



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Ilić

KVANTITATIVNA MIKROMORFOLOŠKA STUDIJA LOBULARNIH
KARCINOMA DOJKE RAZLIČITE BIOLOŠKE AGRESIVNOSTI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2014. godina



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Ilić

KVANTITATIVNA MIKROMORFOLOŠKA STUDIJA LOBULARNIH
KARCINOMA DOJKE RAZLIČITE BIOLOŠKE AGRESIVNOSTI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Maja Jovičić Milentijević

Niš, 2014. godina

Svojim roditeljima, Ratku i Vojislavi

I Autor	
Ime i prezime	Ivan Ilić
Datum i mesto rođenja	07.09.1981. Niš
Sadašnje zaposlenje	Medicinski fakultet u Nišu, Centar za patologiju i patološku anatomiju Klinički centar Niš
II Doktorska disertacija	Kvantitativna mikromorfološka studija lobularnih karcinoma dojke različite biološke agresivnosti
Broj stranica	216
Broj slika/shema	39
Broj tabela	42
Broj grafikona	33
Ustanova i mesto gde je rad izrađen	Centar za patologiju i patološku anatomiju Klinički centar Niš, Institut za patologiju Medicinski fakultet u Nišu, Institut za histologiju i embriologiju Medicinski fakultet u Nišu
Naučna oblast	Molekularna medicina, UNO Patologija
Mentor	Prof. dr Maja Jovičić Milentijević
III Ocena i odbrana	
Datum prijave teme	
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije	
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata	1. Prof. dr Čedo Kutlešić 2. Prof. dr Maja Jovičić Milentijević 3. Prof. dr Ljubinka Janković Veličković
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije	1. Prof. dr Dragan Mihailović, predsednik 2. Prof. dr Maja Jovičić Milentijević, mentor i član 3. Prof. dr Milan Knežević, član sa MF u Kragujevcu 4. Prof. dr Ljubinka Janković Veličković, član 5. Doc. dr Aleksandar Petrović, član
Datum odbrane doktorske disertacije	

Naučni doprinos:

1. **Ilić I**, Randelović P, Ilić R, Đorđević L, Radojković D. Granular-cell tumor: a rare variant of mammary tumor. *Vojnosanit Pregl* 2008; 65(6): 488-91.
2. **Ilić I**, Randelović P, Ilić R, Katić V, Milentijević M, Veličković Lj, et al. An approach to malignant mammary phyllodes tumors detection. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66(4):277-82.
3. Radojković D, Antić S, Pešić M, Radojković M, Bašić D, Radjenović-Petković S, Radenković S, **Ilić I**. Significance of hyperprolactinemia for cytomorphologic features of breast secretions. *Vojnosanit Pregl* 2010; 67(1): 42-7.

SKRAĆENICE I AKRONIMI:

LCIS	- lobularni karcinom "in situ"
AB-PAS	- alcian blue periodic acid Shiff
CEA	- karcinoembrionalni antigen
ALH	- atipična lobularna hiperplazija
ILC	- invazivni lobularni karcinom
IDC	- invazivni duktalni karcinom
DCIS	- duktalni karcinom "in situ"
ER	- estrogenski receptor
PR	- progesteronski receptor
GCDFP-15	- gross cystic disease fluid protein 15
HG	- histološki gradus
NG	- nuklearni gradus
CT	- kompjuterizovana tomografija
NSE	- neuron specifična enolaza
BRCA 1	- breast cancer antigen 1
E1	- estron
E2	- estradiol
E3	- estriol
LDL	- low density lipoprotein
DNK	- dezoksiribonukleinska kiselina
ERE	- estrogen responsive element
NF-κB	- nuklearni faktor kappa B
SERM	- selective estrogen receptor modulator
HER-2	- human epidermal growth factor receptor 2
ASCO	- American Society of Clinical Oncology
CAP	- College of American Pathologists
AR	- androgeni receptor
EGFR	- epidermal growth factor receptor
FNA	- fine needle aspiration

OD	- optical density
ECM	- ekstracelularni matriks
TGF	- transformišući faktor rasta
IGF	- insulinu sličan faktor rasta
PDGF	- trombocitni faktor rasta
VEGF	- vaskularni endotelni faktor rasta
Å	- angstrom
mf/mc	- multifokalnost/multicentričnost
ICH	- imunohistohemijski
FDA	- Food and Drug Administration

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1 EMBRIOLOGIJA I HISTOLOGIJA LOBULA DOJKE.....	3
2.2 LOBULARNI KARCINOM "IN SITU".....	6
2.2.1 Makroskopske i mikroskopske karakteristike LCIS-a.....	7
2.2.2 Atipična lobularna hiperplazija.....	12
2.2.3 Diferencijalna dijagnoza između LCIS-a i ALH.....	13
2.2.4 Imunohistohemija LCIS-a.....	14
2.2.5 Mikroinvazija.....	15
2.3 INVAZIVNI LOBULARNI KARCINOM DOJKE.....	15
2.3.1 Kliničke karakteristike invazivnog lobularnog karcinoma dojke.....	16
2.3.2 Multifokalnost, multicentričnost i bilateralnost karcinoma dojke.....	18
2.3.3 Makroskopski izgled i veličina invazivnog lobularnog karcinoma dojke.....	21
2.3.4 Mikromorfološke karakteristike i podtipovi invazivnog lobularnog karcinoma dojke.....	21
2.3.4.1 <i>Promene u stromi invazivnih karcinoma dojke</i>	22
2.3.4.2 <i>Klasični podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke</i>	25
2.3.4.3 <i>Pleomorfni podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke</i>	27
2.3.4.4 <i>Alveolarni podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke</i>	28
2.3.4.5 <i>Solidni podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke</i>	29
2.3.4.6 <i>Tubulolobularni podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke</i>	29
2.3.4.7 <i>Mešoviti lobularni podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke</i>	29
2.3.4.8 <i>Kombinovana mikromorfološka klasifikacija invazivnog lobularnog karcinoma dojke</i>	30
2.3.5 Stepenovanje invazivnog lobularnog karcinoma dojke.....	31
2.3.6 Određivanje stadijuma karcinoma dojke.....	32
2.3.7 Kariometrijska analiza karcinoma dojke.....	35
2.3.8 Način širenja invazivnog lobularnog karcinoma dojke.....	35
2.4 TKIVNI MARKERI U LOBULARNOM KARCINOMU DOJKE.....	40

2.4.1 Estrogen i karcinom dojke.....	40
2.4.1.1 <i>Sinteza estrogena</i>	40
2.4.1.2 <i>Metabolizam estrogena</i>	41
2.4.1.3 <i>Funkcije estrogena</i>	42
2.4.1.4 <i>Molekularna dejstva estrogena</i>	42
2.4.2 Estrogenski i progesteronski receptori.....	43
2.4.2.1 <i>Semikvantitativne ASCO preporuke za imunohistohemijsko</i> <i>testiranje ER i PR receptora kod karcinoma dojke</i>	45
2.4.2.2 <i>Kvantitativna imunohistohemijska procena ekspresije hormonskih</i> <i>receptora</i>	48
2.4.3 HER-2 receptori.....	50
2.4.4 BRCA 1 tumor supresorni gen.....	51
2.4.5 p53 tumor supresorni gen.....	52
2.4.6 Ki-67 proliferativni marker.....	53
2.4.7 E-cadherin.....	53
2.4.8 Ostali biomarkeri od značaja za dijagnozu lobularnog karcinoma dojke..	55
2.5 OSTALE METODE ISPITIVANJA LOBULARNOG KARCINOMA DOJKE	
.....	56
2.5.1 Citologija lobularnog karcinoma dojke.....	56
2.5.2 Elektronska mikroskopija i ultrastrukturne karakteristike lobularnog karcinoma dojke.....	57
2.5.3 Protočna ("flow") citometrija i molekularna genetika.....	59
2.6 PROGNOZA LOBULARNOG KARCINOMA DOJKE.....	60
2.6.1 Prognoza LCIS-a i atipične lobularne hiperplazije.....	60
2.6.2 Prognoza invazivnog lobularnog karcinoma dojke.....	62
2.7 TERAPIJA LOBULARNOG KARCINOMA DOJKE.....	64
2.7.1 Hirurška terapija lobularnog karcinoma dojke.....	64
2.7.2 Antiestrogena terapija.....	67
2.7.2.1 <i>Blokiranje estrogenskih receptora (Tamoxifen, Raloxifen)</i>	68
2.7.2.2 <i>Inhibitori sinteze estrogena (Aromatase)</i>	69
2.7.2.3 <i>Estrogen receptor "down" regulatori (Fluvestrant)</i>	70

3. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA.....	71
4. MATERIJAL I METODE.....	73
5. REZULTATI.....	81
5.1 REZULTATI KLINIČKE I MIKROMORFOLOŠKE ANALIZE	
BOLESNICA SA LOBULARNIM KARCINOMOM DOJKE.....	81
5.2. REZULTATI ANALIZE IMUNOHISTOHEMIJSKIH KARAKTERISTIKA	
TKIVNIH MARKERA U LOBULARNOM KARCINOMU DOJKE.....	98
5.2.1 Estrogenski receptori (ER).....	98
5.2.2 Progesteronski receptori (PR).....	103
5.2.3 HER-2.....	108
5.2.4 BRCA1.....	113
5.2.5 Supresorni p53 gen.....	119
5.2.6 Ki-67.....	125
5.2.7 E-cadherin.....	128
5.3 REZULTATI KVANTITATIVNE ANALIZE EKSPRESIJE	
ESTROGENSKIH RECEPTORA I POVRŠINE PRESEKA JEDARA U	
LOBULARNOM KARCINOMU DOJKE.....	133
6. DISKUSIJA.....	140
7. ZAKLJUČAK.....	174
8. LITERATURA.....	176
9. SAŽETAK.....	212
10. SUMMARY.....	213
11. BIOGRAFIJA.....	214

1. UVOD

Karcinom dojke je vodeći malignitet kod žena koji se smatra odgovornim za preko 3.500.000 smrtnih ishoda širom sveta,¹ pa je rano otkrivanje i adekvatna terapija ovog tumora jedan od najaktuelnijih problema savremene medicine.

Najčešća mikromorfološka forma karcinoma dojke je duktalni karcinom (više od 70%), dok je drugi po učestalosti lobularni karcinom dojke koji se otkrivao u 5 - 7% slučajeva, ali u novije vreme predstavlja i do 15% slučajeva svih karcinoma dojke. Iako je poreklo duktalnih i lobularnih karcinoma dojke relativno poznato (terminalna duktulo-lobularna jedinica), histogeneza, učestalost i citomorfološke karakteristike svih podtipova lobularnog karcinoma dojke još uvek nisu dovoljno ispitane.

U literaturi je neprestano prisutna dilema o multifokalnosti, multicentričnosti i bilateralnosti lobularnog karcinoma dojke.

Razvoj imunohistohemijskih metoda sa korišćenjem monoklonskih antitela omogućio je određivanje hormonskih receptora, što je od posebne važnosti za određivanje biološkog potencijala karcinoma dojke. Obzirom da karcinomi dojke pokazuju hormonsku regulaciju kako u toku nastanka, tako i u toku evolucije, određivanje hormonskih receptora (estrogenskih i progesteronskih) omogućuje i adekvatnu primenu odgovarajuće antihormonske terapije. Određivanje hormonskih receptora u lobularnom karcinomu dojke daje nove dijagnostičke i prognostičke informacije, koje mogu da se porede sa rezultatima mikromorfoloških analiza, što je i predmet ove studije.

Osim toga poznato je da na nastanak i evoluciju lobularnog karcinoma dojke ima uticaj i c-erbB-2 onkoprotein, koji je lokalizovan na membranama tumorskih ćelija, a njegova pozitivnost omogućuje korišćenje terapije Herceptinom (trastuzumabom), koja se uspešno primenjuje u sprečavanju rasta i progresije lobularnog karcinoma dojke.

Imunohistohemijski markeri kao što su BRCA1, p53, Ki-67 i E-cadherin takođe mogu da budu od pomoći u proceni biološkog potencijala lobularnog karcinoma dojke.

Pitanje standardizovane interpretacije reaktivnosti na imunohistohemijskim preparatima je pokušano da se reši kvantitativno upotrebom fotometrijskih metoda, gde su specifično obojeni regioni izdvojeni na osnovu koloriteta hromogena. Ipak, do sada nije bilo morfometrijskih i fotometrijskih metoda koje su se ekvilibrisale prema postojećem sistemu skorovanja (Allred scoring sistem). One nisu i zasebno određivale intenzitet specifične prebojenosti kroz gustinu boje prisutnog hromogena, a uz eliminaciju koloriteta koji pripada nespecifičnom osnovičnom prebojenju.

Komparativna mikromorfološka, imunohistohemijska i kvantitativna studija lobularnih karcinoma dojke je u našoj zemlji odsutna, a podaci u svetskoj literaturi su parcijalni i često kontradiktorni.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 EMBRIOLOGIJA I HISTOLOGIJA LOBULA DOJKE

Razvoj ljudske dojke je složen proces koji započinje tokom embrionalnog perioda. Značajniji napredak u rastu se dešava u pubertetu sa formiranjem lobula, ali razvoj i diferencijacija dojke se završavaju na kraju prve kompletne trudnoće.²

Žlezdani parenhim dojke se razvija od pojedinačnog epitelnog ektodermalnog pupoljka. Zbog teškoća u utvrđivanju tačnog dana začeća, mnogo je preciznije upoređivati faze razvoja žlezdanog epitela dojke sa dužinom embriona ili fetusa.³ Prenatalni razvoj žlezdanog epitela dojke se može podeliti u deset faza:

1. Stadijum "grebena" (embrion manji od 5 mm)
2. Stadijum "mlečnog brežuljka" (embrion dužine od 5,5 do 10 mm)
3. Stadijum "diska" dojke (embrion od 10 do 11 mm dužine)
4. Stadijum "tipa lobula" (embrion dužine od 11 do 25 mm)
5. Stadijum "kupe" (embrion dužine od 25 do 30 mm)
6. Stadijum "pupljenja" (embrion dužine od 30 do 68 mm)
7. Stadijum "uvlačenja" (embrion dužine 68 mm do 10 cm)
8. Stadijum "grananja" (fetus dužine 10 cm)
9. Stadijum "kanalizovanja" (period od 20 do 32 nedelje gestacije)
10. Stadijum "terminalnih alveola", koje su sastavljene od jednorednog epitela i sadrže kolostrum (novorođenče).³

Dojka novorođenčeta je vrlo primitivna struktura, a sastoji se od duktusa koji se završavaju kratkim duktulima obloženim jednim do dva sloja epitelnih ćelija i jednim slojem mioepitelnih ćelija. Epitelne ćelije imaju eozinofilnu citoplazmu sa tipičnom apokrinom sekrecijom.^{2,4}

U vreme puberteta rudiment dojke pokazuje aktivan rast kako u žlezdanom tkivu tako i u okružujućoj stromi. Porast žlezdanog epitela nastaje zbog rasta i deobe malih "svežnjeva" primarnih i sekundarnih duktusa. Oni rastu i dele se na dihotomni i simpodijalni način. Duktusi rastu, dele se i formiraju nakupinu terminalnih pupoljaka,

koji predstavljaju prekursore novih "grana", "grančica" i malih duktula ili alveolarnih pupoljaka.³

Grupa alveolarnih pupoljaka oko terminalnih duktusa formira lobule tipa 1 ili devičanske (virginalne) lobule, a svaka grupa je sastavljena od oko 11 alveolarnih pupoljaka. Terminalni duktusi i alveolarni pupoljci su povezani dvorednim epitelom. Formiranje lobula u ženskim dojčkama se dešava unutar jedne do dve godine nakon početka prvog menstrualnog perioda. Činjenica da lobuli tipa 1 imaju najveći proliferativni indeks, najveću koncentraciju estrogenskih receptora, a i broj krvnih sudova po lobularnoj jedinici, jasno ukazuje da je ova struktura prirodna "meta" maligniteta.^{2,5,6} Potpuna diferencijacija žlezdanog epitela dojke je postepen proces koji zahteva više godina, a u slučajevima ukoliko nije bilo trudnoće, nikada se ne završava.^{2,7}

Prelaz lobula tip 1 u tip 2 ili lobula tipa 2 u tip 3 je postepen proces pojavljivanja novih alveolarnih pupoljaka. Kod lobula tipa 2 i 3 oni se nazivaju duktulima. Njihov broj se povećava od 11 kod lobula tipa 1 do 47 kod lobula tipa 2 i do 80 kod lobula tipa 3.³

Dojke žena koje nisu rađale sadrže više nediferentovanih struktura, kao što su terminalni duktusi i lobuli tipa 1, mada se povremeno mogu videti i lobuli tipa 2 i tipa 3. Sa druge strane, kod žena koje su rađale dominantne strukture su najdiferentovaniji lobuli tipa 3. Lobuli tipa 1 su konstantno prisutni tokom čitavog života žena koje nisu rađale. Kod žena koje su rađale ima najviše lobula tipa 3 u ranim reproduktivnim godinama, a broj im opada posle četrdesete godine života, verovatno zbog involucije u predominantne lobule tipa 2 i 1.² Kod žena koje nisu rađale lobuli tipa 2 su prisutni u umerenom broju u ranijim godinama, a njihov broj naglo opada nakon 23. godine života, dok broj lobula tip 1 ostaje značajno viši.³

U trudnoći dojka postiže svoj maksimalni razvoj. Rani stadijum se karakteriše proliferacijom distalnih elemenata duktalnog "stabla" formirajući duktule koji se u tom stadijumu mogu nazvati acinusima, i konačno se završava razvojem lobula tipa 3 u lobule tipa 4.²

Utvrđeno je da atipične lobularne hiperplazije i duktalni karcinomi "in situ" (DCIS) vode poreklo od lobula tipa 1, slabo diferentovanih struktura, u kojima se mogu razviti preneoplastične promene, ali i jako agresivne neoplazme.⁸ Diferentovanije lobularne strukture takođe mogu da budu mesta formiranja neoplazmi tj. lobuli tipa 2 su

mesta razvoja lobularnog karcinoma "in situ" (LCIS), dok su lobuli tipa 3 predodređeni za mnogo benignije promene dojke (hiperplastične lobule, ciste, fibroadenome i adenome), a lobuli tipa 4 za laktantne adenome.^{9,10}

Ultrastruktura normalnog epitela dojke je prvi put gotovo istovremeno ispitana početkom šezdesetih godina prošlog veka od strane više istraživača (Haguenau-a i Arnoult-a (1959),¹¹ Waugh-a i van der Hoeven-a (1962),¹² Barton-a (1964)¹³ i Toker-a (1967)¹⁴), i dobijeni su skoro identični nalazi.

