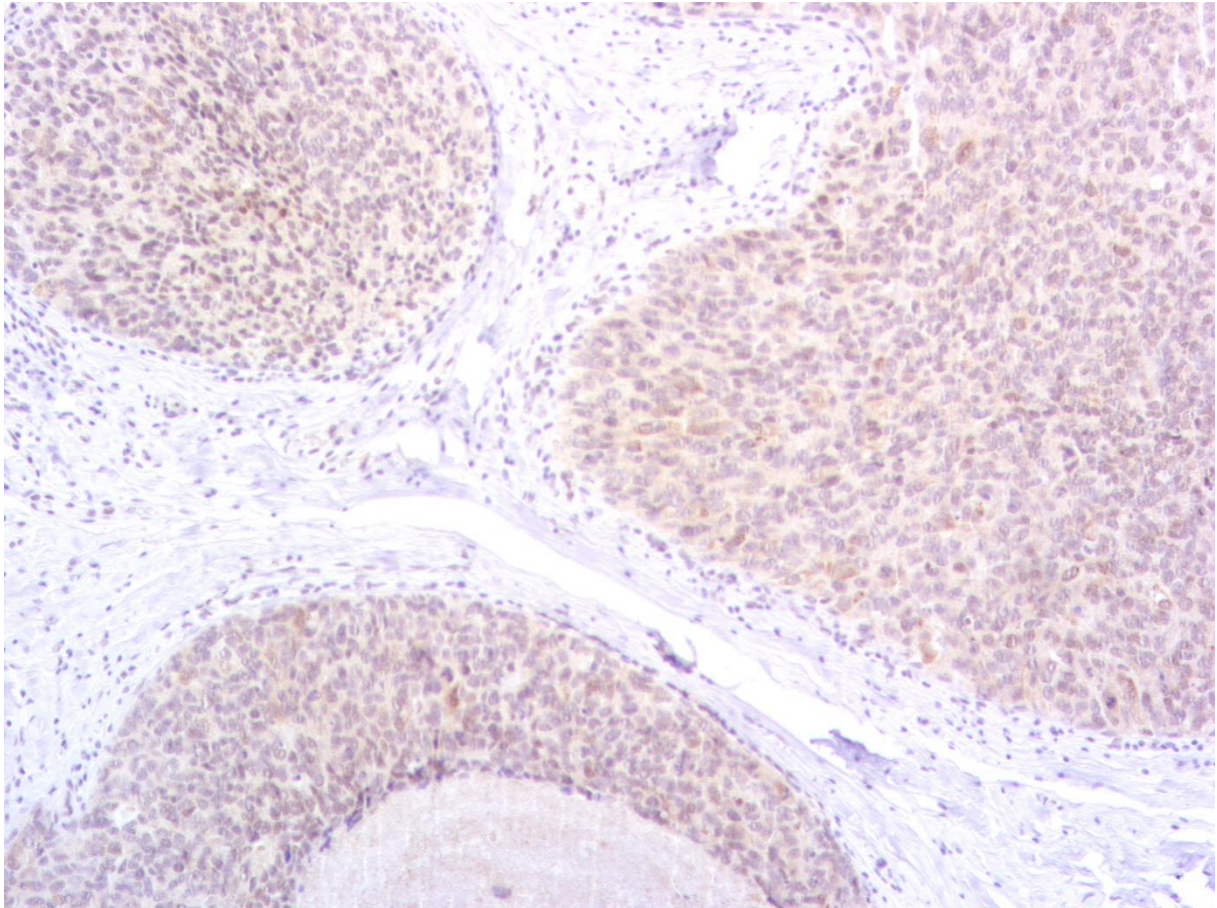
TIL - tumor-infiltrirajući limfociti; rak-testis antigeni - multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1, NY-ESO-1; ER and PR - steroidni receptori; R1- pozitivni kirurški rub

U Tablicama 10.,11. i 12. prikazana je raspodjela mjerenih parametara u odnosu na obrazac bojenja u tumoru (bojenje citoplazme, jezgre te citoplazme i jezgre) koji su pokazali antigeni iz skupine MAGE-A (multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1) i NY-ESO-1 .

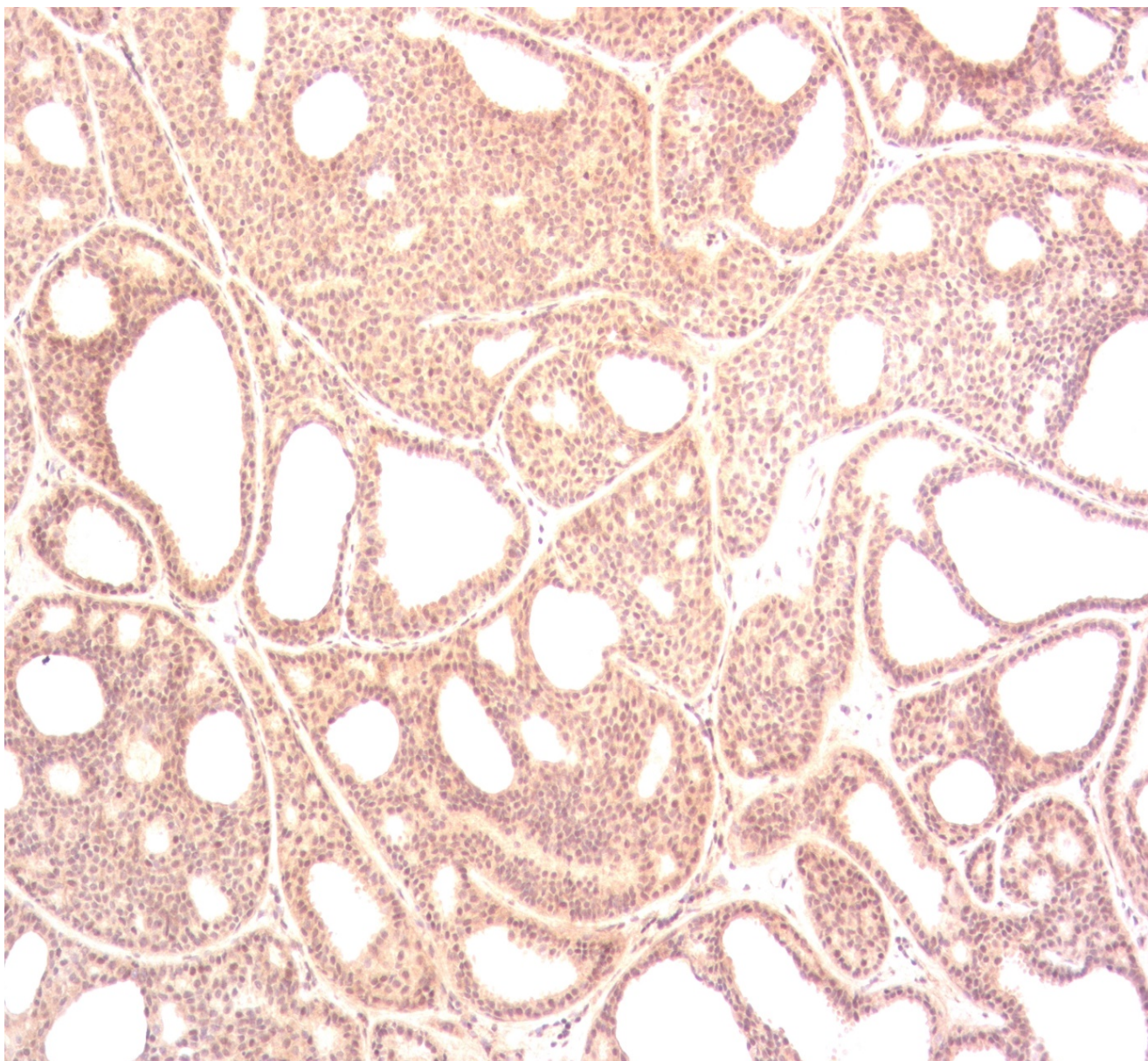
Statističkom analizom dobivenih rezultata nađeno je da je bojenje citoplazme statistički signifikantno povezano s izraženosti estrogenskih ($P=0,012$) i progesteronskih receptora ($P=0,029$). Omjer izgleda za povezanost izraženosti estrogen pozitivnih receptora i bojenja citoplazme je 3,4 puta veći u promatranoj skupini s intervalom pouzdanosti (CI95% 1,3 – 9,4), a progesteronskih receptora 2,8 puta veći s intervalom pouzdanosti (CI95% 1,1-7,2).

Simultano bojenje citoplazme i jezgre je statistički signifikantno povezano s prisutnošću lokalnog recidiva ($P=0,005$), izraženosti estrogenskih ($P=0,006$) i progesteronskih receptora ($P=0,010$) te centralnom nekrozom ($P=0,016$). Omjer izgleda za povezanost tumora s pozitivnom centralnom nekrozom i simultanog bojenja citoplazme i jezgre s promatranim antigenima je 5,8 puta veći u promatranoj skupini s intervalom pouzdanosti (CI95% 1,2-27,6). Omjer izgleda za povezanost estrogen negativnih tumora i simultanog bojenja citoplazme i jezgre je 5,3 puta veći s intervalom pouzdanosti (CI95% 1,6-17,3), progesteron negativnih tumora 4,5 puta veći s intervalom pouzdanosti (CI95% 1,4-14,7) te prisutnošću lokalnog recidiva 7,9 puta veći s intervalom pouzdanosti (CI95% 1,5-40,2).

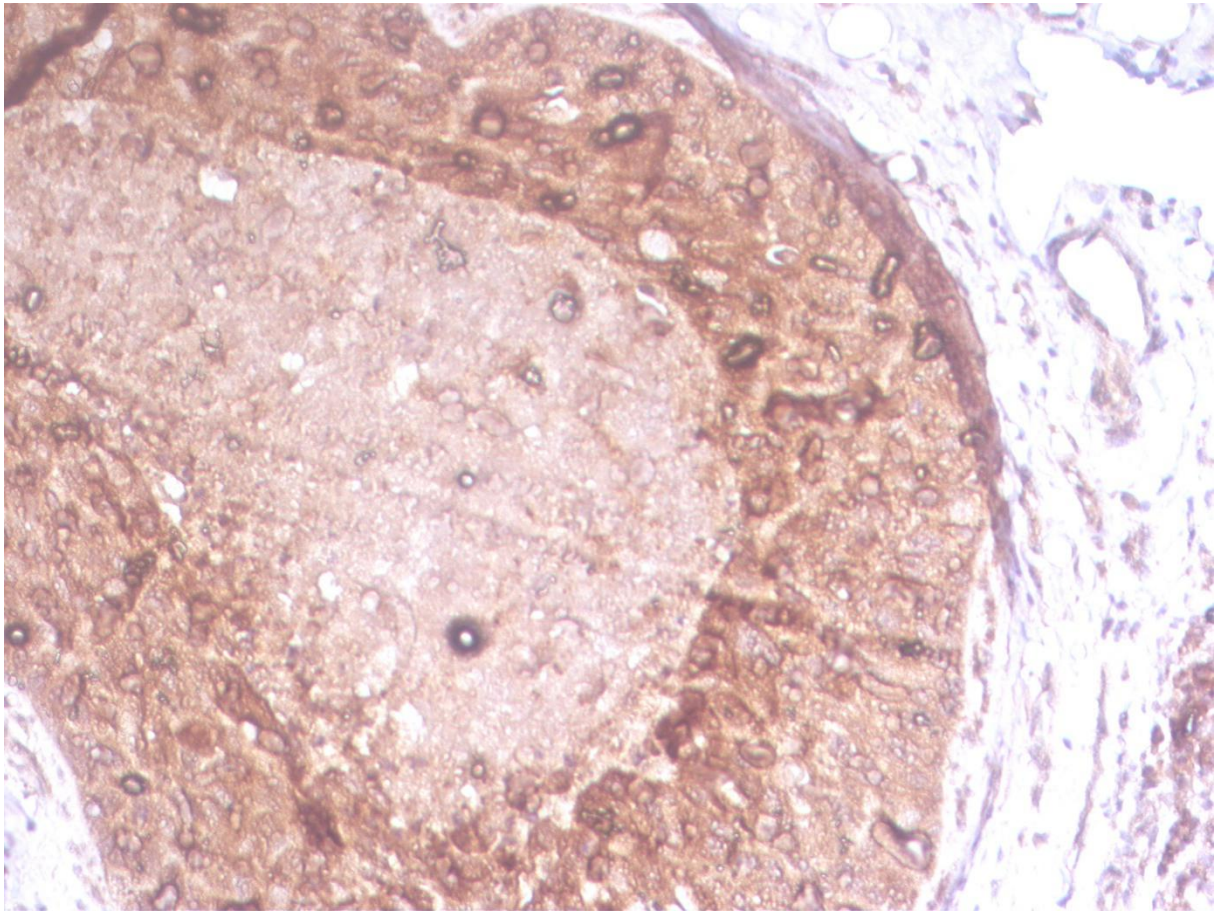
Na Slikama 6, 7 i 8 prikazane su reakcije u tumorskim stanicama na antigene multi-MAGE-A, NY-ESO-1 i MAGE-A1.



Slika 6. Izrazito jaka reakcija u citoplazmi i jezgrama tumorskih stanica na antigen multi-MAGE-A (IMH 10x)



Slika 7. Izrazito jaka reakcija u citoplazmi tumorskih stanica na antigen NY-ESO-1 (IMH 10x)



Slika 8. Izrazito jaka pozitivna citoplazmatska reakcija u tumorskim stanicama na MAGE-A1 (IMH 20x)

Tablica 13. Povezanost TIL-a (tumor-infiltrirajućih limfocita) i patohistoloških prediktivnih čimbenika za DCIS.

Parametri	N=83 (100%)	TIL			
		Neg	Poz	Pearson χ^2 ; P vrijednost (broj stupnjeva slobode = 1)	Omjer izgleda (95% interval pouzdanosti)*
Veličina tumora					
< 1,2 cm	50 (60)	26 (52)	24 (48)	0,25	
> 1,2 cm	33 (40)	19 (58)	14 (42)	0,618	
Gradus					
1	18 (22)	14 (78)	4 (22)	5,14	3,8
2+3	65 (78)	31 (48)	34 (52)	0,023	1,1-12,9
Cen. nekroza					
Ne	34 (41)	28 (82)	6 (18)	18,27	8,8
Da	49 (59)	17 (35)	32 (65)	<0,001	3-25,4
ER					
Ne	24 (29)	7(29)	17 (71)	8,54	4,4
Da	59 (71)	38 (64)	21 (36)	0,003	1,6-12,3
PR					
Ne	31 (37)	12(39)	19 (61)	4,79	2,7
Da	52 (63)	33 (64)	19 (36)	0,029	1,1-6,9
R1					
Ne	39 (47)	23 (59)	16 (41)	0,413	0,698
Da	44 (53)	22 (50)	22 (50)		
Lokalni rec.					
Ne	76 (92)	42 (55)	34 (55)	0,528	
Da	7 (8)	3 (43)	4 (57)		

TIL- tumor infiltrirajući limfociti; rak/testis antigeni- multi-MAGE-A, MAGE-A10, MAGE-A1, NY-ESO-1; ER and PR-steroidni receptori; R1- pozitivna kirurška margina.

U Tablici 13 prikazani su rezultati analize odnosa između tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) i patohistoloških prediktivnih čimbenika za DCIS.

Prisutnost tumor-infiltrirajući limfociti (TIL) statistički signifikantno je jače izražena kod tumora većeg gradusa ($P=0,023$), tumora s centralnom nekrozom ($P<0,001$) te kod tumora s negativnim ER i PR receptora ($P=0,003$, $P=0,029$). Prema rezultatima ove analize kod tumora s negativnim prognostičkim i prediktivnim čimbenicima tumor-infiltrirajući limfociti su više zastupljeni.

6. Rasprava

Duktalni neinvazivni karcinom dojke (DCIS) je neobvezni prekursor invazivnog karcinoma dojke, a ako se ne liječi, čak u 40% slučajeva prelazi u invazivni karcinom. Posljednjih tridesetak godina u svijetu je zamijećen porast u incidenciji neinvazivnog dukalnog karcinoma dojke. Kako je bolest dosta heterogena kliničaru je teško donijeti odluku o modalitetu liječenja. Unatoč brojnim istraživanjima, još nije nađen jedinstveni marker koji bi definirao obilježja onog dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke koji ima veću vjerojatnost prelaska u invazivni oblik, a koji bi onda i zbog svega navedenog zahtijevao intenzivniji, tj. agresivniji pristup u liječenju.