Terminalni delovi lobula obloženi su jednim tipom epitelnih ćelija koje se na osnovu svetle citoplazme mogu da svrstaju u tip B ćelija, pri čemu je gustina njihove citoplazme različita zbog različitog sadržaja ribozoma. Površinu ćelija čine mikrovilusi, intercelularni produžeci i dezmozomi. Takođe, karioplazma okruglih do ovalnih jedara ima svoj udeo u transparentnosti zbog uniformnog rasporeda hromatina. U citoplazmi se nalaze Goldži polja koja su jasno ograničena između površine ćelije i jedra, a nešto manje su zastupljene mitohondrije sa gustim matriksom i pojedinačnim kratkim lamelama ergastoplazme. Naročito nedostaju fibrilarne strukture i kontrastni depoziti.

Na bazi terminalnih delova žlezda se nalazi manji broj ćelija, čija citoplazma sadrži brojne ribosome, pa su stoga ove ćelije tamne i odgovaraju tipu A ćelija. One imaju izduženo jedro sa naboranom površinom i sa gustom delom grudvastom karioplazmom. Ove ćelije su jako razgranate i njihovi produžeci se protežu između B ćelija i mioepitelnih ćelija. Često se vide samo ćelijski produžeci bez odgovarajućeg jedra. Produžeci A ćelija su pomoću dezmozoma povezani sa okolnim ćelijama, pri čemu često postoji razdvajanje intercelularnih prostora. Citoplazma A ćelija sadrži velike i grupisane mitohondrije i to u većem broju u odnosu na B ćelije, dok je matriks svetliji nego kod B ćelija. Osim kratkih lamela ergastoplazme i malog Goldži aparata, citoplazma A ćelija ne sadrži druge diferencijacione komponente.¹⁵

Treći ćelijski tip su mioepitelne ćelije koje se nalaze između bazalne membrane i prethodno dva opisana tipa epitelnih ćelija. One imaju zvezdasti, razgranati oblik, veliko izduženo izvijugano jedro i gust vlaknasti omotač sastavljen od mikrofilamenata debljine 50-80 Å. Ove ćelije su hemidezmozomima pripojene za bazalnu membranu. Na bazalnom delu ćelijske membrane mioepitelnih ćelija postoje jasno vidljivi mnogobrojni loptasti "mehurići" promera od 500 - 600 Å bogati pinocitoznim strukturama.¹⁵

Bazalna membrana koja okružuje žlezdane formacije sastoji se iz debele fino zrnaste laminae dense (550 - 720 Å) koja se pomoću debele laminae rare (400 - 450 Å) odvaja od bazalnih delova ćelijske membrane mioepitelnih ćelija. Vezivno tkivo se nalazi odmah u neposrednoj okolini epitelnih ćelija i ističe se kao jače transparentno, a sadrži rastresito razdvojene kolagene fibrile, koje pokazuju poprečnu ispruganost, kao i kraća (100 - 120 Å) debela vlakna nalik micelama. Fibroblasti na oko 3 µm široke bezćelijske zone se protežu uzdužno i paralelno u odnosu na bazu epitela, a u njima se ne primećuje fibrilogeneza. Pored toga, nalaze se i pojedinačni kapilari, a periferno od fibroblastnog sloja se vide gusto zbijene trake kolagenog vezivnog tkiva.¹⁵

2.2 LOBULARNI KARCINOM "IN SITU"

Termin lobularni karcinom "in situ", kao poseban morfološki entitet, je definisan prvi put 1941. godine.^{16,17} Od strane *Muir-a* je označen kao "intraacinusni karcinom koji je često samo rezultat širenja kancerskih ćelija sa mesta terminalnog duktusa, gde sam maligni proces počinje".¹⁶ *Foote* i *Stewart* su uveli termin lobular carcinoma "in situ" (LCIS) da bi opisali "bolest malih lobulusnih duktusa i lobula". Oni su izneli važne kliničke i patološke karakteristike ove, do tada, nedefinisane bolesti:

1. Neupadljiv karakter LCIS-a koji se ne može otkriti palpacijom ili makroskopskim pregledom.
2. Multicentričnost (obično je lezija prisutna u više lobula).
3. Poreklo iz terminalnog duktulo-lobularnog kompleksa ili iz terminalnih duktusa.
4. Pedžetoidno širenje u duktuse, koje nije u vezi sa pravom Pedžetovom bolešću.
5. Ćelije prstena pečatnjaka ("signet ring cells") sa centralnom mukusnom vakuolom i periferno postavljenim jedrom.
6. Udruženost sa karakterističnim tipom infiltrativnog karcinoma.
7. Istovremeno postojanje LCIS sa drugim tipovima karcinoma (duktalnog, tubularnog).
8. Sklonost infiltrativnog lobularnog karcinoma da raste oko duktusa i lobula, ponekad označen kao "target"-oidan način rasta (u vidu mete).

9. Dezoplastična reakcija strome kod infiltrativnog lobularnog karcinoma.¹⁷

Zbog toga što je LCIS mikroskopska lezija koja ne formira palpabilni tumor, učestalost bolesti nije poznata.¹⁸

LCIS se obično otkriva slučajno u tkivu dojke koje je odstranjeno zbog proliferativne promene koja je napravila palpabilnu masu ili u "normalnom tkivu" koje okružuje benigni tumor kao što je fibroadenom. Mamografija nije u mnogim slučajevima delotvoran metod za otkrivanje LCIS, a procena zavisi od multicentričnosti ili bilateralnosti promena.^{19,20}

Haagensen je saopštio da je LCIS pretežno bolest žena u perimenopauzi,²¹ a da je 10-12% LCIS nađeno kod postmenopauzalnih bolesnica,²² za razliku od *Rosen*-a koji je saopštio da je taj procenat veći u postmenopauzalnih žena - 25%.²³

LCIS se retko javlja kao izolovana promena u žena mlađih od 35 ili starijih od 75 godina.²⁴

Žene sa LCIS imaju značajan rizik da imaju karcinom u drugoj dojci, često istovremeno, ali nije dokazano da sve žene sa LCIS uvek imaju bilateralne promene. Kada ipsilateralna dojka ima samo LCIS promene, kontralateralni LCIS se može naći u oko 40% slučajeva.²⁵

Multicentričnost i bilateralnost su karakteristike koje su u međusobnom odnosu kod karcinoma dojke. Multicentrični fokusi LCIS-a se nalaze u 60-85% bolesnica kojima je urađena mastektomija zbog LCIS.^{23,26} *Benfield* i saradnici su zabeležili da je rezidualni karcinom prisutan u 89% slučajeva bolesnica kod kojih je urađena mastektomija zbog LCIS do 1965 godine.²⁶

Skriveni, klinički neočekivani invazivni karcinom je bio otkriven u 4-6% amputiranih dojki, odstranjenih posle biopsije koja je pokazala LCIS.^{23,27}

2.2.1 Makroskopske i mikroskopske karakteristike LCIS-a

LCIS se često makroskopski opisuje kao nodularna (čvornovata) promena, kao fibroadenom, polja čvrstog i tvrdog tkiva ili cista, ali se nijedna od vidljivih ili palpatornih abnormalnosti ne mogu sa sigurnošću pripisati LCIS-u. Kod bolesnica sa

veoma razvijenim i proširenim LCIS-om, rezna površina tkiva dojke može imati slabo granulirani izgled, kada se gleda osvetljena pod uglom, zato što su zahvaćeni lobuli dovoljno uvećani da bi se videli.²⁸

Foote i *Stewart* su primetili da je LCIS prisutan u terminalnim duktusima postmenopauzalnih, atrofičnih dojki, obzirom da je LCIS u premenopauzalnih žena smešten u terminalnom duktulo-lobularnom kompleksu. U tipičnoj lobularnoj formi, populacija neoplastičnih ćelija zamenjuje normalni epitel acinusa i intralobularnih duktula.²⁸

Postoji debata oko toga koliko je neophodna zahvaćenost lobula da bi se postavila dijagnoza LCIS. Neki autori smatraju da je potrebno da najmanje dva lobula pokažu dijagnostičke karakteristike LCIS-a.²⁹ Drugi su zaključili da je jedan potpuno zahvaćeni lobul dovoljan dokaz za dijagnozu.^{22,30} Zapravo, ne postoji signifikantna razlika u riziku za nastanak karcinoma kod bolesnica sa zahvatanjem jednog ili dva lobula. Kod nekih biopsijskih uzoraka jedini dokaz neoplastične lobularne proliferacije je jedan lobul u kome su neki, ali ne i svi acinusi zahvaćeni.³¹

Gubitak kohezije je karakteristika neoplastičnih ćelija u LCIS, mada se ta osobina ne viđa tako često u zahvaćenim i ispunjenim acinusima.²⁸ Uvećane lobularne žlezdane komponente (acinusi) ispunjavaju većinu intralobularne strome. Gubitak kohezije u neoplastičnim lobularnim promenama u velikoj meri se može pripisati promenama u E-cadherin genu, koja se manifestuje odsustvom E-cadherin membranske imunoreaktivnosti u tim ćelijama.^{32,33} Promene na hromozomu 16q22.1, mestu E-cadherin gena, je opšta abnormalnost, koja se sreće kod LCIS-a.³⁴ Uprkos velikoj učestalosti E-cadherin somatskih mutacija u LCIS, urođene E-cadherin mutacije su retko detektovane kod ovih bolesnica.³⁴⁻³⁶

Neoplastične ćelije kod klasičnog LCIS-a su opisane kao ćelije sa oskudnom citoplazmom i malim okruglim jedrima, citološki sa lakom atipijom, bez vidljivih jedaraca. Kod nekih slučajeva prisutan je citološki pleomorfizam i tada se mnoštvo različitih ćelija klasifikuje kao pleomorfni LCIS.²⁸ Ćelije klasičnog LCIS su uglavnom diploidne, dok su kod pleomorfnog one hiperploidne.³⁷ Ćelije pleomorfnog LCIS-a imaju obilniju citoplazmu nego ćelije klasičnog LCIS-a i pleomorfija jedra, sa često prominentnim nukleolusima. Citološke karakteristike pleomorfnog LCIS-a u nekim

slučajevima liče na one kod duktalnog karcinoma i tada je od pomoći imunohistohemijsko bojenje na E-cadherin.

Intracitoplazmatski mucini su često prisutni u najmanje nekoliko ćelija, što ide u prilog dijagnoze LCIS-a.³⁸ Mucin može da bude neupadljiva karakteristika, koja se može pokazati histohemijskim bojenjima, kao što su mucikarmin ili Alcian blue-PAS (periodic acid Schiff).³⁸ Mucin je prisutan difuzno u citoplazmi ili mnogo češće je ograničen na vakuole. Ekstremna manifestacija ovog fenomena je formiranje "signet ring" ćelija, kod kojih rastegnute citoplazmatske vakuole potiskuju jedro uz ćelijsku membranu i uvlačeći se u njega daju mu oblik mesečevog srpa ("mladog meseca").³⁸ Degenerativne promene u citoplazmi ćelija LCIS-a i epitelu hiperplastičnih lobula, mogu da uzrokuju citoplazmatske defekte, koji liče na vakuole, ali se intracitoplazmatski mucin ne detektuje u ovim ćelijama. U epitelnim ćelijama normalnih lobula intracitoplazmatski mucin se ne može dokazati, ali on može da bude prisutan u lumenu lobula. To je značajno zbog razlikovanja mucina u pravim intracitoplazmatskim vakuolama i mucina dokazanog u malim džepovima lobularnog lumena, koji se nalaze između epitelnih ćelija hiperplastičnih lobula. Kazein i ostali sekretorni produkti, kao što su karcinoembrionalni antigen (CEA) su takođe konstituenti lobularne sekrecije.³⁹ Obzirom da su intracitoplazmatske mukusne vakuole neuobičajene za ćelije duktalnog karcinoma i praktično odsutne kod hiperplastičnih promena duktalnog i lobularnog epitela, njihovo prisustvo je značajan, ali ne i neophodan kriterijum za dijagnozu LCIS-a.³⁸

U aspiracionim uzorcima se ne može precizno izvršiti razlika između LCIS i invazivnih lobularnih karcinoma. U LCIS-u se takođe može naći nekoliko neuobičajenih citoloških karakteristika. Bleda citoplazma ili svetloćelijska promena je mnogo češća u neneoplastičnim hiperplastičnim lobulima i retko se viđa kod LCIS-a.⁴⁰ Svetloćelijski LCIS je sačinjen od ćelija koje sadrže obilje intracitoplazmatskih mucina. Apokrina metaplazija je takođe opisana kod LCIS-a.⁴¹ Mucin unutar LCIS ćelija koji podleže apokrinim promenama obično se vidi kao citoplazmatska amfofilija ili bazofilija. Sledeća citološka pojava vidljiva u velikoj meri kod atrofičnih lobula u terminalnim duktusima postmenopauzalnih žena, je prisustvo ćelija sa tamno eozinofilnom ili bazofilnom citoplazmom i jače bazofilnim ekscentričnim jedrom. Ovakav izgled je verovatno rezultat kondenzacije citoplazme, udružene sa gubitkom kohezije i skvrčavanja ćelija. Ove ćelije

liče na mioblaste i upućuju na mioidnu formu LCIS-a.²⁸ Slične ćelije sreću se i kod odgovarajuće forme infiltrativnog lobularnog karcinoma, koji može biti pleomorfnog tipa. Ćelije mioidnog tipa lobularnog karcinoma dojke češće imaju intracitoplazmatske mucine. Kod sledeće varijante, ćelije LCIS imaju mozaični ili izgled kivanog jajeta što je rezultat prisustva jasnih međućelijskih granica i prominentnih okruglih centralno postavljenih jedara okruženih svetlom citoplazmom. U ovom tipu LCIS-a se obično nalaze intracitoplazmatske vakuole sa mucinima. *Chen* i saradnici su opisali deset slučajeva LCIS-a koji se mogu označiti kao pleomorfni apokrini LCIS.⁴²

LCIS karakteristično zahvata intralobularne i ekstralobularne ili terminalne duktuse kao i acinusne komponente unutar lobula. Ekstralobularni LCIS u epitelu duktusa i duktula javlja se u 65-78% pacijenata.^{41,43,44} Kod postmenopauzalnih žena sa atrofičnim lobulima, zahvatanje duktusa može da bude jedina manifestacija LCIS-a.^{43,45} Nema upadljive razlike u godinama pacijentkinja koje imaju i koje nemaju duktalno širenje LCIS-a.⁴⁶

Nepravilni izgled pojedinih duktusa zahvaćenih LCIS-om može da se opiše kao izgled zubaca na testeri ili izgled lista deteline. Grupe LCIS-ćelija ispod neneoplastičnog duktalnog epitela formiraju pupoljke koji prominiraju put spolja oko periferije duktusa. Neoplastične ćelije se prostiru kontinualno ili diskontinualno duž duktalnog sistema, potkopavajući i konačno potiskujući normalni duktalni epitel. Kada se to desi, normalni žlezdani epitel ponekad postaje izdignut ili potisnut prema lumenu. Mioepitelni sloj je očuvan u različitom stepenu i može se pokazati imunocitohemijskim bojenjem na aktin, katenin ili p63. U nekim slučajevima izolovane LCIS-ćelije se takođe mogu naći pojedinačno ili u manjim grupama unutar epitela lobula i duktusa sa slikom koja podseća na Padžet-ovu bolest bradavice. Ova slika intraepitelnog rasta se odnosi na Padžetoidno širenje zbog pretpostavke rasta neoplastičnih ćelija, porekla lobula, u duktalni epitel. Kod postmenopauzalnih žena slika "lista deteline" ponekad se pojavljuje kao stvorena "de novo" u duktusima pre nego padžetoidnim širenjem iz lobula. Slučaj ove mikromorfološke alteracije u pojedinim velikim duktusima, uključujući i one u subareolarnom regionu, navode na zaključak da duktusi zadržavaju kapacitet za lobularnu diferencijaciju.⁴⁷ Ovo pruža objašnjenje za nalaz LCIS ili atipične lobularne hiperplazije (ALH) kod biopsija dojke bez klasične lobularne komponente. Pagetova bolest

skvamozne površine bradavice nije odlika LCIS-a, osim u veoma retkim slučajevima kada postoji razvijeno padžetoidno širenje u duktusima.⁴⁸ Neobični obrazac zahvatanja duktusa se javlja kada se LCIS razvija u duktusima već izmenjenim kolagen sferulozom.⁴⁹ Ovakva konfiguracija imitira kribriformni intraduktalni karcinom. Kada LCIS uključuje kolagen sferulozu, mioepitel može da bude dokazan imunohistohemijskim bojenjem na p63 i kalponin. U diferencijalnoj dijagnozi padžetoidne promene treba uzeti u obzir dve abnormalnosti: 1. histiocyte u epitelu i 2. epiteloidnu mioepitelnu hiperplaziju ćelija. Na velikom povećanju intraepitelni histiocyti imaju obično penušavu citoplazmu, ponekad sa lipofuscinskim ili hemosiderinskim pigmentom i malim tamnim jedrima. Intracitoplazmatski mucin je odsutan u histiocitima i oni nisu imunoreaktivni na citokeratin. Epiteloidna mioepitelna hiperplazija se češće zamenjuje sa padžetoidnim širenjem LCIS-a nego sa prisustvom intraepitelnih histiocita. Epiteloidne mioepitelne ćelije imaju obično prozirnu vezikularnu citoplazmu. Osim u papilomima, hiperplastične mioepitelne ćelije uglavnom su raspoređene u jednom sloju što manje raslojava epitel u odnosu na padžetoidno širenje LCIS-a. U ovom slučaju p63 antitelo je najpouzdanije, jer postoji nuklearna reaktivnost u epiteloidnim mioepitelnim ćelijama, dok su ćelije LCIS-a p63 negativne.²⁸

U najrazvijenijem obliku zahvatanja duktusa, LCIS proliferiše i formira solidnu masu tumorskih ćelija koje ispunjavaju i proširuju lumen duktusa. Ovakvi fokusi mogu da razviju centralnu nekrozu i kalcifikacije, što može da se otkrije na mamogramu. Ova razvijena forma LCIS-a je E-cadherin negativna i po tome se razlikuje od intraduktalnog komedo-karcinoma koji je E-cadherin pozitivan.⁵⁰ Razvijeni LCIS sa nekrozom može da sadrži klasične, pleomorfne ili obe vrste ćelija. U nekim slučajevima citoplazma pleomorfnih LCIS ćelija ima apokrina svojstva.

Pažljivim pregledom obično se otkriva karakterističan nalaz na terenu adenoze u kome su žlezde okružene bazalnom membranom, mioepitelnim ćelijama i stromom. Ovi elementi se mogu dokazati bojenjem na retikulin i imunohistohemijski se mogu dokazati proteini bazalne membrane (laminin, kolagen tip 4) i mioepitel. Istanjene vretenaste mioepitelne ćelije perzistiraju u sklerozirajućoj adenozi i mogu da budu istaknute kada se ova lezija kolonizuje LCIS-om.⁵¹ Miofibroblastna proliferacija u stromi može da maskira mioepitelne ćelije u sklerozirajućoj adenozi. Invazija se teško otkriva kada neoplastične

ćelije ostaju u konfiguraciji sklerozirajuće adenoze. Potvrda invazije, kada postoji LCIS u sklerozirajućoj leziji, se zasniva na nalazu tumorskih ćelija u stromi, uz odsustvo mioepitelnih ćelija, što se dokazuje imunohistohemijski. U ovom slučaju naročito je korisno bojenje na citokeratine.

Većina lobula je okružena fibroznom stromom, ali retko su lobuli locirani u masnom tkivu dojke. Ovakav nalaz može da imitira invazivni karcinom. Važne karakteristične osobine koje idu u prilog LCIS-a lokalizovanog u masnom tkivu su: prisustvo jasno ograničenih žlezda sa LCIS-om, komponente bazalne membrane i mioepitelne ćelije. Antitela na p63, CD 10, kalponin i aktin dokazuju mioepitel. Mioepitel i bazalna membrana su odsutni kada infiltrativni lobularni karcinom zahvata masno tkivo.²⁸

2.2.2 Atipična lobularna hiperplazija

Zajednički naziv za atipičnu lobularnu hiperplaziju (ALH) i LCIS je lobularna neoplazija (LN), "in situ" lobularna neoplazija ili lobularna intraepitelna neoplazma (LIN).^{52,53,54} Kliničke indikacije za biopsijsku proceduru kod ALH su identične onima za detekciju LCIS, a to su palpabilna lezija ili mamografska abnormalnost. ALH je obično slučajan nalaz i ona nije specifično vezana za abnormalnosti koje su dovele do dijagnostičke procedure. U oko 9% slučajeva ALH su u sklopu radiografskih abnormalnosti.⁵⁵

Kriterijumi za precizno razlikovanje ALH i LCIS-a ne postoje. Moraju se uzeti u obzir kvalitativni i kvantitativni faktori.²⁸ Autori uglavnom preporučuju da se lezija koja je kvantitativno na nivou ispod LCIS-a klasifikuje kao atipična lobularna hiperplazija. Drugi smatraju da se dijagnoza ALH može postaviti kada lobularne promene zahvataju manje od 50% volumena jednog lobula ili manje od jednog kompletnog lobula, pa se može zaključiti da se dijagnoza ALH postavlja kada manje od 75% lobula pokazuje karakteristike LCIS-a.²⁸ Kvalitativno, ALH se karakteriše prisustvom abnormalnih ćelija sličnih kao kod LCIS-a unutar jednog ili više lobula ili duktula. Kod najmanje upadljivog oblika, ove ćelije zamenjuju deo normalnog lobularnog žlezdanog epitela, brišući lumene. Na ovom stupnju proliferacije acinarne jedinice nisu uvećane. Kada se proces

razvije, nakupljanje većeg broja ovih ćelija uzrokuje progresivno acinarno širenje, ali granice pojedinih acinarnih jedinica i intralobularnih duktula ostaju nejasne. Ćelije u ALH skoro uvek imaju manjak intracitoplazmatskih mucina, a gubitak kohezije nije izražen. Slični kriterijumi se mogu primeniti za neke lobularne proliferacije koje zahvataju terminalne duktuse. Takve promene imaju tendenciju javljanja oko, pre nego u duktalnom lumenom, formirajući obrazac "lista deteline". Lumen takvih duktusa obično je jasno definisan posebnim slojem kuboidalnih ili pločastih duktalnih ćelija. Protruzija put spolja od lumena su kružni džepovi ili izbočenja, koja se mogu stvarati u kontinuitetu sa glavnim duktusnim lumenom, ili su pak popunjene različitom količinom neoplastičnih ćelija. Kada se takvi duktusi preseku transversalno ili tangencijalno, izbočenja prema spolja imaju simetričnu distribuciju opisanu kao izgled zubaca na testeri. Zajedničko za ALH i LCIS je da su E-cadherin negativni.^{56,57}

2.2.3 Diferencijalna dijagnoza između LCIS-a i ALH

Diferencijalna dijagnoza LCIS-a obuhvata brojne proliferativne promene koje zahvataju terminalne duktuse i lobuluse. Te promene uključuju hiperplaziju nalik onoj u trudnoći ili pseudolaktacionu hiperplaziju, svetloćelijske promene, apokrinu metaplaziju i ALH. Osim ALH, epitel kod svih ovih promena je E-cadherin pozitivan. Hiperplazija nalik onoj u trudnoći pojavljuje se kod premenopauzalnih žena koje nisu trudne i kod postmenopauzalnih žena. Ćelije mogu da imaju vakuolizovanu citoplazmu, atipične apikalne čuperke ("izdanke") i hiperhromatična atipična jedra. Psamomaliki kalcifikati koji se razvijaju u ovim lezijama omogućuju da ove lezije budu detektovane mamografski i igleno-biopsijskim procedurama. Svetloćelijske promene koje se dešavaju u pre- i postmenopauzalnih žena mogu da budu varijante apokrine metaplazije; zato su one ponekad prisutne istovremeno u istom lobulu. Svetloćelijska promena obično ne formira kalcifikate i često je slučajni nalaz na hirurškim ili iglenim biopsijskim uzorcima. Apokrina metaplazija u lobularnoj hiperplaziji se manifestuje eozinofilijom citoplazme. Pravilna ćelijska distribucija ove promene je obično razlikuje od LCIS-a sa eozinofilijom citoplazme, od lobularnog zahvatanja pleomorfnog LCIS-a i od lobularnog širenja apokrinog intraduktalnog karcinoma.²⁸

Obzirom na činjenicu da su mutacije na genskom lokusu CDH 1 za E-cadherin uvek prisutne kod LCIS, može se napraviti poređenje u odnosu na ALH gde su ove mutacije veoma retke.⁵⁶ Opažanja da se reaktivnost za E-cadherin, Alfa- i Beta-katenin gubi i kod LCIS-a i kod ALH, a da su mutacije u E-cadherin genu nađene skoro samo u LCIS-u, sugerišu da su mehanizmi drugačiji od mutacija odgovorni za inaktivaciju E-cadherina i proteina u vezi sa njim. Ostaje da se determiniše da li je nagomilavanje mutacija u CDH 1 genu nužno za evoluciju ALH u LCIS i u krajnjoj liniji za razvoj invazivnog lobularnog karcinoma.

Procene rizika za prateći karcinom u žena sa ALH su otežane zbog nepostojanja jasne definicije za ovu leziju.

2.2.4 Imunohistohemija LCIS-a

LCIS obično pokazuje nuklearnu imunoreaktivnost na estrogenske i progesteronske receptore.⁵⁸⁻⁶⁰ Ekspresija je mnogo češće prisutna kod klasičnog LCIS-a sa niskim nuklearnim gradusom nego kod pleomorfni varijanti LCIS-a. Imunohistohemijska membranska reaktivnost HER 2/neu se vrlo retko zapaža kod LCIS-a, a u slučaju da je prisutna, udružena je sa pleomornim podtipom LCIS-a.^{42,58,61,62} Prekomerna ekspresija p53 imunohistohemijski se ne detektuje kod klasičnog LCIS-a. Nuklearni proliferativni marker Ki-67 je nizak kod klasične forme LCIS-a,⁵⁸ dok se pleomorfni LCIS karakteriše Ki-67 indeksom većim od 10%.⁶³ E-cadherin imunohistohemijsko bojenje je jako pozitivno u neneoplastičnom duktalnom epitelu i lezijama koje potiču od njega, uključujući i intraduktalni karcinom. Normalni i neneoplastični (hiperplastični) lobularni epitel je takođe jako E-cadherin pozitivan. Većina neoplastičnih lobularnih lezija se karakteriše odsustvom E-cadherin reaktivnosti, a pojedine neoplastične lobularne ćelije pokazuju fragmentiranu i diskontinualnu E-cadherin reaktivnost.^{64,65}

2.2.5 Mikroinvazija

Termin mikroinvazija se koristi kod invazivnih karcinoma manjih od 1mm (T1mic). Invazivni fokusi 1 mm ili veći se opisuju preko dijametra izmerenog na histološkom preseku. Mikroinvaziju treba tražiti naročito kada uzorak sadrži razvijeni LCIS sa izrazitim uvećanjem duktulolobularnih struktura praćenih nekrozom i kalcifikacijom. Jedva primetne nepravilnosti granica lobula koje ukazuju na poremećenu bazalnu membranu su takođe bitni u razvijenom LCIS-u. Kad se primenom hirurške ili iglene biopsije dojke utvrdi LCIS ili ALH, tkivo treba detaljno i pažljivo ispitati na prisustvo fokusa invazivnog lobularnog karcinoma (ILC).

Pošto mali broj ćelija klasičnog ILC-a može da bude težak za razlikovanje od zapaljenjskih ili stromalnih ćelija, imunohistohemija se često koristi u ovim slučajevima. Naročito su korisna antitela na citokeratin 7 i AE1/AE3 za isticanje tumorskih ćelija u stromi. Preporučuje se dvostruko imunohistohemijsko bojenje na aktin i citokeratin za otkrivanje malih ili mikroinvazivnih fokusa lobularnog karcinoma u sklerozirajućim lezijama.⁶⁶

2.3 INVAZIVNI LOBULARNI KARCINOM DOJKE

Termin lobularni karcinom konačno je ustanovljen 1941.god. sa publikacijom Foote i Stewarta.¹⁷ Po njima „...kada tumor infiltrira on to čini na specifičan način koji omogućava osobi sa iskustvom da prepozna njegovo poreklo“. Udružena dezmodoplastična stromalna reakcija, linearni raspored ćelija karcinoma i njihova tendencija da rastu formirajući krugove oko duktusa i lobula ("target"-odni rast) bila su specifična dijagnostička obeležja naglašena od strane Foote i Stewarta.¹⁷ Kada se dijagnoza striktno zasniva na kriterijumima Foote i Stewarta invazivni lobularni karcinom obično čini 5% ili manje karcinoma svih serija.⁶⁷ Ako se zastupaju blaži dijagnostički kriterijumi, frekvencija invazivnih lobularnih karcinoma iznosi od 10 do 14 % invazivnih karcinoma.^{68,69} Studija populacije žena sa invazivnim karcinomom dojke dijagnostifikovanim od 1987. do 1999. pokazala je da je incidenca invazivnog lobularnog karcinoma porasla tokom ovog

perioda.⁷⁰ Povećana incidenca invazivnog lobularnog karcinoma bila je najveća kod žena starijih od 50 godina. U većim serijama uzastopnih slučajeva nije zabeležena povećana učestalost invazivnog lobularnog karcinoma potvrđena imunohistohemijski E-cadherinom.²⁸

2.3.1 Kliničke karakteristike invazivnog lobularnog karcinoma dojke

Invazivni lobularni karcinom (ILC) može da se javi u skoro svim starosnim dobima žena (28-86 godina). U većini studija su prisutni podaci koji se tiču prosečne starosti žena u vreme postavljanja dijagnoze i to je između 45 i 56 godina.^{67,68,71-74} Invazivni lobularni karcinom je relativno češći kod žena starijih od 75 godina (11%) u odnosu na žene mlađe od 35 godina.⁷⁵ Prilikom analize žena sa različitim tipovima karcinoma dojke prosečna starost bolesnica sa ILC-om i invazivnim duktalnim karcinomom, za oba tipa, je 57 godina.⁷⁵ U tri studije nađeno je da su bolesnice sa klasičnim invazivnim lobularnim karcinomom mlađe od bolesnica sa različitim podtipom invazivnog lobularnog karcinoma.^{68,72,76} Četvrta studija pokazala je da su bolesnice sa različitim podtipom tumora bile prosečno mlađe (47 godina) od onih sa klasičnim tipom tumora (53 godine).⁷⁴ Prisutni simptom kod većine slučajeva je loše ograničena masa, ali u nekim slučajevima jedini dokaz neoplazme je nejasno zadebljenje i/ili sitna difuzna nodularnost. Velike lezije češće uzrokuju retrakciju kože ili fiksaciju, ali se ti znaci mogu pripisati malim površinskim tumorima. Nekoliko autora je saopštilo manju učestalost kalcifikata detektovanih mamografski u ILC-ima nego kod duktalnih karcinoma.⁷⁷⁻⁷⁹ Rodenko i sar. našli su da je MRI mnogo efikasnija od mamografije za definisanje veličine primarnog lobularnog karcinoma u značajnom procentu slučajeva.⁸⁰ Yeh i sar. saopštili su da je tumorska morfologija, koja se vidi na MRI kombinovana sa kvantitativnim merenjem preuzimanja gadolinijuma, bila efikasna za detekciju invazivnih lobularnih karcinoma u većini slučajeva.⁸¹ U nekim slučajevima invazivni lobularni karcinom je bio udružen sa smanjenjem veličine dojke na mamografiji, mada promene u veličini nisu klinički zapažene.⁸² Ove bolesnice uglavnom pokazuju zadebljanje pre nego izdvojenju masu na kliničkom ispitivanju, što odgovara difuznom invazivnom karcinomu dojke. Ultrazvučno, 60,5% ILC-a vide se kao heterogena hipoehogena masa sa uglastim

ili loše definisanim marginama i pozadinskim zasenčenjem.⁸³ Ostali tumori imaju drugačije ultrazvučne karakteristike, uključujući i 12% onih koji se ultrazvukom ne mogu videti. Senzitivnost ultrazvuka za tumore manje od 1 cm je 85,7%. Klasični invazivni lobularni karcinom teži da formira „fokalne senke bez izdvojene mase“ dok tumori sa pleomorfnim karakteristikama se vide kao „mase u vidu senke“ . Tumori alveolarne, solidne i "signet ring" klase se najčešće manifestuju kao „lobulirane, jasno ograničene mase“.⁸³ Ultrazvuk je koristan za otkrivanje multifokalnih i multicentričnih invazivnih lobularnih karcinoma.⁸⁴ Selinko i sar. zapazili su da je senzitivnost ultrazvuka za otkrivanje ILC 98%, značajno veća od senzitivnosti mamografije (65%).⁸⁵