Rak-testis antigeni su jedna od najispitivanijih skupina tumorskih antigena danas. Metoda koja se najčešće koristi za određivanje izraženosti tih antigena je metoda lančane reakcije polimeraze (engl. reverse transcriptase-polymerase chain reaction- RT-PCR) (117). Njezin je nedostatak u tome što ne omogućuje kvantifikaciju karcinomskih stanica koje izražavaju navedene antigene, a ti podatci su izuzetno bitni za imunoterapijske kliničke studije (117). Osim te metode često se koristi i imunohistokemijska metoda čije su prednosti jednostavnost i niža cijena kao i mogućnost korištenja arhivskog tumorskog materijala, što omogućuje provođenje retrospektivnih istraživanja. Pokazano je da su rezultati dobiveni imunohistokemijskom metodom u korelaciji s mRNA izraženosti istih antigena (105,143,144). Neki autori su čak dokazali da tumori kod kojih je izraženost tih antigena bila negativna RT-PCR metodom imaju pozitivnu reakciju na rak-testis antigene imunohistokemijskom metodom (145).

Brojna istraživanja koja su provedena od otkrića prvog tumorskog antigena 1991. godine uputila su na relevantnost izraženosti rak-testis antigena u različitim karcinomima, pa tako i u karcinomima dojke (93,97,98,105,143,146). Analiza izraženosti rak-testis antigena u molekularnim podtipovima raka dojke pokazala je povećanu izraženost antigena iz skupine MAGE-A i NY-ESO-1 antigena u estrogen negativnoj skupini tumora (ER-), a posebno kod trostruko negativnih karcinomima dojke (98,145,148). Dodatnom analizom dokazana je i povezanost između gradusa jezgre i izraženosti rak-testis antigena, tj. tumori većeg gradusa učestalije izražavaju rak-testis antigene (118,147).

U istraživanju Badovinac i sur. (149) dokazana je povećana izraženost rak-testis antigena MAGE-A1, multi-MAGE-A, NY-ESO-1 i MAGE-A10 u trostruko-negativnom karcinomu dojke. Istražena je i povezanost izraženosti navedenih antigena s patohistološkim prognostičkim i prediktivnim čimbenicima trostruko negativnog karcinoma dojke. Dokazano je da je izraženost antigena MAGE-A10 u signifikantnoj korelaciji s veličinom tumora, a izraženost MAGE-A1, multi-MAGE-A i MAGE-A10 s kliničkim stadijem bolesti. Nije bilo signifikantne korelacije između izraženosti rak-testis antigena i ukupnog preživljenja pacijentica.

Novija istraživanja koja razmatraju biološku funkciju i ulogu NY-ESO-1 antigena u invazivnom karcinomu dojke govore sve više u prilog “zaštitnoj funkciji” tog antigena, tj. boljoj prognozi onih pacijentica kod kojih je taj antigen izražen (150).

U prilog tome govori i istraživanje Lee HJ i sur. (151) čiji rezultati upućuju na to da je izraženost antigena NY-ESO-1 specifično vezana za trostruko negativni karcinom dojke te da je njegova izraženost nezavisan dobar prognostički čimbenik trostruko negativnog invazivnog karcinoma dojke. Naime, kod pacijentica koje su imale izražen NY-ESO-1 antigen nađena je signifikantna pozitivna korelacija s visokim postotkom tumor- infiltrirajućih limfocita (TIL). Analizom krivulja preživljenja došli su do rezultata da su niži postotak tumor-infiltrirajućih limfocita u stromi i nepostojanje izraženosti NY-ESO-1 antigena bili signifikantno povezani s lošijom prognozom pacijentica, tj. kraćim preživljenjem. No unatoč tome što su istraživanja izraženosti rak-testis antigena kod invazivnog karcinoma dojke u dostupnoj literaturi brojna, istraživanja izraženosti rak-testis antigena u duktalnom neinvazivnom karcinomu dojke zastupljena su u mnogo manjem broju.

U dostupnoj literaturi jedno od rijetkih istraživanja koje u analizu uključuje i duktalni neinvazivni karcinom dojke je istraživanje Adams i sur. (152). Imunohistokemijskom analizom materijala dokazana je povećana izraženost rak-testis antigena MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-C1, NY-ESO-1, MAGE-C2/CT 10 i GAGE u karcinomima dojke vezanim uz BRCA gene (BRCA 1 i 2). U istraživanje su bili uključeni različiti tipovi tumora dojke vezani uz BRCA gene pa su s obzirom na taj ulazni kriterij bile uključene i bolesnice s dijagnozom duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke. No u istraživanju rezultati izraženosti navedenih antigena nisu bili uspoređeni sa standardnim prognostičkim patohistološkim

čimbenicima (izraženost estrogenskih i progesteronskih receptora, gradus jezgre, veličina tumora, centralna nekroza i rub).

Istraživanje koje također analizira izraženost rak-testis antigena kod dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke je istraživanje Caballera i sur. (153) iz 2013. godine. U njemu je analizirana izraženost rak-testis antigena u dukalnom neinvazivnom karcinomu dojke i drugim benignim lezijama dojke. Analizirano je 40 uzoraka od kojih je većinu činio dukalni neinvazivni karcinom dojke (23 uzorka). Imunohistokemijskom analizom uzoraka dokazana je povećana izraženost nekih rak-testis antigena u dukalnom neinvazivnom karcinomu dojke. Antigeni NY-ESO 1 i antigen MAGE A3 bili su signifikantno izraženi u dukalnom neinvazivnom karcinomu dojke, uz napomenu da je MAGE A3 bio izražen isključivo u estrogen negativnoj skupini DCIS-a (ER-). Nađena je i granično pozitivna korelacija između pozitivne izraženosti MAGE A antigena i tumorske infiltracije (CD 8+). NY-ESO-1 antigen bio je izražen u dukalnom neinvazivnom karcinomu dojke, ali i u benignim proliferacijskim lezijama dojke.

Među najnovijim istraživanjima čiji su rezultati objavljeni prije nekoliko mjeseci je istraživanje Coombes i sur. (150). Ono je obuhvatilo ukupno 42 pacijenta s dijagnozom dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke koji su praćeni tijekom 10 i više godina. Imunohistokemijskom analizom istraživana je izraženost antigena NY-ESO-1 i MAGE-A. Utvrđeno je da je izraženost NY-ESO-1 antigena bila većinom zastupljena kod estrogen negativnog (ER-) dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke, a analizom Kaplan Meierove krivulje zaključeno je da upravo kod pacijenata koji su imali dokazanu izraženost NY-ESO 1 antigena nije nađen recidiv bolesti u razdoblju praćenja od 10 godina, za razliku od onih kod kojih je utvrđena izraženost MAGE-A antigena. Stoga, prema mišljenju autora, izraženost NY-ESO-1 antigena ima “zaštitnu ulogu” kod pacijenata s dukalnim neinvazivnim karcinomom dojke. NY-ESO-1 smatra se najimunogenijim rak-testis antigenom pa bi njegova izraženost posljedično mogla dovesti do ranog prepoznavanja karcinomskih stanica od strane imunskog sustava pacijenta i eliminacije stanica u ranom stadiju karcinogeneze. No s obzirom na to da je ovo mala studija, autori smatraju da su potrebne studije s mnogo većim brojem pacijenata koje bi potvrdile taj rezultat. Uzevši u obzir i činjenicu da je cjepivo bazirano na NY-ESO-1 pokazalo pozitivan učinak na aktivaciju limfocita T kao i na imunološki odgovor, prema mišljenju autora, to bi se cjepivo

moglo koristiti kao “boost” koji bi kod pacijenata s DCIS-om potpomogao aktivaciju i djelovanje limfocita T, a na taj način i eliminaciju tumorskih stanica (126,150,154-156).

U vlastitom istraživanju analizirane su 83 bolesnice s DCIS-om u kojih je istraživana izraženost proteina iz skupine MAGE-A (multi-MAGE-A, MAGE-A1 i MAGE-A10) i NY-ESO-1 te njihova povezanost s patohistološkim prognostičkim i prediktornim čimbenicima (izraženost estrogenskih i progesteronskih receptora, gradus jezgre, veličina tumora, centralna nekroza, udaljenost od kirurškoga ruba i limfocitna infiltracija). Naknadno je dodan i parametar lokalnog recidiva. Imunohistokemijska analiza istraživanog materijala pokazala je izraženost rak-testis antigena iz skupina MAGE-A (multi-MAGE-A, MAGE-A1, MAGE-A10) i NY-ESO-1 u duktalnom neinvazivnom karcinomu dojke. Prema ROC analizi, savršene su vrijednosti prijelomnih točaka bile za antigene NY-ESO-1 i MAGE-A10. Najviše su bili zastupljeni antigeni MAGE-A1, 77 bolesnica (93%), i multi-MAGE-A kod 70 bolesnica (84%). Ostali rak-testis antigeni bili su zastupljeni u manjem broju, MAGE-A10 kod 41 bolesnice (49%), a NY-ESO-1 kod 62 bolesnice (73%). U ovom istraživanju su uočena i tri različita “načina” izraženosti rak-testis antigena: citoplazmatska izraženost (manifestira se kao bojenje citoplazme), nuklearna izraženost (manifestira se kao bojenje jezgre) te simultana citoplazmatska i nuklearna izraženost (manifestira se kao simultano bojenje citoplazme i jezgre).

Analiza odnosa između rak-testis antigena iz skupine MAGE A (MAGE-A10, multi-MAGE-A, MAGE-A1) i NY-ESO-1 i prediktivnih i prognostičkih čimbenika duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke nije pokazala statistički signifikantne vrijednosti za većinu promatranih odnosa. Antigen MAGE-A-1 je statistički signifikantno povezan s centralnom nekrozom, tj. bio je više izražen kod bolesnica koje nisu imale prisutnu centralnu nekrozu u tumoru.

Kao i u istraživanju Coombsa i sur. (150) prema statističkoj analizi podataka može se zaključiti da je antigen NY-ESO-1 bio prisutan u većem postotku kod tumora s prisutnošću TIL-a. Moguće tumačenje „zaštitne uloge“ ovog antigena i duljeg preživljenja pacijentica leži u tome što kod duktalnog neinvazivnog karcinoma kod kojeg postoji izraženost NY-ESO-1 rak/testis

nije prisutna centralna nekroza što svakako spada u prognostički lošije patohistološke čimbenike koji su povezani s lošijim preživljenjem pacijentica (154-156).

Analiza odnosa prediktivnih i prognostičkih čimbenika s bojenjem, tj. načinom izraženosti rak-testis antigena u tumorskim stanicama duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke, pokazala je statistički signifikantnu vezu lokalnog recidiva i simultanog (istodobnog) bojenja citoplazme i jezgre ($P=0,005$). Istodobno bojenje citoplazme i jezgre također je statistički signifikantno povezano s prisutnošću centralne nekroze u tumoru ($P=0,016$) te s tumorima u kojima nisu bili izraženi ER i PR receptori ($P=0,003$ i $P=0,009$). Laban i sur. (157) su u radu iz 2014., analizirajući izraženost rak-testis antigena iz skupine MAGE-A i NY-ESO-1 kod bolesnika s pločastim tumorima glave i vrata, dokazali da je simultana izraženost rak-testis antigena u jezgri i citoplazmi nezavisni prediktor lošijeg preživljenja kod analizirane skupine bolesnika.

Dodatna analiza odnosa između prediktivnih i prognostičkih čimbenika za DCIS i tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL) pokazala je statistički signifikantan odnos između TIL-ova i gradusa, centralne nekroze i izraženosti ER i PR receptora. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima prethodnih studija (136) u kojima je također dokazana veća izraženost TIL-ova u ER negativnoj (ER-) skupini tumora.

7. Zaključci

Na temelju ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Proteini iz skupine MAGE-A (multi-MAGE-A, MAGE-A1, MAGE-A10) i NY-ESO-1 izraženi su u duktalnom neinvazivnom karcinomu dojke. Antigen MAGE-A1 bio je izražen kod najvećeg broja bolesnica, 77 bolesnica (93%), a multi-MAGE-A kod 70 bolesnica (84%). Ostali rak-testis antigeni su bili zastupljeni u manjem broju, antigen NY-ESO-1 kod 62 bolesnice (73%), a MAGE-A10 kod 41 bolesnice (49%).
2. Statističkom analizom dobivenih rezultata nađena je statistički signifikantna povezanost između istraživanih antigena iz skupine MAGE-A (multi-MAGE-A, MAGE-A1, MAGE-A10) i NY-ESO-1 i patohistoloških prognostičkih i prediktivnih čimbenika duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke.
3. U istraživanom materijalu utvrđeno je postojanje limfocitne infiltracije TIL-ova, koji su definirani kao postoji/ne postoji.
4. Dodatna analiza povezanosti između TIL-ova i prognostičkih i prediktivnih čimbenika za DCIS pokazala je statistički signifikantnu povezanost između TIL-ova i centralne nekroze ($P < 0,001$), gradusa ($P = 0,023$) te izraženosti estrogenskih i progesteronskih receptora ($P = 0,003$, $P = 0,029$). Ukupnom analizom dobivenih rezultata i rezultata prethodnih istraživanja može se zaključiti da bi TIL-ovi mogli imati zaštitnu "protektivnu ulogu" kod duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke s lošijim patohistološkim prediktivnim i prognostičkim čimbenicima.
5. Dodatnom analizom parametra lokalnog recidiva (naknadno dodan) i načina izraženosti promatranih rak-testis antigena u duktalnom neinvazivnom karcinomu dojke (bojenje citoplazme, bojenje jezgre, simultano bojenje jezgre i citoplazme) može se zaključiti da je istodobno bojenje jezgre i citoplazme neovisan prediktor lokalnog povrata bolesti ($P = 0,005$). Dodatna analiza je pokazala da je lokalni recidiv statistički signifikantno u

vezi s centralnom nekrozom ($P=0,016$) te izraženosti ER receptora ($P=0,003$) i PR receptora ($P=0,010$)

Dakle, na temelju vlastitog istraživanja može se zaključiti da rak-testis antigeni iz skupine MAGE-A (multi-MAGE-A, MAGE-A1, MAGE-A10) i NY-ESO-1 nisu savršeni pokazatelji invazivnosti dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke, ali u kombinaciji s drugim prediktivnim i prognostičkim čimbenicima mogu biti putokaz u odabiru načina liječenja bolesnica s tom dijagnozom.

Istodobno bojenje citoplazme i jezgre neovisni je prediktor lokalnog povrata bolesti, no s obzirom na to da se radi o maloj studiji, potrebna je dodatna analiza veće kohortne skupine.

S obzirom na navedene rezultate rak-testis antigeni MAGE-A10 i NY-ESO-1 mogli bi biti nove mete za razvoj novih strategija u liječenju dukalnog neinvazivnog karcinoma dojke, no kako se radi o analizi male skupine bolesnica potrebna su veća istraživanja koja će potvrditi dobivene rezultat.

8. SAŽETAK

Rak-testis antigeni su velika porodica tumorskih antigena, koji su izraženi u različitim vrstama tumora, a u normalnom tkivu nalaze se samo u stanicama testisa, spermatognijama i spermatocitima (engl. cancer/testis antigens; C/T) i na stanicama tkiva posteljice (trofoblasti). Brojna istraživanja koja su se bavila analizom izraženosti rak-testis antigena u invazivnom karcinomu dojke pokazala su da je njihova izraženost znatno veća u visokog histološkog gradusa. No izraženost rak-testis antigena u duktalnom neinvazivnom karcinomu dojke (DCIS) nedovoljno je istražena. U ovom retrospektivnom istraživanju analizirana je izraženost rak-testis antigena iz skupine MAGE-A (MAGE-A1, MAGE-A10 i multi-MAGE-A) i NY-ESO-1 kod 83 bolesnice s dijagnozom duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke. Sve analizirane bolesnice liječene su na Institutu za tumore (KBCSM) u razdoblju od 2007. - 2014. godine. Kod svih bolesnica je učinjen poštedni kirurški zahvat (lumpektomija, segmentektomija) te je kod svih provedena radioterapija, a endokrinu terapiju su primale one bolesnice koje su imale pozitivne ER i/ili PR receptore. Pacijentice su praćene između 1 - 8 godina (srednja vrijednost 5.02. godine). Imunohistokemijskom metodom analizirana je izraženost rak-testis antigena u materijalu, a uz to i njihov odnos s prediktivnim i prognostičkim čimbenicima duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke (izraženost estrogenskih i progesteronskih receptora, gradus jezgre, veličina tumora, središnja nekroza i udaljenost od kirurškoga ruba). Također je analizirana i prisutnost tumor-infiltrirajućih limfocita u materijalu (TIL). Statistička analiza podataka pokazala je postojanje statistički signifikantne veze između izraženosti promatranih rak-testis antigena te patohistoloških prediktivnih i prognostičkih čimbenika za DCIS. Dodatna analiza izraženosti TIL-ova pokazala je statistički signifikantnu pozitivnu korelaciju s gradusom, centralnom nekrozom te negativnu statistički signifikantnu korelaciju s izraženosti ER i PR receptora, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima. Analizirana je i povezanost načina izraženosti promatranih rak-testis antigena u duktalnom neinvazivnom karcinomu dojke (bojenje citoplazme, bojenje jezgre, simultano bojenje jezgre i citoplazme) s patohistološkim i prediktivnim čimbenicima duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke te lokalnim recidivom. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je istodobno bojenje jezgre i citoplazme neovisan prediktor lokalnog povrata bolesti S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da rak-testis antigeni nisu savršeni pokazatelji invazivnosti duktalnog neinvazivnog karcinoma dojke,