Poređenjem mamograma ILC-a i drugih tipova karcinoma dojke, zapaža se da su lobularni karcinomi ("nareckane"- "spiculated" forme) mnogo češće u vezi sa retrakcijom bradavice ili kože dojke.^{79,86} Najčešća mamografska manifestacija ILC-a je asimetrična, slabo ograničena ili iregularna (izreckana) tkivna masa.^{77,79,87} Karcinomi sa mešovitim lobularnim i duktalnim karakteristikama teže da imaju mamografska obeležja koja se nalaze na sredini ove dve grupe. Prema nekim studijama u 46% slučajeva mamograma, ponovnom analizom je dokazano prisustvo ILC-a, mada je u početku nalaz bio negativan.⁷⁸

Odsustvo dobro definisanih margina, a u nekim slučajevima tendencija da se formiraju multipni čvorići kroz celu dojku, su karakteristike koje mogu da otežaju radiološku detekciju ILC-a, što vodi u lažno-negativnu dijagnozu. Bolesnice sa tumorom u vidu nazubljene mase imaju manju verovatnoću da imaju rezidualni karcinom kada se uradi reekscizija, od onih sa loše definisanom asimetričnom lezijom.⁸⁷ Manji broj ILC-a se mamografski vidi kao okrugli ili ovalni tumor.⁸⁸

Mendelson i saradnici su opisali pet mamografskih nalaza koji mogu da ukažu na ILC. To su: 1) asimetrična gustina bez jasnih margina; 2) gusta nazubljena masa; 3) čvrsta dojka bez očiglednog tumora; 4) mikrokalcifikati i 5) diskretna okrugla masa.⁸⁹ Asimetrična, loše ograničena gustina je najčešći nalaz. Zbog toga ILC ne formira specifični ili karakteristični mamografski izgled. ILC se češće registruje u vremenskom intervalu između dva skrininga.⁹⁰ Kepple i saradnici su saopštili da je u njihovoj seriji od 29 ILC-a 41% mamograma opisano kao normalno. Promene detektovane u ostalih 59%

slučajeva imale su izmene u arhitektonici (28%), prezentovane su kao mase (24%), a imale su mikrokalcifikate u 7%. Merljive lezije su nađene samo u 14% slučajeva.⁹¹

2.3.2 Multifokalnost, multicentričnost i bilateralnost karcinoma dojke

Karcinom dojke obično se prezentuje kao fokalna abnormalnost unutar dojke. Multipli karcinomi dojke, posebno kada se nalaze u ipsilateralnoj dojci su izazov za patologe i za kliničare u smislu identifikacije porekla ćelija i najboljeg terapijskog pristupa. Mnogo je dabata oko prevalence multicentričnih karcinoma dojke, sa saopštenom učestalošću od 4-65% slučajeva.⁹²⁻⁹⁶ Isto tako, multifokalni karcinom dojke dešava se u oko 60% slučajeva karcinoma dojke, a 4-5% pacijenata sa karcinomom dojke imaju bilateralnu bolest u vreme dijagnoze.⁹²

Originalna klasifikacija karcinoma kao multicentrični ili multifokalni bazirana je na pretpostavci da se karcinomi koji se razvijaju u jednom kvadrantu dojke vrlo verovatno razvijaju u istim duktalnim strukturama, u odnosu na one koji se razvijaju u razdvojenim oblastima dojke. Molekularne studije ukazuju da se većina, ali ne i svi, multicentričnih karcinoma razvijaju iz istih ćelija.⁹⁷ Dowson i saradnici su posmatrali opseg imunohistohemijskih i histoloških markera u multifokalnim/multicentričnim (mf/mc) karcinomima dojke. Analizom su našli karakteristike koje ukazuju na zajedničko klonalno poreklo u 17 od 24 slučaja.⁹⁸ Middleton je kod 31 od 32 pacijenata sa multicentričnim karcinomom, našao oba tumora iste histologije i gradusa, a 72% pacijenata imalo je "in situ" karcinom u oba tumora. Imunohistohemijsko bojenje za hormonske receptore, HER 2/neu i Ki67 se poklapalo u 11 od 14 slučaja. Kod jednog pacijenta sa 2 histološki različita tumora (ILC i IDC) imunohistohemijski rezultati su bili konkordantni.⁹⁸

U literaturi je saopšteno da 17% karcinoma dojke su imale multipne lezije koje se nalaze u istom kvadrantu dojke, a 37% u različitim kvadrantima.⁹⁵ Holland i saradnici ispitivali su mastektomijske uzorke 282 pacijenta sa T1 i T2 invazivnim karcinomima koji su klinički ili radiografski izgledali kao unicentrični. Samo kod 37% pacijentkinja nisu nađeni dodatni tumorski fokusi. Dodatni fokusi tumora prisutni unutar 2 cm od opisanog karcinoma, viđeni su u 20% slučajeva, a ostalih 43% imalo je fokuse na većoj

udaljenosti.⁹² Multicentrični fokusi su bili i kod invazivnih i intraduktalnih karcinoma, a njihovo prisustvo nije bilo u korelaciji sa veličinom primarnog tumora.

Mada su studije pacijenata sa invazivnim tumorima imale dosledno verifikovane multicentrične procese tumora, nalazi kod DCIS-a bili su manje uniformni. Grump i saradnici saopštili su da 81% pacijenata sa DCIS-om ima multifokalnu ili multicentričnu bolest, a Schwartz saopštava incidencu multicentričnosti DCIS-a od 45%.⁹² Zbog poprečnih preseka istog duktusa, na mikroskopskim pločicama se mogu pojaviti odvojeni tumorski fokusi, tako da je kod većine ovih studija incidenca multicentričnosti DCIS-a precejena.⁹²

U vreme kada je mastektomija jedina hirurška opcija za karcinom dojke, prisustvo mikroskopskog multifokalnog ili multicentričnog tumora ima samo akademski značaj. Mnoge prethodno opisane studije govore protiv kompletnog odstranjivanja dojke kao jedinog mogućeg rešenja za karcinom dojke. Nasumične studije pokazale su da se većina tih subkliničkih tumorskih fokusa dobro kontrolišu radioterapijski.^{95,96} Tako su termini multifokalna i multicentrična bolest rezervisani za pacijente sa multipnim tumorima dokazanim kliničkim ispitivanjem, mamografski, ultrazvukom i rutinskim patološkim ispitivanjem.

Prema podacima iz literature do sada nije postignuta saglasnost oko faktora koji su u vezi sa razvojem multicentričnih karcinoma. Fukutami i saradnici su upoređivali incidencu multicentričnosti kod 469 pacijentkinja sa familijarnim karcinomom dojke i 3334 sa sporadičnim karcinomom dojke tretiranih u istom periodu.⁹² Nije bilo razlike u globalnoj incidenci multicentričnosti, mada je zapažena neznatno veća incidenca multicentričnih karcinoma kod premenopauzalnih žena sa familijarnim karcinomom dojke.

Studije koje su ispitivale patološke osobine karcinoma kod žena sa BRCA 1 ili BRCA 2 mutacijama saopštile su povećanu incidencu multicentrične bolesti.⁸⁴ Histološki podtip invazivnog karcinoma se nije pokazao kao prediktivni faktor multicentričnosti. Starije studije sugerišu da su infiltrativni lobularni karcinomi mnogo skloniji ka multicentričnom rastu, a kada se LCIS izuzme, multicentričnost nije tako učestala kod ILC-a.^{84,92}

Prisustvo klinički ili mamografski evidentnog multicentričnog karcinoma, sigurna je kontraindikacija za poštedne terapijske procedure (BC-47).⁹⁹

Bilateralni karcinom dojke označava pojavu odvojenih primarnih karcinoma dojke koji se razvijaju u obe dojke. Opisani su kao sinhroni kada se tumori dijagnostificiraju unutar 6 meseci jedan od drugog i kao metahroni ukoliko se dijagnostikuju u intervalu većem od 6 meseci između pojavljivanja.⁹²

Pitanje koje se javlja kada je u pitanju bilateralni karcinom dojke je da li su prisutne dve primarne lezije ili je to jedan primarni tumor koji je metastazirao u kontralateralnu dojku. Kriterijumi koji se koriste u razlikovanju primarnog od metastatskog tumora uključuju prisustvo "in situ" promena u kontralateralnoj leziji, različit histološki izgled, razlike u stepenu diferencijacije između lezija i odsustvo drugih dokaza lokalnog ili sistemskog širenja primarne promene.¹⁰⁰ Korišćenjem tih kriterijuma, metastaze u kontralateralnoj dojci su retke, osim ako nije prisutna jako uznapredovala metastatska bolest ili lokalno uznapredovali karcinom dojke. Molekularne studije podržavaju gledište da su mnogi bilateralni karcinomi dojke nezavisni tumori.¹⁰¹ Teixera i saradnici su komparativnom genomskom hibridizacijom ispitivali 7 bilateralnih karcinoma dojke i utvrdili da su 6 od 7 pojava nezavisni tumori.¹⁰¹ Slični nalazi su saopšteni i od strane Agelopoulou i saradnika kod 16 bolesnica sa sinhronim bilateralnim karcinomima dojke, i studije alelskog imbalancea kod 28 bilateralnih karcinoma dojke, gde je zajednička klonalnost isključena kod 28 slučajeva.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Lee i saradnici su izračunali da je frekvencija javljanja kontralateralnog karcinoma posle 10 godina praćenja 10%.^{105,106} Za pacijente sa invazivnim lobularnim karcinomima u principu se smatra da imaju izuzetno veliki rizik bilateralnog karcinoma u poređenju sa ženama sa drugim tipovima karcinoma.¹⁰⁴ Široki globalni opseg procenta bilateralnosti koji je opisan, ide od 6-47% i zavisi od toga kako su podaci prikupljeni i tabelarno prikazani, pa je bilateralnost opisana u 6-28% slučajeva.^{67,68,71-73,107,108} Postoje dokazi da je frekvencija bilateralnosti veća u pacijenata sa klasičnim invazivnim lobularnim karcinomima nego u bolesnica sa različitim podtipovima ILC-a.¹⁰⁶ Studije praćenja su pokazale da je razvoj kontralateralnog karcinoma kod bolesnica prethodno tretiranih zbog ILC-a 10-14%.^{68,106,107} Lobularna komponenta nađena je u većini sinhronih ili metahronih kontralateralnih karcinoma, a najmanje 50% njih je invazivno.^{73,68,108,109}

Saopšteno je da se LCIS viđa u 17%, a ILC kod 3% kontralateralnih profilaktičkih mastektomija.¹¹⁰

Verovatnoća da postoji kontralateralni invazivni karcinom značajno je veća u žena koje imaju multicentrični invazivni karcinom ipsilateralne dojke, ili metastaze u ipsilateralnim limfnim čvorovima.²⁸ Prema studijama nekih autora, kontralateralni intraduktalni karcinom se mnogo češće viđa u žena sa ipsilateralnim lobularnim karcinomima (5,2%), nego u onih sa ipsilateralnim duktalnim karcinomima (1,1%).¹¹¹

2.3.3 Makroskopski izgled i veličina invazivnog lobularnog karcinoma dojke

Veličina ILC-a varira i kreće se od vizuelno okultnih promena mikroskopskih dimenzija, do tumora koji difuzno zahvataju čitavu dojku. Tipično za ILC je da je to jedan čvrst do tvrd tumor sa nejasnim granicama. Ivice promene se mogu mnogo jasnije odrediti palpacijski nego inspekcijski, zato što granica može biti neprimetna, izmešana sa okolnim parenhimom. Cistične formacije, hemoragija, nekroza ili makroskopski vidljivi kalcifikat u formi "tragova krede" u principu nisu prisutni. Većina tumora su sivi ili beli, skiroznog ili fibroznog izgleda. Čelijske varijante ILC-a se ponekad opisuju kao promene žuto-mrke boje.²⁸

Kod nekih slučajeva, ekscizionna biopsija ne mora biti vizuelno abnormalna i samo je blago čvrsta pri palpaciji, mada je znatno zahvaćena tumorom koji je evidentan pod mikroskopom.¹¹² Sledeća makroskopska manifestacija ILC-a je formiranje brojnih sitnih, čvrstih čvorića koji podsećaju na minimalne kamenčiće ili zrnca peska u parenhimu dojke. Ovi fokusi imitiraju mikroskopski i makroskopski izgled sklerozirajuće adenoze. Kompaktni tvrdi fokusi ili sitni čvorići mogu biti jedini dokaz karcinoma u kontralateralnom biopsijskom uzorku dojke, kada se kliničkim pregledom za suprotnu dojku, smatralo da nije izmenjena.²⁸

2.3.4 Mikromorfološke karakteristike i podtipovi invazivnog lobularnog karcinoma dojke

Pet godina nakon opisa LCIS-a, Foote i Stewart dali su opis invazivnog lobularnog karcinoma.¹¹² Infiltrativni deo lobularnog karcinoma tipično pokazuje trake

tumorskih ćelija koje su uglavnom slobodno rasute po fibroznoj stromi. Posle nastale infiltracije, ne postoji tendencija ćelija da simuliraju atipične lobule. Način rasta u vidu širokih plaža očigledno nije karakterističan, a velika celularnost u primarnom tumoru je retka, ali je opisana.¹¹²

Na citološkom nivou, tumorske ćelije su opisane kao ćelije male do srednje veličine, prilično uniformne u pogledu bojenja, a pokazuju relativno male nepravilnosti. Zbog izuzetno malih kancerskih ćelija i gustog rasporeda ćelija koje se nalaze u metastatskim limfnim nodusima, Foote i Stewart su upozorili na mogućnost pogrešne dijagnoze, kao što su npr. metastaze limfoma. Oni su istakli prisustvo centralnih mukoidnih kapi u tumorskim ćelijama kao dijagnostički znak koji može biti od pomoći.¹⁷

2.3.4.1 Promene u stromi invazivnih karcinoma dojke

Mezenhimalne promene poznate kao stromageneza, dešavaju se paralelno sa tumorogenezom, a liče na inflamatorni odgovor tokom zarastanja rana ili fibroze.¹¹³⁻¹¹⁹ Stromageneza je reakcija vezivnog tkiva domaćina koja je indukovana neoplazmom, pratećim razvojem tumora i može se podeliti u tri različite faze: 1) normalnu, 2) glavnu (osnovnu) i 3) aktiviranu (udruženu sa tumorom).^{116,120}

Dominantni ćelijski tip u normalnoj stromi su fibroblasti u stanju mirovanja i njihov ekstracelularni matriks, za koje se veruje da ograničavaju tumorsku progresiju delujući kao prirodna barijera.^{114,121-124} Međutim, rani hiperplastični tumori mogu pokrenuti mezenhimalne promene u osnovnoj stromi i izazvati, stimulisati ili podržati (umesto ograničenja) tumorsku progresiju.^{117,119,125-129} Tokom te paralelne progresije stroma postaje potpuno aktivirana, a fibroblasti strome počinju sa ekspresijom više specifičnih gena, kao što je kolagen tipa 1.¹³⁰ Kroz kasno aktiviranu fazu strome tumor postaje invazivan i dobija metastatski potencijal.^{131,132} Karakteristike aktivirane strome mogu se manifestovati kao dezmozoplastična ili onkofetalna tumorska mikrosredina.¹¹⁴

Dezmoplastični stromalni fenotip može da bude izgleda ožiljka, jako fibrozan i čini više od 50% tumorske mase. Najbrojnije stromalne ćelije kod dezmozoplastične reakcije su fibroblasti.^{114,115,128,133}

Kod dezmoplazije, miofibroblasti unutar tumorske strome proizvode i organizuju ekstracelularni matriks (ECM) bogat fibronektinom i povišenim nivoom kolagena tipa 1.¹³¹ Osim toga, visoko proliferativni fibroblasti i tumorska stroma bogata fibronektinom i kolagenom tipa 1 često je udružena sa lošijom prognozom karcinoma dojke.¹³⁴ Postoje i sugestije da se osnovna (glavna) stroma nasleđuje ili stiče, a takva tumorska stroma potpomaže epitelnu transformaciju kroz mutacije (mutagenezu).¹¹⁷

Zbog nedostatka odgovarajućih, fiziološki bitnih, eksperimentalnih modela događaji koji su pokretači stromalne inicijacije i mehanizmi koji podstiču i podržavaju progresiju tumora su uglavnom nepoznati.¹³⁵

Mada su studije iz 50-ih godina prošlog veka predložile da dezmoplazija predstavlja nezreli (preegzistirajući) kolagen,¹³⁵ sada postoje jasni dokazi da kolagen sintetišu miofibroblasti koji su prisutni u intersticijumu.^{136,137} Opisano je nekoliko mehanizama kojima se mogu aktivirati miofibroblasti da sintetišu kolagen. To uključuje imune citokinske mehanizme i mikrovaskularno oštećenje,¹³⁷ sa karakteristikama identičnim kao kod zarastanja rana¹³⁸ i parakrinu aktivaciju miofibroblasta faktorima rasta koje oslobađaju tumorske ćelije.^{139,140} Različiti faktori rasta, kao što su transformišući faktor rasta (TGF)- α , TGF- β , insulinu sličan faktor rasta (IGF)-I, IGF-II i trombocitni faktor rasta (PDGF) su aktivirani kao produkti sekrecije kancerskih ćelija, a oni mogu da stimulišu ćelije strome.¹⁴¹⁻¹⁴⁴ Faktori rasta kao što su TGF- β , produkovan od strane tumorskih ćelija, je naveden kao najodgovorniji za transdiferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste.¹⁴⁵ Osim transdiferencijacione uloge, TGF- β u tumorima ima brojne uloge: dovodi do značajnijih promena u citokinskom balansu, proteinima ECM, proteinazama i njihovim inhibitorima i obezbeđuje ukrštanje informacija od značaja za invaziju i preživljavanje, angiogenezu i izbegavanje nadzora od strane imunog sistema.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

Uloga dezmoplastične reakcije kod progresije karcinoma dojke je još uvek nije jasna, a može se menjati u zavisnosti od prirode same reakcije. U stadijumu "in situ" karcinoma, maligne epitelne ćelije sekretuju faktore rasta (PDGF¹⁴⁹ i/ili TGF- β ¹⁵⁰ sa/bez drugih faktora) i tako stimulišu miofibroblaste u okolnoj stromi. Tako se sintetišu različiti stromalni proteini (kao što su fibronektin, tenascin i kolageni tipa 1 i 3),

metaloproteinaze^{151,152} i faktori rasta sa angiogenim efektima, koji pomažu u invaziji, daljem rastu kancerskih ćelija i potpomažu metastaziranje.¹⁵³

Postoji još mnogo nerazjašnjenih činjenica u vezi dezmoplastičnog odgovora sa potrebom definisanja jasnih kriterijuma koji će povući paralelu između "in situ" i invazivnih karcinoma dojke, uz detaljno ispitivanje značajnosti u okviru primarnih karcinoma dojke.¹⁵⁴

Razvoj i progresija tumora se smatra posledicom disbalansa između apoptoze i proliferacije transformisanih ćelija.¹⁴⁵ Međutim, progresija u smislu maligniteta zahteva dinamičku interakciju između tumorskih ćelija i okoline u kojoj one "napreduju". Ova interakcija omogućuje promene u tumorskoj stromi, uključujući i pojavu dezmoplazije.¹⁵⁵

Glavne karakteristike ćelijsko-stromalnih interakcija su određene proteoglikanima ECM-a. Oni predstavljaju kompleksni dinamični sistem interakcija sa epitelnim strukturama u periodu razvoja dojke, modifikaciji tkiva dojke i patološkim stanjima.¹⁵⁶ Značajni član familije matriksnih proteoglikana uključen u modifikacije strome zbog neoplastičnih signala ili reparativnih procesa u dojci je verzikan. Verzikan je hijaluron-vezujući protein sa različitim i kompleksnim ulogama u ćelijsko-stromalnim komunikacijama i u izmenama sastava strome. On reguliše ćelijsku adheziju antiadhezivnom aktivnošću svog G 1 domena i proadhezivnom aktivnošću G 3 domena.¹⁵⁷ Kod adultnih tkiva verzikan se nalazi u elastičnim vlaknima i laminama vezivnog tkiva. Kod normalne dojke on pravi tanak rub oko lobula i duktusa.¹⁵⁸

Geni koji su identifikovani u ćelijama invazivnog fronta karcinoma dojke su odraz prisustva različitih komponenti stromalnog odgovora domaćina, uključujući remodelovanje ECM-a (na primer *collagen 1a1*),¹⁵⁷ angiogenezu (na primer IGFBP 7 i *osteonectin*),¹⁵⁹ imuni odgovor (na primer *immunoglobulin heavy chain γ3*), povećanu proliferaciju (*cdk inhibitor 3* i *SMC 4-like 1*)^{160,161} ili povećanje nivoa transkripcije (ribozomalni proteini).¹⁶² Moguće je da ekspresija gena specifičnih za invaziju ima veze sa organom u kome dolazi do stromalne reakcije.¹⁶³ Geni specifični za invaziju kod pojedinih tipova karcinoma su identifikovani, pre svega, zbog njihove pojačane ekspresije u kvantitativnom smislu.¹⁶³

Elastoza je takođe značajan stromalni odgovor kod invazivnih duktalnih i kod invazivnih lobularnih karcinoma, bez značajnijih razlika između ova dva tipa karcinoma

dojke. Sa druge strane, medularni karcinomi dojke ne izazivaju značajniju elastoza. Faktori koji pospešuju pojačanu produkciju elastičnih vlakana i prognozni značaj elastoze nije sasvim jasan.¹⁶⁴

Invazivni lobularni karcinomi imaju identičnu reakciju strome kao i invazivni duktalni karcinomi.¹⁶⁴ Ranije se smatralo da su elastična vlakna koja se nalaze u karcinomima dojke produkti neoplastičnih ćelija.^{165,166} Međutim, elektronmikroskopske studije su pokazale da se fibroblasti i miofibroblasti, u invazivnim karcinomima dojke sa izraženom stromalnom reakcijom, nalaze u izobilju elastičnih i kolagenih vlakana.¹⁶⁴ Ipak, ustanovljeno je da su fibroblasti i glatkomišićne ćelije sposobne za produkciju elastičnih vlakana.^{167,168}

Mikromorfološki, elastoza se mnogo češće uočava kao difuzni tip elastoze nego kao tzv. "kolapsni" tip elastoze, koja predstavlja novoformirana elastična vlakna u interlobularnoj stromi oko duktusa.¹³⁵ Međutim, dok u normalnom tkivu dojke nekoliko elastičnih vlakana okružuju kolagena vlakna, u "kolapsnom" gomilanju elastičnih vlakana dominantnu ulogu imaju stromalna kolagena vlakna.

2.3.4.2 Klasični podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke

Opis ILC-a koji su dali Foote i Stewart široko je prihvaćen kao definicija klasičnog podtipa ovog karcinoma i mnoge naredne kliničko-patološke studije pažljivo koriste te kriterijume.¹¹²

Kao što je prvobitno definisano, ćelije kod ovog tumora imaju karakteristično mala jedra, oblika sočiva. To je posledica potiskivanja jedara malim, skrivenim lumenima ispunjenih mucinom koji su klasično obeležje lobularnog karcinoma.¹⁶⁹ Ovi skriveni lumeni mogu varirati u veličini, a u mnogim tumorima su neupadljivi i otkrivaju se bojenjem na mucine (AB-PAS). U nekim tumorima oni mogu da budu upadljivi i daju tumoru klasičnu "signet-ring" morfologiju. Nukleolusi se obično ne vide, a mitoze su retke. U većini slučajeva način rasta tumora je karakterističan sa linearnim rasporedom ćelija koje se provlače između kolagenih snopova formirajući tzv. „indian files“. Takav linearni rast često se orjentiše oko normalnih struktura kao što su duktusi, na vrtložni „target“-oidan način.^{69,170}

Prva veća studija rađena je 1966. godine i obuhvatala je 142 ILC-a. U ovoj studiji 73 ILC-a je procenjeno kao "pravi" ILC, zbog toga što su oni u velikoj meri, ili u celini pokazali način rasta u vidu niza pojedinačnih ćelija.⁶⁷

Nekoliko načina rasta se može svrstati u promene klasifikovane kao klasični invazivni lobularni karcinom. Tumorske ćelije pokazuju gubitak kohezije. Najizraženija manifestacija ove osobine na dvodimenzionalnim histološkim presecima je tendencija da se formiraju tanke trake ćelija raspoređene na linearan način. U većini slučajeva trake su široke više od jedne ili dve ćelije. Široke trake ćelija koje se mestimično anastomoziraju čine trabekularni invazivni lobularni karcinom.²⁸

Neki tumori pokazuju način rasta kod kojeg se tumorske ćelije nalaze u okolini duktusa i lobula u vidu koncentričnih krugova. Takva distribucija ima izgled bikovog oka ili mete (*target*). Inflamatorne ćelije raspoređene oko duktusa mogu da imitiraju "targetoid"-ni način rasta ILC-a, a takav fenomen je zabeležen kao dijagnostički problem, naročito kod kriostatskih preseka ili kod iglenih biopsijskih uzoraka.¹⁷¹ Samo u retkim slučajevima ILC je praćen limfocitnom reakcijom. U izuzetnim slučajevima može da se nađe izraženi limfoidni infiltrat sa prisustvom germinativnih centara, što može da navede na pogrešnu dijagnozu koegzistentne limfocitne mastopatije.¹⁷² Limfoplazmocitna reakcija se nalazi mnogo češće u solidnim i alveolarnim podtipovima nego u klasičnom ILC-u. Granulomatozna inflamatorna reakcija je neuobičajena u ILC-u.²⁸

Termin limfoepiteloliki karcinom se primenjuje za ILC sa izraženom limfocitnom reakcijom.¹⁷³ Ćelije ILC mogu da budu pogrešno prepoznate kao histiociiti među limfocitima. Intracitoplazmatski mucini kancerskih ćelija se uvek boje mucikarminom ili imunohistohemijski citokeratinom AE1/AE3. Limfociti mogu da budu pomešani sa ćelijama ILC-a i oni su neznatno manji od kancerskih ćelija.²⁸

U manjem broju slučajeva, linearni način rasta u vidu traka nije toliko upadljiv, a tumorske ćelije pretežno rastu u vidu manjih rasutih, neuređenih fokusa. Takav tip invazije (infiltracije) ne pokazuje odvojenu masu i uglavnom se nalazi u bolesnika sa malim ili neznatno velikim invazivnim karcinomima. Male tumorske ćelije u takvim invazivnim fokusima mogu da budu pomešane sa limfocitima ili plazma ćelijama u fibroznim ili masnim područjima, kada se preseki gledaju pod manjim povećanjem.²⁸

Interlobularna stroma kod bolesnica sa LCIS-om treba da bude pažljivo ispitana zbog skrivenih fokusa invazije.

Mnogi tumori, u velikoj meri sačinjeni od klasičnog ILC-a imaju neznatne komponente u kojima identične ćelije pokazuju drugačiji način širenja (invazije). Zbog takve pojave savetovano je da se dijagnoza ILC-a postavlja u slučaju kada najmanje 70% tumora ima način rasta "single file", a taj kvantitativni kriterijum je generalno prihvaćen.⁷¹ Raznovrsnost u načinu rasta je faktor koji dovodi do problema u postavljanju dijagnoze ILC-a.^{174,175}

Sve citološke karakteristike koje se viđaju u LCIS-u, mogu biti prisutne i u ILC-u. Kada je sekrecija izražena, ćelije imaju "signet ring" konfiguraciju. Sa gore spomenutim bojenjima, često je moguće pokazati malu količinu sekreta i u "ne-signet ring" ćelijama. Većina takozvanih "signet ring" karcinoma dojke su forme ILC-a,^{72,176} ali iste ćelije se takođe retko nalaze i u invazivnim duktalnim karcinomima.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸

2.3.4.3 Pleomorfni podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke

Neki invazivni lobularni karcinomi sastoje se kompletno ili delimično od ćelija koje su veće od ćelija u klasičnom ILC-u i imaju relativno običnu eozinofilnu citoplazmu. U nekim slučajevima jedra su hiperhromna, a ekscentričnost jedara uz izražen nukleolus daje tim ćelijama plazmacitoidni izgled. Takve ćelije opisane su različito: kao mioidne,⁷² histiocitoidne^{179,180} i pleomorfne ćelije lobularnog karcinoma.^{181,182}

Pleomorfni podtip pokazuje izraženi nuklearni polimorfizam sa nuklearnim gradusom 3 prema modifikovanim Scarfe, Bloom i Richardson-ovom sistemu gradiranja, koji su opisali Elston i Ellis.^{53,169} Ovi tumori su agresivnije prirode, češće gradusa 3 i uopšte imaju visok mitotski indeks. U većini slučajeva način rasta je kao kod klasičnog lobularnog karcinoma. Međutim, građa može da bude izrazito mešovita, a pleomorfna jedra posebno se ističu u regionima alveolarnih ili solidnih podtipova. Imunohistohemijski profil značajno se razlikuje od klasičnog podtipa lobularnog karcinoma, sa prekomernom ekspresijom HER2, izrazitom p53 ekspresijom i u nekim slučajevima gubitkom ekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora.^{183,184} Takođe je opisana povećana ekspresija visokomolekularnog citokeratina i hromogranina.¹⁶⁹

Varijante pleomorfnog ILC-a su apokrini i histiocitoidni podtip. Čelije kod ovih tumora često imaju velika, očigledno nukleolisana jedra i obilnu citoplazmu. U celini ćelije mogu da liče na makrofage - otuda i termin histiocitoidni.¹⁸⁵

Eusebi i saradnici su istakli prisustvo apokrine diferencijacije u pleomorfnom ILC-u i zaključili su da ti pacijenti imaju naročito agresivan klinički tok, zbog toga što je 9 od 10 pacijenata u njihovoj seriji razvilo rekurentni oblik ILC-a. Svih 9 pacijenata imalo je metastaze u limfnim nodusima u vreme dijagnoze.¹⁸¹ Apokrina diferencijacija je takođe zabeležena od strane drugih autora koji su postavili dilemu granice između klasične i pleomorfne mikromorfologije u "in-situ" komponentama.^{180,185} Pleomorfni ILC su imunoreaktivni na Gross-cystic disease fluid protein-15 (GCDFP-15), marker apokrine diferencijacije.^{183,186}

Drugi histološki dokaz da je pleomorfni lobularni karcinom varijanta lobularnog karcinoma obuhvata padžetoidno "in situ" duktalno širenje sa načinom rasta u vidu lista deteline, često prisustvo intracitoplazmatskih mucina, linearni način invazije i istovremeno prisustvo klasičnog invazivnog lobularnog karcinoma u nekim slučajevima. Treba imati na umu da je retka varijanta invazivnog apokrinog duktalnog karcinoma sastavljena od rasutih pleomorfni tumorskih ćelija, ponekad sa linearnim načinom rasta i intracitoplazmatskim vakuolama ispunjenih mucinima, što je rezultat distribucije karcinoma po stromi izmenjenom pseudoangiomatoznom stromalnom hiperplazijom.¹⁸⁷

Mala učestalost reaktivnosti na ER i PR nalazi se kod pleomorfni ILC-a,¹⁸⁰ a i apokrini karcinomi su takođe tipično negativni na ove hormonske receptore. Prisustvo androgenih receptora je detektovano kod pleomorfni ILC-a,¹⁸⁸ a tipično su prisutni u apokrinim karcinomima.