ali u kombinaciji s drugim prediktivnim i prognostičkim čimbenicima mogu biti putokaz u odabiru načina liječenja bolesnica s tom dijagnozom.

9. SUMMARY

Immunohistochemical analysis of cancer/testis antigens in noninvasive ductal breast cancer

Cancer/testis antigens (CTAs) are a large family of tumor-associated antigens expressed in human tumors of different histological origin, but not in normal tissues, with the exception of the testes and placenta. Numerous immunohistochemical studies have reported associations between CTA expression and a negative estrogen receptor (ER) status in breast tumors and demonstrated that CTAs are frequently expressed in tumors with higher nuclear grade. The expression of CTAs has not been studied as extensively in ductal carcinoma in situ (DCIS) as it has been in invasive breast cancer. The present retrospective study included archived paraffin-embedded specimens from 83 patients diagnosed with DCIS in the period between January 2007 and December 2014. The follow-up time for local recurrence ranged between 1 and 8 years (mean, 5.02 years). Antigens from the melanoma-associated antigen gene (MAGE) family, namely multi-MAGE-A, MAGE-A1, MAGE-A10 and New York esophageal squamous cell carcinoma 1 (NY-ESO-1) antigen, were evaluated by immunostaining and their subcellular location was investigated. Presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) was evaluated on all sections, together with the histopathological variables of DCIS. Specific tested antigens exhibited associations with histopathological parameters for DCIS and all demonstrated statistically significant associations with nuclear staining, simultaneous cytoplasmic and nuclear staining, and local recurrence. Additional analysis of TILs indicated that they were significantly associated with tumor grade ($P=0.023$), central necrosis ($P<0.001$), ER ($r=-0.322$, $p=0.003$) and PR ($r=-0.285$, $p=0.009$). Overall, CTAs from the MAGE family (MAGE-A1, multi-MAGE-A and MAGE-A10) and NY-ESO-1 associate with histopathological predictive variables of DCIS. The expression of antigens NY-ESO-1 and MAGE-A10 could serve an important role in the treatment of patients with negative histopathological predictive variables, but further analysis is required. Simultaneous cytoplasmic and nuclear protein expression of MAGE-A family and NY-ESO-1 CTAs may represent an independent marker for local recurrence. Taken together, the present data suggest that CTAs are not perfect indicators of invasiveness for DCIS but could inform treatment strategies for patients when taken in

combination with other histopathological predictive variables. However, this was a small study and further larger studies will be necessary to confirm the current findings.

10. Literatura

1. Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchió C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: Molecular features and progression pathways. *Histopathology*. 2010; 57(2):171–92.
2. Virnig BA, Tuttle TM, Shamliyan T, Kane RL. Ductal carcinoma in Situ of the breast: A systematic review of incidence, treatment, and outcomes. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(3):170–8.
3. Joslyn SA. Ductal carcinoma in situ: Trends in geographic, temporal, and demographic patterns of care and survival. *Breast J*. 2006;12(1):20–7.
4. Kerlikowske K. Epidemiology of ductal carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2010;2010(41):139–41.
5. Ward EM, DeSantis CE, Lin CC, Jemal A, Kohler B, Brawley OW i sur. Cancer statistics: Breast cancer in situ. *Cancer J Clin* 2015;65(6):481–95.
6. Šekerija M. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2015. godini. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2015.
7. Pradier C, Cornuau M, Norca J, Mesbah H, Poree P, Body G i sur. Differences in breast carcinoma in situ between menopausal and premenopausal women. *Anticancer Res*. 2011;31(5):1783-8.
8. Bertrand KA, Tamimi RM, Scott CG, Jensen MR, Pankratz V, Visscher D i sur. Mammographic density and risk of breast cancer by age and tumor characteristics. *Breast cancer Res*. 2013;15(6):104.
9. Luo J, Cochrane BB, Wactawski-Wende J, Hunt JR, Ockene JK, Margolis KL. Effects of menopausal hormone therapy on ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;137(3):915–25.
10. Claus EB, Petruzella S, Matloff E, Carter D. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in women diagnosed with ductal carcinoma in situ. *JAMA*. 2005;293(8):964–9.

11. Puig-Vives M, Pollan M, Rue M, Osca-Gelis G, Saez M, Izquierdo A i sur. Rapid increase in incidence of breast ductal carcinoma in situ in Girona, Spain 1983-2007. *Breast*. 2012(5);21:646–51.
12. de Gelder R, Fracheboud J, Heijnsdijk EA, deen Heeten G, Verbeek AL, Broeders MJ i sur. Digital mammography screening: Weighing reduced mortality against increased overdiagnosis. *Prev Med*. 2011;53(3):134–40.
13. Yamada T, Mori N, Watanabe M, Kimijima I, Okumoto T, Seiji K i sur. Radiologic-pathologic correlation of ductal carcinoma in situ. *Radiographics*. 2010;30(5):1183–98.
14. Barreau B, de Mascarel I, Feuga C, MacGrogan G, Dilhuydy MH, Picot V i sur. Mammography of ductal carcinoma in situ of the breast: review of 909 cases with radiographic-pathologic correlations. *Eur J Radiol*. 2005;54(1):55–61.
15. Baur A, Bahrs SD, Speck S, Wietek BM, Kramer B, Vogel U i sur. Breast MRI of pure ductal carcinoma in situ: Sensitivity of diagnosis and influence of lesion characteristics. *Eur J Radiol*. 2013;82(10):1731–7.
16. Kuhl CK, Schrading S, Bieling HB, Wardelmann E, Leutner CC, Koenig R i sur. MRI for diagnosis of pure ductal carcinoma in situ: a prospective observational study. *Lancet*. 2007;370(9586):485–92.
17. Lallemand M, Barron M, Bingham J, Mosier A, Hardin M, Sohn V i sur. The true impact of breast magnetic resonance imaging on the management of in situ disease: more is not better. *Am J Surg*. 2017;213(1):127-131.
18. Shin HJ, Kim HH, Kim SM, Kwon GY, Gong G, Cho OK. Screening-detected and symptomatic ductal carcinoma in situ: Differences in the sonographic and pathologic features. *Am J Roentgenol*. 2008;190(2):516–25.
19. Lester SC, Bose S, Chen YY, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL i sur. Protocol for the examination of specimens from patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(1): 15-25.

20. Fadare O, Clement NF, Ghofrani M. High and intermediate grade ductal carcinoma in-situ of the breast: a comparison of pathologic features in core biopsies and excisions and an evaluation of core biopsy features that may predict a close or positive margin in the excision. *Diagn Pathol.* 2009;4:26.
21. Bane A. Ductal carcinoma in situ: what the pathologist needs to know and why. *Int J Breast Cancer* 2013;2013:914053.
22. Kawasaki T, Nakamura S, Sakamoto G, Murata S, Tsunoda-Shimizu H, Suzuki K i sur. Neuroendocrine ductal carcinoma in situ (NE-DCIS) of the breast-comparative clinicopathological study of 20 NE-DCIS cases and 274 non-NE-DCIS cases. *Histopathology.* 2008;53(3):288-98.
23. Fisher ER, Brown R. Intraductal signet ring carcinoma. A hitherto undescribed form of intraductal carcinoma of the breast. *Cancer.* 1985;55(11):2533–7.
24. Becker W. *Preneoplasia of the Breast: A New Conceptual Approach to Proliferative Disease.* Munich: Elsevier Saunders; 2006.
25. NHS Cancer Screening Programmes jointly with The Royal College of Pathologists. *Pathology reporting a breast disease: A Joint Document Incorporating the Third Edition of the NHS Breast Screening Programme's 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: NHSBSP Publications; 2005.
26. Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados MS. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer.* 1985;55(11):2698–708.
27. Ellis IO, Carder P, Hales S, AHS Lee, Pinder SE, Rakha E i sur. *Pathology Reporting of Breast Disease.* London: The Royal College of Pathologists; 2016.
28. Bianchi S, Vezzosi V. Microinvasive carcinoma of the breast. *Pathology and Oncology Research.* 2008;14(2):105–11.
29. Kanitakis J. Mammary and extramammary Paget's disease. *J Eur Acad Dermatol. Venereol.* 2007;21(5):581–90.

30. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: A retrospective of the last decade. *J Pathol.* 2010;220(2):263–80.
31. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 2009;360(8):790–800.
32. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H i sur. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869–74.
33. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A i sur. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8418–23.
34. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees C i sur. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747–52.
35. Perez A, Balabram D, Salles M de A, Gobbi H. Ductal carcinoma in situ of the breast: correlation between histopathological features and age of patients. *Diagn Pathol.* 2014;9:227.
36. Cheng L, Al-Kaisi NK, Gordon NH, Liu AY, Gebrail F, Shenk RR. Relationship Between the Size and Margin Status of Ductal Carcinoma In Situ of the Breast and Residual Disease. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:1356-60.
37. National Comprehensive Cancer Network (NCCN)[Internet]. Breast cancer (Version 3.2018); [ažurirano 25.10.2018.; pristupljeno 28.10.2018.]. Dostupno na:
[http:// https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf](http://https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf).
38. Lari SA, Kuerer HM. Biological markers in DCIS and risk of breast recurrence: A systematic review. *Journal of Cancer.* 2011;2:232–61.
39. Hanley K, Wang J, Bourne P, Yang Q, Gao AC, Lyman G i sur. Lack of expression of androgen receptor may play a critical role in transformation from in situ to invasive basal

subtype of high-grade ductal carcinoma of the breast. *Hum Pathol.* 2008;39(3):386–92.

40. Claus EB, Chu P, Howe CL, Davison TL, Stern DF, Carter D i sur. Pathobiologic findings in DCIS of the breast: morphologic features, angiogenesis, HER-2/neu and hormone receptors. *Exp Mol Pathol.* 2001;70(3):303–16.
41. Bijker N, Peterse JL, Duchateau L, Robanus-Maandag EC, Bosch C, Duval C i sur. Histological type and marker expression of the primary tumour compared with its local recurrence after breast-conserving therapy for ductal carcinoma in situ. *Br J Cancer.* 2001;84(4):539–44.
42. Lebrecht A, Buchmann J, Hefler L, Lampe D, Koelbl H. Histological category and expression of hormone receptors in ductal carcinoma in situ of the breast. *Anticancer Res.* 2002;22(3):1909–11.
43. Meijnen P, Peterse JL, Antonini N, Rutgers EJT, van de Vijver MJ. Immunohistochemical categorisation of ductal carcinoma in situ of the breast. *Br J Cancer.* 2008;98(1):137–42.
44. Altintas S, Lambein K, Huizing MT, Braems G, Asjoe FT, Hellemans H i sur. Prognostic significance of oncogenic markers in ductal carcinoma in situ of the breast: A clinicopathologic study. *Breast J.* 2009;15(2):120–32.
45. Latta EK, Tjan S, Parkes RK, O'Malley FP. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol.* 2002;15(12):1318–25.
46. Provenzano E, Hopper JL, Giles GG, Marr G, Venter DJ, Armes JE. Biological markers that predict clinical recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast. *Eur J Cancer.* 2003;39(5):622–30.
47. Albonico G, Querzoli P, Ferretti S, Rinaldi R, Nenci I. Biological profile of in situ breast cancer investigated by immunohistochemical technique. *Cancer Detect Prev.* 1998;22(4):313–8.

48. Wärnberg F, Nordgren H, Bergkvist L, Holmberg L. Tumour markers in breast carcinoma correlate with grade rather than with invasiveness. *Br J Cancer*. 2001;85(6):869–74.
49. Hieken TJ, Farolan M, D’Alessandro S, Velasco JM. Predicting the biologic behavior of ductal carcinoma in situ: an analysis of molecular markers. *Surgery*. 2001;130(4):593-600.
50. Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, Berman HK, Waldman F, Bennington J i sur. Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in situ diagnosis. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(9):627–37.
51. Barsky SH, Karlin NJ. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005;10(3): 249–60.
52. Gudjonsson T, Adriance MC, Sternlicht MD, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005;10(3):261–72.
53. Place AE, Jin Huh S, Polyak K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast cancer Res*. 2011;13(6):227.
54. Polyak K, Hu M. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005;10(3):231–47.
55. Cowell CF, Weigelt B, Sakr RA, Ng CK, Hicks J, King TA i sur. Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: Revisited. *Mol Oncol*. 2013;7(5):859–69.
56. Vincent-Salomon A, Lucchesi C, Gruel N, Raynal V, Pierron G, Goudefroye R i sur. Integrated genomic and transcriptomic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res*. 2008;14(7):1956–65.
57. Ma X-J, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P i sur. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5974–9.

58. Heselmeyer-Haddad K, Berroa Garcia LY, Bradley A, Ortiz-Melendez C, Lee WJ, Christensen R i sur. Single-cell genetic analysis of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer reveals enormous tumor heterogeneity yet conserved genomic imbalances and gain of MYC during progression. *Am J Pathol.* 2012;181(5):1807–22.
59. Silverstein MJ. The University of Southern California/Van Nuys prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Surg.* 2003;186(4):337–43.
60. Silverstein MJ, Lagios MD. Choosing treatment for patients with ductal carcinoma in situ: Fine tuning the University of Southern California/Van Nuys Prognostic Index. *J Natl Cancer Inst - Monogr.* 2010;(41):193–6.
61. Asjoe FT, Altintas S, Huizing MT, Colpaert C, Marck E Van, Vermorken JB i sur. The value of the Van Nuys prognostic index in ductal carcinoma in situ of the breast: A retrospective analysis. *Breast J.* 2007;13(4):359–67.
62. Sue GR, Lannin DR, Au AF, Narayan D, Chagpar AB. Factors associated with decision to pursue mastectomy and breast reconstruction for treatment of ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Surg.* 2013;206(5):682–5.
63. Wapnir IL, Dignam JJ, Fisher B, Mamounas EP, Anderson SJ, Julian TB i sur. Long-term outcomes of invasive ipsilateral breast tumor recurrences after lumpectomy in NSABP B-17 and B-24 randomized clinical trials for DCIS. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(6):478–88.
64. McCormick B, Winter K, Hudis C, Kuerer HM, Rakovitch E, Smith BL i sur. RTOG 9804: A prospective randomized trial for good-risk ductal carcinoma in situ comparing radiotherapy with observation. *J Clin Oncol.* 2015;33(7):709–15.
65. National Comprehensive Cancer Network (NCCN)[Internet]. Breast cancer (Version 2.2016); [ažurirano 5. 6. 2016.; pristupljeno 1. 19. 2016.]. Dostupno na: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf.
66. Moran MS, Zhao Y, Ma S, Kirova Y, Forquet A, Chen P i sur. Association of Radiotherapy Boost for Ductal Carcinoma In Situ With Local Control After Whole-Breast Radiotherapy. *JAMA Oncol.* 2017;3(8):1060-68.