2.3.4.4 Alveolarni podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke

Alveolarni podtip se javlja u vidu alveolarnih formacija ćelija karcinoma, odvojenih tankim trakama fibrozne strome. Čelije imaju uniformna okrugla i centralno postavljena jedra.²⁸ Ovaj karakterističan način rasta formira ovalne nakupine dvadest ili više neoplastični ćelija na način koji imitira lobularni karcinom in situ. Ovakav način rasta je često deo mešovitog podtipa lobularnog karcinoma dojke.¹⁸⁹

2.3.4.5 Solidni podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke

Solidni podtip ima neoplastične ćelije koje formiraju plaže i kao takve mogu da imitiraju druge promene, najčešće limfom. Obično promene imaju visok nuklearni gradus. Detaljnija ispitivanja često otkrivaju polja klasičnih "indian files", obično na margini promene, mada i limfomi mogu da ispolje takvu ćelijsku organizaciju.¹⁸⁹

2.3.4.6 Tubulolobularni podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke

Tubulolobularni podtip je sačinjen od manjih tubula kao i traka tumorskih ćelija koje rastu linearno kao klasični ILC. Zbog toga što on ima mnoge karakteristike na granici između ILC-a i tubularnog karcinoma, uključujući i manje povoljnu prognozu nego tubularni karcinom, autori su zaključili da se tubulolobularni karcinom mora smatrati posebnim podtipom invazivnog lobularnog karcinoma.¹⁹⁰ Prvi put opisan od strane Fisher-a 1977. godine¹⁹⁰, ovaj tumor se karakteriše svim citološkim karakteristikama klasičnog lobularnog karcinoma ("indian files" i "target"-oidna konfiguracija), ali uz prisustvo tubula malog prečnika. Važno je naglasiti da ova promena nije isto što i morfološki heterogena mešavina tipičnog tubularnog i infiltrativnog lobularnog karcinoma za koji bi trebalo da se koristi termin tubularno/lobularni mešoviti tip. Međutim, neki autori smatraju da je promena bliža tubularnom nego lobularnom karcinomu.¹⁹¹

2.3.4.7 Mešoviti lobularni podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke

Trabekularne i alveolarne varijante ILC-a opisane su 1979.⁶⁹ Oko 50% tumora ima trabekule od jednog sloja ćelija, a samo 10% poseduje trabekule od ćelija u tri sloja. Da bi dobio na značaju termin trabekularni bi trebalo ograničiti na tumore sa upadljivim trakama, koje su široke najmanje dve ćelije.²⁸ Obično se trabekularni način rasta nalazi zajedno sa drugim varijantama, kada se tumor označava kao *mešoviti lobularni podtip*. Alveolarni način rasta se definiše kao "više ili manje loptasti agregat" od 20 ili više ćelija

i često je deo slike mešovitog lobularnog podtipa.⁶⁹ Činjenica da brojni slučajevi klasičnog ILC imaju mnoge od komponenti alveolarnog, tubularnog, trabekularnog ili solidnog rasta je dokaz koji podržava ovu klasifikaciju neoplazmi, koja mnogo više ističe te karakteristike u vidu podtipova ILC-a. Zaključak se može izvesti i na osnovu činjenice da su opisani podtipovi E-cadherin-negativni.²⁸

2.3.4.8 Kombinovana mikromorfološka klasifikacija invazivnog lobularnog karcinoma

Tumori sa citološkim karakteristikama invazivnog lobularnog karcinoma u kojima postoje bitni elementi nelinearnog rasta označeni su kao podtipovi ILC-a. Polja klasičnog ILC-a sa linearnim načinom rasta nalaze se u većini podtipova. Poslednje decenije opisane su: trabekularni, alveolarni i solidni podtip, proširujući tako grupu tumora dijagnostikovanih kao ILC.²⁸ Fechner je opisao 6 karcinoma sa načinom rasta koji objedinjuje nekoliko podtipova, označenih kao solidni sa ćelijama tipičnim za ILC. Ćelije formiraju kompaktna gnezda nepravilnog oblika, nekada u kontinuitetu sa pojedinačnim trakama ćelija. Ponekad se slivene ili solidne grupe tumorskih ćelija raspoređuju kao okrugle mase koje se ne moraju uvek zapaziti mikroskopski, kao i makroskopski.⁷⁴ Nisu uočene značajnije razlike u godištima ili u veličini tumora između žena sa klasičnim varijantama ILC-a i onih sa solidnom varijantom ILC-a. Neki autori smatraju da se solidni način rasta sreće u 41% ILC-a (9 od 22). Koegzistirajući LCIS je nađen u 10 od 22 (45%) slučajeva.¹⁹²

Kombinovana podela ILC-a zasniva se na dva važeća principa:

1. prema tipu rasta kancerskih ćelija: linearni (klasični tip lobularnog karcinoma), trabekularni i nelinearni tip rasta (alveolarni, solidni i disperzni).
2. prema stepenu (de)diferencijacije na: bazaloidni tip, apokrini tip, mucin produkujući, histiocitoidni, mioidni i pleomorfni.²⁸

Disperzni (rasuti) podtip ILC-a prezentuje se kao slabo ograničeni fokusi neupadljivih ćelija invazivnog karcinoma, koje se mogu pomešati sa zapaljenjskim ćelijama rasutih po kolagenoj stromi.²⁸

Veliki problem nastaje u pokušaju da se definišu i uporede podtipovi ILC-a, koji su rariteti u čitavoj grupi tumora sa svega nekoliko podtipova. Serija od 230 bolesnica sa ILC-om u stadijumu I i II obuhvatila je 176 (77%) žena sa klasičnim podtipom ILC-a i 54 (23%) sa različitim podtipovima ILC-a. Osim mlađe životne dobi bolesnica sa ILC-om, komparacijom između klasičnog ILC-a i pojedinačnih podtipova ILC-a nisu zapažene kliničke razlike. Žene sa klasičnim invazivnim lobularnim karcinomom imale su značajno veću učestalost duktularnog širenja i sklonost ka multicentričnosti, koja se manifestovala većom frekvencom bilateralnosti, veličinom kao i mikroskopskom multifokalnošću.⁷²

2.3.5 Stepenovanje invazivnog lobularnog karcinoma dojke

Stepenovanje (gradiranje) invazivnih karcinoma dojke vrši se prema modifikovanom Bloom-Richardson-ovom sistemu po Elstonu i Ellisu (Nottingham gradiranje),¹⁶⁹ što je prikazano u tabeli 1.

Tabela 1. Stepenovanje invazivnih karcinoma dojke (Modifikovani Bloom-Richardson sistem po Elstonu i Ellisu)

HP karakteristika	Kriterijumi	Vrednost (poeni)
stvaranje tubularnih formacija	>75%	1
	10-75%	2
	<10%	3
pleomorfizam tumorskih jedara	mali	1
	srednji	2
	jako izražen	3
Broj mitoz (HPF=objekt.40x, dijametar vidnog polja 0,52mm)	0-7 mit./10 HPF	1
	8-14 mit./10 HPF	2
	>15 mit./10 HPF	3

Zbir poena: 3,4,5 = G1 - dobro diferentovani karcinom

6,7 = G2 - srednje diferentovani karcinom

8,9 = G3 - slabo diferentovani karcinom

Pleomorfni podtip ILC-a često pokazuje jedarnu atipiju, viši mitotski indeks i veći jedarni gradus.¹⁹³ Pojedine studije su saopštile da je više od 65% pleomorfnih lobularnih karcinoma gradusa 2 po Elston-ovoj i Ellis-ovoj modifikaciji Scarf-Bloom-Richardson-ovog sistema stepenovanja.¹⁹⁴

2.3.6 Određivanje stadijuma karcinoma dojke

T-stadijum ILC-a može biti pogrešno određen ukoliko se bazira jedino na veličini makroskopski vidljivog tumora, kada postoji makroskopski nevidljivi dodatni fokus invazivnog karcinoma.

Neki nalazi ukazuju da postojeći "TNM-staging" kriterijumi, bazirani na najvećem pojedinačnom tumorskom fokusu, mogu značajno podceniti težinu primarnog tumora kod značajnog broja pacijenata sa ILC-om.¹⁹⁵

pTNM klasifikacija karcinoma dojke (WHO)¹⁹⁶

pT - primarni tumor

pTX primarni tumor se ne može odrediti

pT0 nema dokaza primarnog tumora

pTis karcinom "in situ"

pTis (DCIS) duktalni karcinom "in situ"

pTis (LCIS) lobularni karcinom "in situ"

pTis (Paget) Paget-ova bolest bradavice bez dokazanog tumora. Napomena: ukoliko se dokaže i primarni tumor onda se veličina tumora klasifikuje.

pT1 tumor veličine 2 cm ili manje u najvećem promeru

pT1mic mikroinvazija od 0,1 cm ili manje u najvećem dijametru

pT1a tumor veći od 0,1 cm ali ne veći od 0,5 cm u najvećem promeru

pT1b tumor veći od 0,5 cm ali ne veći od 1 cm i najvećem dijametru

pT1c tumor veći od 1 cm ali ne veći od 2 cm u najvećem dijametru

pT2 tumor veći od 2 cm ali ne veći od 5 cm u najvećem dijametru

pT3 tumor veći od 5 cm u najvećem dijametru

pT4 tumor bilo koje veličine sa direktnim širenjem na zid grudnog koša ili širenje u kožu. Zid grudnog koša uključuje rebra, interkostalne mišiće i prednji zupčasti mišić (M.serratus anterior), ali ne i muskulaturu M.pectoralisa.

pT4a tumor sa širenjem u zid grudnog koša

pT4b tumor sa edemom (uključujući "peau d'orange") ili sa ulceracijom kože dojke ili sa satelitskim metastazama na koži iste dojke

pT4c kriterijumi pod 4a i 4b zajedno

pT4d inflamatorni karcinom (mastitis carcinomatosa)

pN- regionalni limfni čvorovi

pNX regionalni limfni čvorovi se ne mogu odrediti (ranije uklonjene)

pN0 bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (napomena: ovde spadaju i slučajevi prisustva samo pojedinačnih izolovanih tumorskih ćelija u regionalnim limfnim čvorovima i one pojedinačne tumorske ćelije koje ne pokazuju znakove proliferacije ili stromalne reakcije).

pN1mi mikrometastaze (veće od 0,2 mm ne veće od 2 mm u najvećem promeru)

pN1 metastaza(e) u 1-3 ipsilateralna limfna čvora aksile i/ili ipsilateralni limfni čvorovi duž A.mammariae internae sa mikroskopskom (-im) metastazom (metastazama), koje su otkrivene disekcijom limfnih čvorova "stražara" (pNsn), međutim ti čvorovi nisu bili klinički prepoznatljivi.

pN1a metastaza(e) u 1-3 ipsilateralna limfna čvora veće od 2 mm u prečniku

pN1b limfni čvorovi duž A.mammaria interna sa mikroskopskim metastazama, koje su otkrivene disekcijom limfnih čvorova "stražara", koji nisu bili klinički prepoznatljivi.

pN1c metastaze u 1-3 ipsilateralna aksilarna limfna čvora duž A.mammaria interna sa mikroskopskim metastazama koje su otkrivene disekcijom limfnih čvorova "stražara", koji nisu bili klinički prepoznatljivi.

pN2 metastaze u 4-9 ipsilateralnih aksilarnih limfnih čvorova ili klinički prepoznatljivi limfni čvorovi duž A.mammaria interna, a bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima.

pN2a metastaze u 4-9 ipsilateralnih limfnih čvorova, najmanje veličine 2mm u prečniku

pN2b metastaze u klinički prepoznatljivim (izmenjenim) ipsilateralnim limfnim čvorovima duž A.mammaria interna i bez metastaza u aksilarnim čvorovima.

pN3 metastaze u najmanje 10 ipsilateralnih limfnih čvorova; ili u ipsilateralne infraklavikularne limfne čvorove; ili u klinički promenjenim (prepoznatljivim) limfnim čvorovima duž A. mammaria interna sa najmanje jednom metastazom u aksilarnim čvorovima; ili više od 3 metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima sa klinički

neizmenjenim (neprepoznatljivim) ali mikroskopski verifikovanim metastazama duž A.mammaria interna; ili metastaze u ipsilateralne supraklavikularne limfne čvorove.

pN3a metastaza(e) u najmanje 10 ipsilateralnih aksilarnih limfnih čvorova (najmanje veličine 2mm i veće) ili metastaze u ipsilateralne infraklavikularne limfne čvorove

pN3b metastaza(e) u klinički izmenjenim (prepoznatljivim) limfnim čvorovima duž A.mammaria interna sa prisustvom najmanje jedne aksilarne metastaze u limfnom čvoru; ili metastaze u više od 3 aksilarna limfna čvora i u limfnim čvorovima duž A.mammaria interna, koji su dokazani putem disekcije limfnih čvorova "stražara", koji klinički nisu bili prepoznatljivi.

pN3c metastaza (e) u ipsilateralne supraklavikularne limfne čvorove.

pM-udaljene metastaze

pMX udaljene metastaze se ne mogu odrediti

pM0 bez udaljenih metastaza

pM1 udaljene metastaze

Multicentrični invazivni karcinomi stadijaju se korišćenjem najvećeg primarnog karcinoma, čime se određuje pT stadijum.¹⁹⁷ Kada se dijametar najvećeg multicentričnog tumora koristi da bi se odredila veličina tumora, bolesnice sa multicentričnim tumorima imaju znatno više nodalnih metastaza kod T1 i T2 tumora, nego oni sa unicentričnim tumorima.¹⁹⁸ Kada se koriste zbirni dijometri multicentričnih tumora za procenu veličine tumora, nema signifikantne razlike u incidenci nodalnih metastaza za posmatrane T stadijume. To sugerise da, bez obzira na određeni stadijum, celokupna veličina tumora u dojci se može uzeti u obzir kada se donese odluka o potrebi za adjuvantnom terapijom kod bolesnica sa negativnim limfnim čvorovima.⁹²

Perineuralna inavazija je neuobičajena kod ILC-a, ali se može uočiti kod uznapredovalih promena. Tumorski embolusi u limfaticima takođe se retko sreću kod ovog tipa karcinoma, a u slučaju skvrčenih arteficialnih pukotina mogu da simuliraju karcinom u limfnim sudovima. Pravi tumorski embolus u limfatiku obično se sastoji od malih grupa tumorskih ćelija ili izolovanih ćelija.²⁸

Morphopoulos i saradnici proučavali su proširenost angiogeneze u ILC imunohistohemijskim korišćenjem antitela srodnog faktora VIII. Gustina mikrocirkulacije nije signifikantno zavisila od godina, menopauzalnog statusa, veličine tumora, histološkog podtipa, zahvaćenosti limfnih nodusa. Gustina mikrocirkulacije nije pokazatelj globalnog preživljavanja ili dužeg relapsnog perioda.¹⁹⁹

2.3.7 Kariometrijska analiza karcinoma dojke

Kvantitativne razlike između ćelija benignih i malignih tumora su opisane još 1840. godine,²⁰⁰ a u narednim decenijama su se izdvojili morfometrijski aspekt (veličina i oblik) i fotometrijski aspekt (intenzitet bojenja).²⁰¹⁻²⁰³

Morfometrija predstavlja kvantitativnu ekspresiju određenih geometrijskih karakteristika.²⁰⁴ Postoji oko 50 parametara (osnovnih i izvedenih) koji se koriste za analizu veličine i oblika jedara. Kariometrijskim analizama najčešće se određuju veličina i oblik jedara, planimetrijskom ili stereološkom metodom.²⁰⁵ Planimetrija se može opisati kao merenje geometrijskih karakteristika dvodimenzionalnih objekata. Planimetrijske karakteristike kod različitih promena dojke, su prvi put saopštene od strane Nienhaus-a 1977. godine.²⁰⁶ Godine 1981. i 1985. dve morfometrijske studije su saopštile predikciju i prognozu karcinoma dojke.^{207,208} Naknadno je manji broj studija imao za cilj predikciju, prognozu, stepenovanje ili diferencijalnu dijagnozu promena u dojci.²⁰⁹⁻²¹¹

Pojedine morfometrijske studije su istakle da je površina preseka jedara korisna u diferencijaciji dva najčešća histološka tipa karcinoma dojke.²¹² Takođe je saopšteno da je prosečna površina preseka jedara statistički značajno veća kod duktalnih nego kod lobularnih karcinoma dojke.²¹³ Rajesh i saradnici su 2002. godine objavili studiju gde je saopšteno da je površina preseka jedara značajna za razlikovanje ILC-a od IDC-a.²¹¹

2.3.8 Način širenja invazivnog lobularnog karcinoma

Embriološki dojka se u potpunosti razvija unutar superficijalne fascije kože, tako da tkivo dojke i koža koja ga prekriva funkcionalno pripadaju jednoj limfatičnoj jedinici.³

Injekcione studije obezbeđuju dovoljno dokaza koji podržavaju gledište da limfatična drenaža cele dojke ide zajedničkim kanalima, bez obzira na kvadrant dojke u kome je primarni tumor lokalizovan.²¹⁴

Invazivni lobularni karcinom može da metastazira limfaticima ili hematogenom diseminacijom. Metastatski depoziti lobularnog karcinoma teže da dupliraju citološke karakteristike primarnog tumora. Na primer, "signet ring" ćelijska formacija je upadljivija u metastazi nego u primarnom tumoru.²¹⁵

Metastaze klasičnog ILC-a u aksilarnim limfnim čvorovima se šire u veikoj meri duž sinusoida ili zahvataju sinusoidne i limfoidno tkivo. Kada je zahavatanje limfnog čvora nepravilno, razlikovanje tumorskih ćelija i histiocita je otežano. Problemi takođe mogu da nastanu kada se pojavi slučaj opsežnih nodalnih metastaza koje su ograničene na sinusoidne, a liče na izraženu sinus histiocitozu. Takav način metastatskog širenja je opisan kao "sinus katar". U ovim okolnostima, tumorske ćelije se ponekad raspoređuju pojedinačno ili u manjim grupama u poljima limfoidnog tkiva. U tom slučaju, može se naići na limfni nodus kod koga je metastatski lobularni karcinom koncentrisan u sinusoidima hilusa. Reaktivne promene histiocita u sinusoidima limfnih čvorova mogu da liče na metastatski lobularni karcinom. Vakuolizovani histiocii udruženi sa silikonskim mastitisom podsećaju na "signet-ring" ćelije i oni nisu uvek ograničeni na sinusoidne, a džinovsko ćelijska reakcija je obično prisutna. "Signet-ring" ćelijska sinus histiocitoza, retka neneoplastična reaktivna promena nepoznate etiologije, posebno se teško razlikuje od metastatskog lobularnog karcinoma.²¹⁶ "Signet-ring" histiocitoza liči na metastatski lobularni karcinom na rutinskim HE-preparatima, pa je potrebno primeniti histo- ili imunohistohemijske procedure. Citoplazmatsko bojenje sa Periodic Acid Schiff-om (PAS) blokirano dijastazom tretmanom i slabo do srednje pozitivno mucicarmine bojenje može da se vidi u "signet-ring" histiocitima. Ove ćelije nisu imunoreaktivne sa markerima epitelnih ćelija, kao što su cytokeratin ili GCDFP 15, a reaktivne su na histiocitne markere (lysozyme, CD68 i Alfa1-antitripsin).²¹⁶

Elektronomikroskopski su prisutne citoplazmatske vakuole ili amorfne, elektroneguste masti u "signet-ring" histiocitima.²¹⁶ Etiologija "signet-ring" histiocita nije jasna, ali mnoge prikazane bolesnice su imale prethodnu hiruršku intervenciju zbog karcinoma dojke ili koronarne bolesti srca.²¹⁶ Lipidi koji su prisutni u ovim ćelijama mogu poticati

od traumatizovanog masnog tkiva prethodne operacije. Citoplazma histiocita se boji ružičasto mucikarminom, ali citoplazmatske vakuole nisu mucikarminofilne.

Kada se dijagnoza metastatskog lobularnog karcinoma u limfnim čvorovima ne može sa sigurnošću postaviti na rutinskim histološkim preparatima, može se upotrebiti imunohistohemijska analiza citokeratinom niske molekulske težine u cilju otkrivanja skrivenih mikrometastaza. Nema usaglašenog mišljenja oko koristi rutinske imunohistohemijske primene radi otkrivanja mikrometastaza ILC-a u limfnim nodusima, ali publikovani radovi potvrđuju da je to korisna procedura. Pojedini autori prikazuju nalaze skrivenih mikrometastaza kod blizu 1/3 slučajeva upotrebom ove metode.^{217,218} Neki su koristili dodatne serijske HE preseke kao i imunohistohemijsko bojenje na citokeratine da bi se detektovali metastatski karcinomi u aksilarnim limfnim nodusima prethodno označeni kao negativni. Skrивene metastaze su nađene imunohistohemijski u 39% slučajeva, a u 3% slučajeva običnom HE-metodom.²¹⁹

Pregledom limfnih čvorova "stražara" kod 449 bolesnica sa ILC-om, otkriveno je 189 (42%) metastatskih karcinoma. Učestalost nodalne zahvaćenosti bila je direktno u vezi sa veličinom tumora (<1cm, 17%; 1,1-2 cm, 33%; 2,1-3 cm, 60%; 3,1-4 cm, 74%). Samo primenom imunohistohemije nađen je metastatski karcinom u 65 slučajeva (34%), uključujući i 17 slučajeva izolovanih tumorskih ćelija, 40 mikrometastaza i 8 makrometastaza. Disekcija aksile je urađena u 161 (85%) slučaju, sa otkrivanjem metastatskog karcinoma u limfnim čvorovima koji nisu "stražari" u 66 (41%) slučajeva. Nijedna bolesnica sa izolovanim tumorskim ćelijama u limfnom čvoru "stražaru" nije imala pozitivne ostale limfne čvorove. Konačno, 12 (24%) bolesnica sa imunohistohemijski pozitivnim limfnim čvorovima "stražara" imalo je metastatski karcinom i u ostalim limfnim čvorovima. Imunohistohemijski citokeratin se obično upotrebljava kod analize limfnog čvora "stražara", a može se koristiti i kod svih limfnih čvorova bolesnica sa ILC-om ukoliko je limfni čvor "stražar" zahvaćen metastatskim karcinomom veći od mikrometastaze.²²⁰

Teškoće u razlikovanju metastatskog lobularnog karcinoma od histiocita su opisane i van limfnih čvorova.¹⁷¹ Tako orbitalne metastaze mogu da budu proglašene malignim limfomom ili melanomom. Na očnom kapku metastatske promene mogu da liče na halacion.^{179,221} Izolovane tumorske ćelije u kostnoj srži liče na hematopoetske

elemente.²²² Retrospektivnim pregledom biopsija kostnih srži, sve su pokazale skrivene metastatske karcinome dojke dokazane imunohistohemijski citokeratinom. Otkriveno je da je metastatski lobularni karcinom dijagnostifikovan na HE-preparatima u 39% tih slučajeva. U istoj studiji, karcinom je detektovan u 58% HE-preparata tkivnih biopsija kostne srži pacijenata sa duktalnim karcinomom. Iz tog razloga se preporučuje da imunohistohemijski citokeratin bude uključen u rutinsku proceduru biopsija kostne srži, bolesnica sa karcinomom dojke, naročito sa ILC-om.²²²

Karakteristične lokalizacije sistemskih metastaza su takođe povezane sa ILC-om. Istraživači su upoređivali način metastatskog širenja duktalnog i lobularnog karcinoma na obdukcijama²²³ ili kroz kliničke podatke.²²⁴ Oba pristupa su otkrila statistički značajniju učestalost metastatskog širenja lobularnog karcinoma na peritoneum i retroperitoneum, leptomeninge, gastrointestinalni trakt i ginekološke organe, a nisku učestalost plućnih i pleuralnih metastaza.²²⁴ Kostni su često mesto metastaza ILC-a.^{225,226} U jednoj studiji, parenhimne metastaze u jetri, plućima i mozgu ređe su detektovane, na autopsiji ili kliničkim ispitivanjem, kod pacijenata sa ILC-om nego kod pacijenata sa IDC-om.²²⁴ Drugi autori su saopštili da su metastaze u jetri signifikantno učestalije kod ILC-a nego kod IDC-a,²²⁷ ili da nema signifikantne razlike u učestalosti metastaza u jetri.^{223,224} Nema značajne razlike u distribuciji metastatskih depozita između bolesnica sa klasičnim i drugim podtipovima ILC-a.⁷²

Zahvatanje centralnog nervnog sistema obično poprima formu karcinomatoznog meningitisa i sastoji se od difuzne leptomeningealne infiltracije.^{223,224,228,229} Prisustvo skrivenog karcinoma sa simptomima koji se mogu pripisati leptomeningealnim metastazama je opisano.²³⁰ Jayson i saradnici su našli da 67% pacijenata sa karcinomatoznim meningitisom ima lobularni ili mešoviti duktulo-lobularni karcinom.²³¹ Bolest ima rapidno progresivni tok, sa srednjim intervalom od 10,9 meseci od primarne dijagnoze do meningealnog ispoljavanja. Moždani infarkti mogu se pripisati mukusnim embolusima kod pacijenata sa "signet-ring" varijantom ILC-a.²³¹ "Signet-ring" ćelije su tipično prisutne u cerebrospinalnoj tečnosti.²³⁰

Intraabdominalne metastaze imaju tendenciju da zahvataju serozne površine i retroperitoneum^{176,223,224,227,232} ili ovarijume.^{223,233} Hirurškom pretragom ponekad se otkriva istanjenje seroznih, mezenteričnih i retroperitonealnih tkiva, bez izolovane mase

tumora. Ureteralna opstrukcija se može razviti kao posledica retroperitonealnih metastaza.²²⁹ U ostalim slučajevima, postoji difuzno širenje na uterus i ovarijume, sa uvećanjem ovarijuma i tako formirajući obeležja Krukenbergovog tumora. Kompjuterizovana tomografija (CT) pokazala se posebno korisnom u otkrivanju abdominalnih metastaza ILC-a.²³⁴ Poseban dijagnostički izazov je prisustvo metastaza lobularnog karcinoma u uterusu.²³⁵ Kancerske ćelije su izmešane sa normalnim ćelijama endometrijalne strome i tako mogu da se previde u kiretmanu endometrijuma dobijenog od bolesnica sa vaginalnim krvavljenjem. Ćelije metastatskog lobularnog karcinoma u endometrijumu mogu da budu otkrivene i u cervikalnom brisu.²³⁶ Liebmann je saopštio slučaj bolesnice sa prethodno neprepoznatim ILC-om dojke, kod koje je nađena metastaza lobularnog karcinoma u uterusnom leiomiomu.²³⁷ Metastatski lobularni karcinom neđen je i u endometrijalnim polipima koji su bili u vezi sa tretmanom tamoxifenom.²³⁸

ILC može da da serozne i muralne metastaze zahvatajući želudac. Klinički i patološki nalazi mogu da budu identični nalazu onih u primarnom karcinomu želuca.^{215,224,239} Jedan slučaj vredan pažnje je gastrektomija koja je urađena zbog karcinoma koji je zahvatio želudac, a 18 meseci ranije je dijagnostikovao ILC-dojke.²⁴⁰ Imunohistohemijsko bojenje na ER receptore iskorišćeno je za razlikovanje želudačnog od karcinoma dojke, ali slabo pozitivni receptori nisu isključili prisustvo želudačnog karcinoma. ER-receptori su detektovani u želudačnom karcinomu biohemijskim^{241,242} i imunohistohemijskim procedurama,^{243,244} velikoj meri kod bolesnika u Aziji. U jednoj studiji, ER-receptori su značajno detektovani i to češće kod loše diferentovanih nego kod dobro diferentovanih želudačnih karcinoma, a imunoreaktivnost nije bila zavisna od pola.²⁴⁴ Chaubert je saopštio da je ER imunoreaktivnost odsutna kod karcinoma želuca evropskih pacijenata.²⁴⁵ Metastatski "signet-ring" karcinom dojke koji zahvata želudac i druga mesta je verovatno pozitivan na GCDFP-15, dok je primarni karcinom želuca retko imunoreaktivan na GCDFP-15. Gubitak E-cadherin ekspresije je nađen kod karcinoma želuca, a familijarni karcinom želuca je udružen sa germline mutacijama E-cadherin gena.²⁴⁶

Metastatski lobularni karcinom u kolonu može da imitira primarni karcinom kolona.²⁴⁷ Razlikovanje metastatskog lobularnog karcinoma i nekih karcinoidnih tumora

je izazov u dijagnostici. Saopšten je slučaj bolesnice sa klasičnim ILC-om koja je imala i tumor apendiksa, primarno interpretiran kao metastaza ILC-a. Daljim imunohistohemijskim ispitivanjima potvrđena je imunoreaktivnost na neuron-specifičnu enolasu (NSE) i druge neuroendokrine markere, a nije bilo reaktivnosti na ER. Bolesnica je imala i ILC i karcinom apendiksa, tako da ILC-i mogu da ispolje i neuroendokrina svojstva.²⁸

2.4 TKIVNI MARKERI U LOBULARNOM KARCINOMU DOJKE

Uprošćeno, biomarker je bilo koji analit (DNK, RNK, protein, metabolit) u telesnim tečnostima, ćelijama ili tkivima koji sadrži informaciju o: statusu bolesti, progresiji ili reakciji na terapiju. Biomarkeri su "sijamski blizanci" "target" terapija. Mogu da budu: 1) dijagnostički markeri, 2) prognostički markeri i 3) prediktivni markeri. Dijagnostički markeri obezbeđuju informacije o prisustvu ili odsustvu za datu bolest. Prognostički markeri daju informacije o verovatnoći preživljavanja za datu bolest. Prediktivni markeri daju informacije o verovatnoći odgovora na terapiju.²⁴⁸

2.4.1 Estrogen i karcinom dojke

Estrogen je jedan od ozbiljnijih faktora rizika za progresiju i razvoj karcinoma dojke. Preko 85% karcinoma dojke kod žena vodi poreklo od luminalnog sloja epitelnih ćelija dojke. Povećani rizik za razvoj karcinoma dojke postoji kod osoba sa povećanim nivoom endogenog estrogena u krvi. Uticaj nivoa koncentracije serumskog estrogena u vezi je sa menstrualnim ciklusom kod premenopauzalnih žena, a mnogo je ustaljeniji kod postmenopauzalnih žena.²⁴⁹

2.4.1.1 Sinteza estrogena

Estrogeni derivati: estron (E1), estradiol (E2) i estriol (E3), C18 steroidi potiču od holesterola. Holesterol preuzet od strane steroidogenih ćelija odlaže se i sklanja na mesto

sinteze steroida.²⁵⁰ Različiti steroidi nastaju redukcijom u broju ugljenikovih atoma od 27 do 18.²⁵¹

Oba citohroma CYP17 (P450 17 hidroksilaza) i CYP19 (P450 aromataza) uključeni su u biosintezu estrogena. Aromatizacija je poslednji korak u formiranju estrogena, a P450-aromatazni monoksigenazni enzimski kompleks prisutan je u glatkom endoplazmatskom retikulumu gde funkcioniše kao demetilišući katalizator ove reakcije. U tri uzastopne hidroksilacione reakcije, od estrona (E1) i estradiola (E2) obavezno se formiraju posebni prekursori androstendion i testosteron.²⁵²

2.4.1.2 Metabolizam estrogena

Osim što prelaze enterohepatičnu cirkulaciju, estrogeni se metabolišu hidroksilacijom a zatim i metilacijom do formiranja katehol estrogena i metilisanih estrogena.²⁵³

Hidroksilacijom estrogena dobijaju se 2-hidroksiestrogeni, 4-hidroksiestrogeni i 16-Alfa-hidroksiestrogeni (katehol estrogeni), među kojima se 4-hidroksiestrogeni i 16Alfa-hidroksiestradioli smatraju kancerogenim.

Metilacijom 2- i 4-hidroksiestrogena katehol-O-metil transferazom dobijaju se metoksilisani metaboliti estrogena.²⁵⁴ Katehol estrogeni su vezani za estrogenske receptore i imaju slabu estrogensku aktivnost kod životinja. Lipoidni estrogeni su estri estrogena sa mastima koji se uključuju kao posebna klasa steroidnih hormona, a sintetišu se u krvi, kojom cirkulišu vezani za lipoproteine. Globalno, manje od 10% serumskog estradiola je vezan za lipoproteine, uglavnom za lipoproteine velike gustine, mada se serumski estradiol može preneti i lipoproteinima niske gustine.²⁵⁵ Lipoidni estrogeni mnogo manje podležu kataboličkim procesima za razliku od slobodnih estrogena, stoga imaju vek trajanja do eliminacije iz cirkulacije. Lipoidni estrogeni snižavaju koncentraciju estradiola i inhibiraju oksidaciju lipoproteina niske gustine, što je saopšteno u "in vitro" sistemima.²⁵⁶

2.4.1.3 Funkcije estrogena

Estrogen stimuliše rast, protok krvi i zadržavanje vode u genitalnim organima. Uključen je i u lipoproteinske receptore u dojci, a snižava serumsku koncentraciju LDL holesterola u jetri. Estrogen povećava potencijal zgrušavanja krvi. U gastrointestinalnom traktu estrogeni mogu imati ulogu u zaštiti od karcinoma kolona.²⁵⁷ Estrogen povećava turgor kože i produkciju kolagena redukujući tako dubinu bora u starenju.²⁵⁸

U dojkama, estrogen stimuliše rast i diferencijaciju duktalnog epitela, podstičući mitotsku aktivnost cilindričnih ćelija duktusa i stimulišući rast vezivnog tkiva.²⁵⁹ Gustina estrogenskih receptora u tkivu dojke najveća je u folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa, a pada nakon ovulacije. Estrogen ovarijuma ima primarnu ulogu u uspostavljanju i održavanju reproduktivne funkcije. Dodatne funkcije estrogena su razvoj skeleta, kardiovaskularnog sistema i mozga.²⁶⁰

2.4.1.4 Molekularna dejstva estrogena

Molekularni mehanizmi estrogena na jedarnu DNK obuhvataju estrogen i njegov jedarni receptorni kompleks sačinjen od regulatornih regiona estrogen osetljivih gena. Takvi dimeri u vezi su sa faktorima bazalne transkripcije, kao aktivatorima i korepresorima menjajući tako gensku ekspresiju.²⁶¹ Estrogen je ligand zavisni transkripcioni faktor čime se objašnjava latentnost većine estrogenih odgovora u target tkivima.²⁶² Estrogen ulazi u ćeliju difuzijom i vezuje se za ligand-vezujuće mesto receptora. Kompleks estrogen-estrogen receptor difunduje u jedro gde se vezuje za specifičnu sekvencu DNK, nazvanu estrogen reaktivni element (ERE). Estrogen-estrogen receptor kompleks nije samo vezan za reaktivne elemente, već i za jedarne receptorne koaktivatore ili represore. reguliše transkripciju gena oslobađajući finalne estrogen reaktivne elemente, modulišući aktivnost drugih transkripcionih faktora, a takođe može da poveća preživljavanje ćelija karcinoma dojke i rast tumora.²⁶³