67. Selim AGA, El-Ayat G, Wells CA. Androgen receptor expression in ductal carcinoma in situ of the breast: relation to oestrogen and progesterone receptors. *J Clin Pathol.* 2002;55(1):14–6.
68. Hird RB, Chang A, Cimmino V, Diehl K, Sabel M, Kleer C i sur. Impact of estrogen receptor expression and other clinicopathologic features on tamoxifen use in ductal carcinoma in situ. *Cancer.* 2006;106(10):2113–8.
69. Claus EB, Chu P, Howe CL, Davison TL, Stern DF, Carter D i sur. Pathobiological findings in DCIS of the breast: morphologic features, angiogenesis, HER-2/neu and hormone receptors. *Exp Mol Pathol.* 2001;70(3)303-16.
70. Forbes JF, Sestak I, Howell A, Bonani B, Bundred N, Levy C i sur. Anastrozole versus tamoxifen for the prevention of locoregional and contralateral breast cancer in postmenopausal women with locally excised ductal carcinoma in situ (IBIS-II DCIS): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387(10021):866-73.
71. Nahleh Z, Namakydoust A, Bakkar R, Bishop J. Trastuzumab not for ductal carcinoma in situ? *Anticancer Drugs.* 2007;18(10):1231–5.
72. Kuerer HM, Buzdar AU, Mittendorf EA, Esteva FJ, Lucci A, Vence LM i sur. Biologic and immunologic effects of preoperative trastuzumab for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer.* 2011;117(1):39–47.
73. Von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Loibl S, Huober J, Tesch H, Solbach C i sur. Responsiveness of Adjacent ductal carcinoma in situ and changes in HER2 status after neoadjuvant chemotherapy/trastuzumab treatment in early breast cancer-results from the GeparQuattro study (GBG 40). *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(3):863–70.
74. Clay MR, Iberri DJ, Bangs CD, Cherry A, Jensen KC. Clinicopathologic characteristics of HER2 FISH-ambiguous breast cancer at a single institution. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(1):120–7.
75. Siziopikou KP, Anderson SJ, Cobleigh MA, Julian TB, Arthur DW, Zheng P i sur. Preliminary results of centralized HER2 testing in ductal carcinoma in situ (DCIS): NSABP B-43. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;142(2): 41.

76. Burnet FM. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet*. 1967;1(7501):1171-4.
77. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*. 1974;183(4124):534-6.
78. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-8.
79. Garg AD, Krysko DV, Golab J, Vandenabeele P, Agostinis P. The emergence of plox-ER stress induced immunogenic apoptosis. *Oncoimmunology*. 2012;1(5):786-88.
80. Demaria S, Pikarsky E, Karin M, Coussens LM, Chen YC, El Omar EM i sur. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *J Immunother*. 2010 May;33(4):335-51.
81. Maher J, Davies ET. Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Br J Cancer*. 2004;91(5):817-21.
82. Roitt I, Brostoff J MD. *Immunology*. 3. izd. St. Louis: Mosby, 1993.
83. Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med*. 2006;354(11):1166-76.
84. Vignali D, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523-32.
85. Elpek KG, Lacelle C, Singh NP, Yolcu ES, Shirwan H. CD4+CD25+ T regulatory cells dominate multiple immune evasion mechanisms in early but not late phases of tumor development in a B cell lymphoma model. *J Immunol*. 2007;178(11):6840-8.
86. Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2015; 21(4):687-92.

87. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18(1):27–34.
88. Teixeira L, Rothé F, Ignatiadis M, Sotiriou C. Breast Cancer Immunology. *Oncol Times.* 2016;38(9):18–19.
89. Galon J, Angell H, Bedognetti D, Marincola F. The Continuum of Cancer Immunosurveillance: Prognostic, Predictive, and Mechanistic Signatures. *Immunity.* 2013;39(1):11–26.
90. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G i sur. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26(2):259–71.
91. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F i sur. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):860–7.
92. Lurquin C, Van Pel A, Mariam B, De Plaen E, Szikora JP, Janssens C i sur. Structure of the gene of tum- transplantation antigen P91A: The mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells. *Cell.* 1989;58(2):293–303.
93. Esteller M. Molecular Origins of Cancer Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med.* 2008;358(11):1148–59.
94. Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol.* 2007;178(4):1975–9.
95. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005 Aug;5(8):615-25.
96. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S i sur. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(5):1914–8.

97. Janitz M, Fiszer D, Michalczak Janitz K, Lukaszzyk A, Fernandez N, Skorupski W i sur. Analysis of mRNA for class I HLA on human gametogenic cells. *Mol Reprod Dev.* 1994;38(2):231–7.
98. Gjerstorff MF, Andersen MH, Ditzel HJ1. Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget.* 2015 Jun 30;6(18):15772-87.
99. Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenergetics Biomembr.* 2003;35(1):31–40.
100. Hofbauer GF, Schaefer C, Noppen C, Böni R, Kamarashev J, Nestle FO i sur. MAGE-3 immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Am J Pathol.* 1997;151(6):1549–53.
101. Almeida LG, Sakabe NJ, de Oliveira AR, Silva MCC, Mundstein AS, Cohen T i sur. CT database: A knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):816-9.
102. Stevenson BJ, Iseli C, Panji S, Zahn-Zabal M, Hide W, Old LJ. Rapid evolution of cancer/testis genes on the X chromosome. *BMC Genomics.* 2007;23(8):129.
103. Zhang Q, Su B. Evolutionary origin and human-specific expansion of a cancer/testis antigen gene family. *Mol Biol Evol.* 2014;31(9):2365-75.
104. Gjerstorff MF, Ditzel HJ. Limited SP17 expression within tumors diminishes its therapeutic potential. *Tissue Antigens.* 2012;80(6):523–7.
105. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev.* 2002;188(3):22–32.
106. Jäger D, Jäger E, Knuth A. Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *J Clin Pathol.* 2001;54(9):669–74.
107. Bodey B. Cancer-testis antigens: promising targets for antigen directed antineoplastic immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2002;2(6):577–84.

108. Nagorsen D, Scheibenbogen C, Marincola FM, Letsch A, Keilholz U. Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(12):4296–303.
109. Knuth A, Jäger D, Jäger E. Cancer immunotherapy in clinical oncology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46 Suppl:S46-51.
110. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B i sur. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991;254(5038):1643–7.
111. Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* 2001;61(14):5544–51.
112. Rogner UC, Wilke K, Steck E, Korn B, Poustka A. The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28. *Genomics.* 1995;29(3):725–31.
113. Kocher T, Schultz-Thater E, Gudat F, Schaefer C, Casorati G, Juretic A i sur. Identification and Intracellular Location of MAGE-3 Gene Product. *Cancer Res.* 1995;55(11):2236–9.
114. Schultz-Thater E, Juretic A, Dellabona P, Lüscher U, Siegrist W, Harder F i sur. MAGE-1 gene product is a cytoplasmic protein. *Int J Cancer.* 1994;59(3):435–9.
115. Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T i sur. Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens.* 2013 Jun;81(6):428-34.
116. Espantman KC, O’Shea CC. AMAGEing new players enter the RING to promote ubiquitylation. *Mol Cell.* 2010;39(6):835–7.
117. Juretic A, Spagnoli GC, Schuktz-Thater E, Sarcevic B. Cancer/Testis Tumour-Associated Antigens: Immunohistochemical Detection With Monoclonal Antibodies. *Lancet Oncol.* 2003 Feb;4(2):104-9.
118. Curigliano G, Viale G, Ghioni M, Jungbluth AA, Bagnardi V, Spagnoli GC i sur. Cancer-

testis antigen expression in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2011;22(1):98–103.

119. van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Hames G, Ferrant A, Lehmann F i sur. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood.* 1999;94(4):1156–64.
120. Chambost H, Van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi SJ i sur. Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood.* 2000;95(11):3530–3.
121. Zajac P, Schultz-Thater E, Tornillo L, Sadowski C, Trella E, Mengus C i sur. MAGE-A Antigens and Cancer Immunotherapy. *Front Med.* 2017;4:18.
122. Chen YT, Stockert E, Chen Y, Garin-Chesa P, Rettig WJ, van der Bruggen P i sur. Identification of the MAGE-1 gene product by monoclonal and polyclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(3):1004–8.
123. Schultz-Thater E, Juretic A, Dellabona P, Luscher U, Siegrist W, Harder F i sur. MAGE-1 gene product is a cytoplasmic protein. *Int J Cancer.* 1994;59(3):435–9.
124. Wurz GT, Kao C-J, DeGregorio MW. Novel cancer antigens for personalized immunotherapies: latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol.* 2016;8(1):4–31.
125. Chen YT, Boyer AD, Viars CS, Tsang S, Old LJ, Arden KC. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenet Cell Genet.* 1997;79(3–4):237–40.
126. Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E i sur. NY-ESO-1: Review of an Immunogenic Tumor Antigen. *Adv Cancer Res.* 2006;95:1–30.
127. Shurell E, Vergara-Lluri ME, Li Y, Crompton JG, Singh A, Bernthal N i sur. Comprehensive adipocytic and neurogenic tissue microarray analysis of NY-ESO-1 expression - a promising immunotherapy target in malignant peripheral nerve sheath tumor and liposarcoma. *Oncotarget.* 2016; 7(45): 72860–72867.

128. Jungbluth A, Chen YT, Stockert E, Busam KJ, Kolb D, Iversen Ki sur. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int J Cancer*. 2001;92(6):856–60.
129. Bandic D, Juretic A, Sarcevic B, Separovic V, Kujundzic-Tiljak M, Hudolin T i sur. Expression and possible prognostic role of MAGE-A4, NY-ESO-1, and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: retrospective immunohistochemical study. *Croat Med J*. 2006;47(1):32–41.
130. Grigoriadis A, Caballero OL, Hoek KS, da Silva L, Chen YT, Shin SJ i sur. CT-X antigen expression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13493–8.
131. Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss K-D, Romeike B, Regitz E i sur. Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int J Cancer*. 2006;118(3):696–703.
132. Sugita Y, Wada H, Fujita S, Nakata T, Sato S, Noguchi Y i sur. NY-ESO-1 Expression and Immunogenicity in Malignant and Benign Breast Tumors. *Cancer Res*. 2004;64(6):2199–204.
133. Theurillat JP, Ingold F, Frei C, Zippelius A, Varga Z, Seifert B i sur. NY-ESO-1 protein expression in primary breast carcinoma and metastases - Correlation with CD8+ T-cell and CD79a+ plasmacytic/B-cell infiltration. *Int J Cancer*. 2007;120(11):2411–7.
134. Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D i sur. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med*. 1998;187(2):265–70.
135. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B i sur. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group. *Adv Anat Pathol*. 2017 Sep; 24(5): 235–51.

136. Pruneri G, Lazzeroni M, Bagnardi V, et al. The prevalence and clinical relevance of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ductal carcinoma in situ of the breast. *Ann Oncol.* 2017;28:321–28.
137. Campbell MJ, Baehner F, O’Meara T, et al. Characterizing the immune microenvironment in high-risk ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;161:17–28.
138. Kocher T, Schultz-Thater E, Gudat F, Schaefer C, Casorati G, Juretic A i sur. Identification and intracellular location of MAGE-3 gene product. *Cancer Res.* 1995;55(11): 2236–9.
139. Schultz-Thater E, Piscuoglio S, Iezzi G, Le Magnen C, Zajac P, Carafa V i sur. MAGE-A10 is a nuclear protein frequently expressed in high percentages of tumor cells in lung, skin and urothelial malignancies. *Int J Cancer.* 2011;129(5):1137–48.
140. Schultz-Thater E, Juretic A, Dellabona P, Lüscher U, Siegrist W, Harder F i sur. MAGE-1 gene product is a cytoplasmic protein. *Int J Cancer.* 1994;59(3): 435-9.
141. Bolli M, Schultz-Thater E, Zajac P, Guller U, Feder C, Sanguedolce F i sur. NY-ESO-1/LAGE-1 coexpression with MAGE-A cancer/testis antigens: A tissue microarray study. *Int J Cancer.* 2005;115(6): 960-6.
142. Remmele W, Schicketanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract.* 1993;189(8):862–6.
143. Zendman AJW, Ruiter DJ, Van Muijen GNP. Cancer/testis-associated genes: Identification, expression profile, and putative function. *J of Cell Physiol.* 2003;194(3): 272–88.
144. Bolli M, Kocher T, Adamina M, Guller U, Dalquen P, Haas P i sur. Tissue microarray evaluation of Melanoma antigen E (MAGE) tumor-associated antigen expression: potential indications for specific immunotherapy and prognostic relevance in squamous cell lung carcinoma. *Ann Surg.* 2002;236(6):785–93.
145. Landry C, Brasseur F, Spagnoli GC, Marbaix E, Boon T, Coulie P i sur. Monoclonal antibody 57B stains tumor tissues that express gene MAGE-A4. *Int J Cancer.* 2000;86(6):835–41.

146. Ademuyiwa FO, Bshara W, Attwood K, Morrison C, Edge SB, Ambrosone CB i sur. NY-ESO-1 cancer testis antigen demonstrates high immunogenicity in triple negative breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(6):38783.
147. Chen YT, Ross DS, Chiu R, Zhou XK, Chen YY, Lee P i sur. Multiple cancer/testis antigens are preferentially expressed in hormone-receptor negative and high-grade breast cancers. *PLoS One*. 2011;6(3):17876.
148. Mrklic I, Spagnoli GC, Juretic A, Pogorelic Z, Tomic S. Co-expression of cancer testis antigens and topoisomerase 2-alpha in triple negative breast carcinomas. *Acta Histochem*. 2014;116(5):740–6.
149. Badovinac Črnjević T, Spagnoli G, Juretic A, Jakić-Razumović J, Podolski P, Šarić N. High expression of MAGE-A10 cancer-testis antigen in triple-negative breast cancer. *Med Oncol*. 2012;29(3):1586–91.
150. Coombes RC, Caballero OL, Shousha S, Ghaem-Maghami S, Woodley-Barker L, Wilhelm-Benartzi CS i sur. NY-ESO-1 expression in DCIS: A new predictor of good prognosis. *Oncoscience* 2017;4(3–4):33.
151. Lee HJ, Kim JY, Song IH, Park IA, Yu JH, Gong G. Expression of NY-ESO-1 in Triple-Negative Breast Cancer Is Associated with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and a Good Prognosis. *Oncology*. 2015;89(6):337–44.
152. Adams S, Greeder L, Reich E, Shao Y, Fosina D, Hanson N i sur. Expression of cancer testis antigens in human BRCA-associated breast cancers: Potential targets for immunoprevention? *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(7):999–1007.
153. Caballero OL, Shousha S, Zhao Q, Simpson AJG, Coombes RC, Neville AM. Expression of Cancer/Testis genes in ductal carcinoma in situ and benign lesions of the breast. *Oncoscience* 2013;1(1):14-20.
154. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*. 2009;100(11):2014-21.
155. Traversari C, van der Bruggen P, Van den Eynde B, Hainaut P, Lemoine C, Ohta N, i sur. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by

autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics*. 1992;35(3):145–52.

156. Hudolin T, Juretic A, Pasini J, Tomas D, Spagnoli GC, Heberer M i sur. Immunohistochemical expression of tumor antigens MAGE-A1, MAGE-A3/4, and NY-ESO-1 in squamous cell carcinoma of the penis. *Urology*. 2006;68(1):205–7.
157. Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, i sur. Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology*. 2003;64(4):443–9.
158. Kulkarni S, Patil DB, Diaz LK, Wiley EL, Morrow M, Khan SA. COX-2 and PPARgamma expression are potential markers of recurrence risk in mammary duct carcinoma in-situ. *BMC Cancer*. 2008;8:36.
159. Laban S, Atanackovic D, Luetkens T, Knecht R, Busch CJ, Freytag M i sur. Simultaneous cytoplasmic and nuclear protein expression of melanoma antigen-A family and NY-ESO-1 cancer-testis antigens represent an independent marker for poor survival in head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2014;135(5): 1142-52.

11. BIOGRAFIJA

Ana Roguljić rođena je 23. 12. 1986. u Dubrovniku. Osnovnu i srednju školu pohađala je u Splitu. Također je završila osnovnu i srednju Glazbenu školu Josipa Hatzea u Splitu (teoretski odjel). 2005. godine upisuje Medicinski fakultet u Zagrebu, a diplomirala je 2011. s odličnim uspjehom. Nakon što je završila pripravnički staž u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice te položila državni ispit počinje raditi u Zavodu za hitnu medicinu Zagrebačke županije, ispostava Zaprešić. Specijalizaciju iz Onkologije i radioterapije dobiva 2014. godine te počinje raditi na Klinici za tumore, KBCSM-a. Iste godine upisuje i poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo. U rujnu 2017. upisuje tečaj Osnove medicinske akupunkture pri Hrvatskom društvu za akupunkturu (Hrvatski liječnički zbor). U rujnu 2018. uspješno polaže ispit te stječe diplomu iz osnova medicinske akupunkture. Sudjelovala je do sada na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima te je objavila nekoliko radova u inozemnim časopisima. U rujnu 2019. uspješno polaže specijalistički ispit te postaje specijalist onkologije i radioterapije.

Ana Roguljić živi i radi u Zagrebu.