2.4.2 Estrogenski i progesteronski receptori

Postoje dva podtipa estrogenskih receptora i nekoliko izoformi, a saopštene su i mešovite varijante. Prvi podtip estrogenskog receptora Beta kloniran je 1986., a drugi podtip estrogenskog receptora Beta je prisutan u nekoliko neklasičnih "target" tkiva uključujući bubreg, intestinalnu mukozu, plućni parenhim, kostnu srž, kosti, mozak, endotelne ćelije i prostatične žlezde.²⁶⁴ Sa druge strane, estrogenski receptor Alfa se nalazi pretežno u endometriju, ćelijama karcinoma dojke i strome ovarijuma. Razvoj i rast karcinoma dojke posredovan je balansom molekula ER Alfa i ER Beta. Estrogen receptor Alfa i Beta članovi su superfamilije jedarnih hormonskih receptora koja broji, do sada prepoznatih oko 150 članova. Estrogeni receptori imaju nekoliko funkcionalnih domena. ER Alfa i ER Beta imaju 96% identičnih aminokiselina u njihovim DNK-vezujućim domenima, dok je samo 53% homologno u njihovim ligand-vezujućim domenima. Ovi receptori se razlikuju u svojim aktivacionim domenima, sugerišući da oni mogu da regrutuju različite proteine sve do transkripcionih kompleksa. Tako ispoljavaju svoju specifičnost ka alternativnim transkripcionim efektima na genom.²⁶⁵ Ligand-vezujući domeni sadrže različite sastave aminokiselina vezujući se tako za različite ligande, a ti domeni su u interakciji i sa ko-regulatornim proteinima. N-terminalni domen visokog je nivoa varijabilnosti i normalno sadrži transaktivacioni domen koji direktno stupa u interakciju sa "mašinerijom" transkripcionih faktora. C-terminalni domen doprinosi transaktivacionom kapacitetu receptora. DNK-vezujući domeni estrogenskih receptora Alfa i Beta su vrlo slični, a globalni nivo homolognosti receptora u ćelijama je nizak. Put signalne transdukcije estrogena pun je brojnih proteina koji mogu da oštete funkciju estrogena.²⁶³ ER Alfa je sekvstriran u jedrima "target" ćelija velikim inhibitornim "heat shock" proteinskim kompleksom, koji omogućava pomeranje "heat shock" proteina a takođe i olakšava interakciju receptornog dimera unutar regulatornog regiona "target" gena. Interakcija ER Alfa sa "target" genskim promoterima može da nastane ili direktno preko specifičnih estrogen reaktivnih elemenata (ERE) ili indirektno kontaktom sa drugim DNK vezujućim transkripcionim faktorima, kao što su: AP1, SP1 ili NF-kapaB. Jednom vezan za DNK, receptor može pozitivno ili negativno da reguliše transkripciju "target" gena.²⁶³ Unakrsno delovanje genomskih puteva i puteva

sekundarnih glasnika verovatno ima važnu ulogu u estrogenskoj kontroli ćelijske proliferacije i inhibicije apoptoze i može da ima terapijske implikacije.²⁶⁶ Metaboliti kateholestrogena mogu da učestvuju u regulaciji puteva genske ekspresije ili signalizacije ili oba, preko estrogenskih receptora. Receptor se menja da poveća ili smanji aktivaciju gena u različitim "target" tkivima.²⁶⁷ Predloženi mehanizam je balans ko-represornih ili ko-aktivatornih proteina koji mogu da se vežu za SERM-ER (Selective estrogen receptor modulator) proteinski kompleks da "ugase" (korepresori) ili "upale" (koaktivatori) transkripcioni potencijal kompleksa. Ligand zavisna aktivacija estrogenskih receptora ima nepričvršćen ligand za receptor i gubitak veze sa njegovom citoplazmatskom ili jedarnom lokacijom, ali je pričvršćen za receptor-pridodate proteine. Ovi proteini služe kao šaperoni i stabilizuju receptor u jednom neaktivnom stanju ili maskiraju DNK-vezujući domen receptora. Drugi receptor-pridodati proteini mogu da doprinesu unakrsnoj vezi između različitih signalnih puteva. Specifični domeni unutar ER-Alfa uslov su za vezivanje liganda, dimerizaciju, vezivanje za DNK i transaktivaciju.²⁶⁰ ER-Alfa takođe igra ulogu u negativnoj regulaciji ER-Beta. Odgovorom na estradiol, ER-Beta može da aktivira iste gene koji su regulisani od strane ER-Alfa. Međutim, funkcija ER-Beta je da inhibira ER-Alfa transkripcionu aktivnost u ćelijama kod kojih su eksprimirana oba podtipa receptora.²⁶⁸

Slično kao ER, PR receptor protein nalazi se u dve receptorske izoforme (u ovom slučaju nazvani **A** i **B**), ali su obe forme produkt istog gena. Ove izoforme PR receptora (A je lako okrnjena forma B) se spajaju jedna sa drugom, formirajući homo- i heterodimere. Mada su u žiži interesovanja istraživača, postoji mali broj radova o relativnom kliničkom značaju ovih formi kod tkivnih uzoraka.²⁶⁹

Prva saopštenja koja su važila godinama, govorila su da pacijenti sa ER pozitivnim/PR negativnim receptorskim statusom karcinoma dojke, imaju goru prognozu nego pacijenti sa PR+ tumorima.²⁷⁰ Međutim, sugestije da PR receptori mogu da posluže kao značajan prediktivni faktor za benefit od antiestrogenih terapija poništene su u narednim studijama.²⁷¹⁻²⁷³ Kasnija hipoteza bazirana je na zapažanju da gen koji kodira PR receptor je estrogen zavistan, i zato ekspresija PR receptora može da služi kao indikacija intaktnog estrogen-ER-estrogen zavisnog puta.²⁷³

Korist od endokrine terapije kod ER-/PR+ karcinoma dojke, neuobičajene kategorije tumora, su kontraverzne.²⁷⁴ Međutim, postoji dokaz da mali procenat pacijenata sa ER-/PR+ karcinomima može da ima odgovor na endokrinu terapiju.^{274,275} Ovo zajedno sa prognostičkim informacijama, pokazuje dovoljan klinički značaj za rutinsko merenje PR receptora.

Rane biohemijske studije govore su da su invazivni lobularni karcinomi bili izuzetno bogati estrogenskim receptorima (ER),²⁷⁶ što nije potvrđeno narednim analizama veće grupe pacijenata.²⁷⁷ Naročito visoki nivoi estrogena nađeni su kod alveolarnog podtipa ILC-a.^{106,278} Većina tih karcinoma takođe je imala visok nivo progesteronskih receptora (PR). Heterogena imunohistohemijska reaktivnost za ER je prisutna. Smanjena ili odsutna ekspresija ER i PR saopštena je u pleomorfnom podtipu ILC-a.¹⁸³ Androgeni receptori (AR) su pozitivni u 87% ILC-a, a u 56% invazivnih duktalnih karcinoma.²⁷⁹ Androgen-receptor pozitivni ILC su neuobičajeno ER i PR pozitivni i sa niskim proliferativnim Ki-67 indeksom.²⁸

Riva i saradnici saopštili su imunohistohemijske nalaze ekspresije androgenih receptora (AR) u 64 od 80 (80%) invazivnih lobularnih karcinoma i u 118 od 212 (56%) invazivnih duktalnih karcinoma. Androgeni receptori su detektovani u 85% klasičnih i 65% pleomorfni invazivnih lobularnih karcinoma. AR-pozitivni tumori su ER-pozitivni u 87,5% ili PR-pozitivni u 75,0% slučajeva.²⁷⁹ Manji deo ILC-a bio je ER(-), PR (-) i AR(+). Ovi rezultati su u skladu sa ranijim saopštenjima koja su ukazivala na koekspresiju ER, PR i AR u invazivnim duktalnim karcinomima i invazivnim lobularnim karcinomima.^{280,281}

2.4.2.1 Semikvantitativne ASCO preporuke za imunohistohemijsko testiranje ER i PR receptora kod karcinoma dojke

Do 20% imunohistohemijskih analiza ER i PR receptora širom sveta mogu da budu netačne (lažno negativne ili lažno pozitivne). Većina spornih pitanja u vezi sa testiranjem javljaju se zbog varijacija preanalitičkih varijabli, granica pozitivnosti i kriterijuma interpretacije.²⁶⁹

Preporuka je da se ER i PR receptorske analize smatraju pozitivnim ako postoji najmanje 1% pozitivnih tumorskih ćelija na testiranim uzorcima u prisustvu očekivane reaktivnosti unutrašnje (normalni epitelni elementi) i spoljašnje kontrole. Odsustvo koristi od endokrine terapije kod žena sa ER-negativnim invazivnim karcinomima dojke potvrđen je detaljnim pregledima nasumičnih kliničkih studija.

Imunohistohemijska aplikacija hormon-receptor specifičnih antitela u početku su bili uspešni samo na kriostatskim tkivnim presecima, a "antigen retrieval" metode razvile su se ranih 90-ih i nova antitela omogućavala su aplikaciju na rutinskim formalin-fiksiranim i u parafinu ukalupljenim materijalima.

Za sve tumore koji su određeni kao ER-lažno negativni, nađeno je da imaju jednu ili nekoliko sledećih karakteristika: loša fiksacija, negativna unutrašnja kontrola (kada je normalni duktalni epitel prisutan, a bio je negativan) i odsustvo unutrašnjih kontrola (nema unutrašnje kontrole za evaluaciju).²⁸²

Receptorni status generalno se dobija sumom skora procentualne zastupljenosti i skora prosečnog intenziteta pozitivnog bojenja tumorskih ćelija (tzv. Allred-ov scor u rasponu od 0-8). Na bazi "cut point" analiza korelisanih imunohistohemijskih skorova sa ishodom pacijenata tretiranih samo adjuvantnom endokrinom terapijom, nađeno je da pacijenti sa tumorima koji imaju Allred-ov skor preko ili jednako 3 (što predstavlja 1-10% slabo pozitivnih ćelija), imaju znatno i statistički signifikantno bolju prognozu nego pacijenti sa skorom manjim od 3 (tj. manje od 1% pozitivnih ćelija).²⁶⁹

Mada neke studije sugerišu da prediktivna uloga PR receptora nije toliko značajna kao uloga ER receptora,²⁸³⁻²⁸⁵ druge studije su pokazale da PR receptorski status obezbeđuje dodatni prediktivni značaj,²⁸⁶ nezavisan od vrednosti ER-receptora,^{285,287,288} pogotovu kod premenopauzalnih žena.^{289,290} Prediktivna validnost, pokazana u retrospektivnim studijama je uočena ukoliko je bar 1% tumorskih ćelija obojeno.^{286,287}

Lista preporuka za skorovanje ER i PR receptora zahteva tri elementa:

1) Procenat/udeo jedara tumorskih ćelija koje su se obojile; i svi delovi tumora na odgovarajućem ICH preparatu moraju da se procene. Procenat se dobija: procenom, kvantifikacijom tj. brojanjem ćelija ili analizom slike. U tom smislu, analiza slike dosta obećava zbog poboljšanja inter- i intra-observerskih provera, ali neslaganja postoje oko

toga kako te slike treba procenjivati. Standardi uspešnog sistema za anлізу slike još uvek nisu razvijeni.²⁶⁹

2) Intenzitet bojenja se može opisati i saopštiti kao slab, srednji ili jak. Ovo merenje treba da predstavlja procenu prosečnog intenziteta bojenja tumorskih ćelija na celom tkivnom preseku u odnosu na intenzitet pozitivnih kontrola koje se rade u isto vreme. Intenzitet se smatra merom kvaliteta, a dozvoljava i dalje formiranje kombinovanog scoring sistema.

3) Interpretacija analize treba da obezbedi korišćenje jedne od tri međusobno isključive interpretacije, koja treba da bude bazirana na sledećim kriterijumima:

a) Receptor pozitivni (ili ER ili PR). Lista preporuka isključuje minimum od 1% pozitivnih jedara tumorskih ćelija za ER/PR za uzorke koji se smatraju pozitivnim. Nema saglasnosti o opsegu graničnih vrednosti receptora, pa se takav termin i ne koristi.

b) Receptor negativni. Tumore koji pokazuju manje od 1% pozitivno obojenih jedara tumorskih ćelija za ER ili PR bilo kog intenziteta, treba smatrati negativnim, što se bazira na podacima da takvi pacijenti nemaju značajan benefit od endokrine terapije. Uzorke treba smatrati negativnim samo u prisustvu odgovarajućeg prebojavanja spoljašnje i unutrašnje kontrole. Uzorak sa odsutnom unutrašnjom kontrolom (normalni epitel dojke) negativan na ER i/ili PR receptorsku analizu, treba ponovo analizirati korišćenjem drugog tumorskog kalupa ili drugog uzorka tumorskog tkiva i označiti kao uzorak koji ne može da se prepozna pre nego ga proglasiti negativnim.

c) Neprotumačljivi receptori. Lista preporuka je saglasna da ne postoji apsolutna isključivost analize. Ipak, rezultat se može smatrati netumačljivim ukoliko uzorak nije bio prilagođen preanalitičkim specifikacijama vodiča. Okolnosti koje dovode do netumačljivih rezultata uključuju testiranje iglenih biopsija ili citoloških uzoraka fiksiranih u alkoholu, korišćenje drugih fiksativa a ne 10% neutralnog puferisanog formalina, biopsije fiksirane u intervalu kraćem od 6 sati ili dužem od 72 sata, uzorci čija je fiksacija odložena za više od 1 sat, uzorci koji su ranije dekalcinisani korišćenjem jakih kiselina i uzorci sa neadekvetnim bojenjem unutrašnje kontrole (uključujući unutrašnje normalne epitelne elemente) ili spoljašnje kontrole.

Lista preporučuje korišćenje nekih neobavezujućih elemenata:

1) Opominjući nalaz može da bude kod negativnih ER i PR analiza, kada je histopatologija tumora skoro uvek udružena sa ER i PR pozitivnim rezultatima. Tu se pre

svega misli na tubularne, lobularne i mucinozne histološke tipove tumora sa Nottingham scorrom 1. Rečenica koja opominje treba da ukaže da iako je tumor kod pacijenta ER negativan, tumori istog histološkog tipa ili Nottingham scora skoro uvek su ER-pozitivni. 2) Merenje procenata i intenziteta može patolozima obezbediti jedan mešoviti skor kao što je H skor, Allred skor ili Quick skor.²⁶⁹

2.4.2.2 Kvantitativna imunohistohemijska procena ekspresije hormonskih receptora

Od samog početka, imunohistohemija je prilagođena različitim markerima ćelijskih linija i tipovima tkiva, a u cilju da pomogne u dijagnozi i klasifikaciji pojedinih tumora.²⁹¹ U takvim uslovima imunohistohemija se upotrebljava kao "specijalno bojenje", čiji rezultati se kvalitativno interpretiraju od strane patologa. Danas je pažnja usmerena na prikazivanje prognostičkih markera u tumorskim ćelijama, za šta je zaslužno otkrivanje brojnih regulatornih proteina sa odgovarajućim specifičnim antitelima. Imunohistohemija je brzo adaptirana za nove potrebe, ali na takav način da je kvantitativni momenat postao glavni. Nije više dovoljno pitanje "da li je bojenje prisutno", već pitanje "koliko ga ima".²⁹¹ Ovakvo razmatranje otkriva ograničenja imunohistohemije u semikvantitativnom smislu, a sa druge strane mogućnosti iskorišćenja punog potencijala imunohistohemije kao prave kvantitativne imunoprobe na tkivnim uzorcima. Očigledno, da bi se dobili imunohistohemijski rezultati koji se mogu kvantifikovati, čitava procedura bojenja mora da bude standardizovana.²⁹²⁻²⁹⁶

Za razliku od procene membranskih markera, procenjivanje jedarne ekspresije pojedinih antigena se mogu kasnije razmatrati i kroz prostorne obrasce ekspresije, a ne samo običnim merenjima intenziteta imunohistohemijske reakcije.²⁹¹ Faktori analize ekspresije ER i PR receptora uključuju inter- i intraobserverske razlike, kao i granične vrednosti koje se odnose na procenat i intenzitet obojenih tumorskih jedara.²⁹⁷

Do pre par decenija sadržaj ER i PR receptora u tumorskim tkivima je određivan biohemijskim metodama.²⁹⁸ Ovim metodama se određivala količina supstancija po težini homogenizovanog tumorskog tkiva i tako su se dobijali kvantitativni rezultati. Strukturne karakteristike tumora, kao što su celularnost, heterogenost i raspored vezujućih mesta

obojenih reagensima, značajnih za određivanje prognoze pacijenata,²⁹⁹ se ne mogu objasniti biohemijskim metodama.³⁰⁰ Sa razvojem imunohistohemije i raspoloživih specifičnih monoklonskih antitela na steroidne receptore, ove metode se opsežno koriste za njihovu vizuelizaciju.²⁹⁸ Imunohistohemijske metode imaju nekoliko prednosti u odnosu na biohemijske metode: zahtevaju manje uzorke, jeftinije su, a istovremena primena drugih dijagnostičkih metoda (na primer mamografije) omogućuje identifikaciju tumora manjih od 1 cm.^{301,302}

Korist od kvantifikacije ekspresije hormonskih receptora je dobro proučena.³⁰³⁻³⁰⁶ Mnoge studije su ustanovile prediktivni nivo ekspresije hormonskih receptora u pogledu preživljavanja bez bolesti i globalnog preživljavanja, ali u smislu pozitivnosti ili negativnosti ekspresije hormonskih receptora, sa dogovorenom granicom imunohistohemijski pozitivnih jedara. Osim toga, pojedine studije su korelirale prognozu sa subjektivnim skorom intenziteta prosečne jedarne prebojenosti.³⁰⁷⁻³⁰⁹ De Sombre i saradnici su saopštili statistički značajnu korelaciju između intenziteta imunohistohemijskog bojenja jedara na ER receptore i preživljavanja bez bolesti kao i globalnog preživljavanja.³⁰⁷ Reiner i saradnici su zatim pokazali da bolesnice sa jačim jedarnim imunobojenjem na ER receptore imaju najbolju prognozu.³⁰⁸ Za razliku od ove dve studije Esteban se posvetio sistemima za analizu slike u cilju kvantifikacije imunohistohemijskog bojenja. Tako je pokazano da intenzitet imunohistohemijske reakcije može da izdvoji grupu bolesnica sa statistički značajnijim rizikom od pojave recidiva i smrtnog ishoda.³¹⁰

Mada je ekspresija ER receptora udružena sa boljom diferentovanošću ILC-a i nižim jedarnim gradusom mnoge studije su pokazale da se ona takođe može smatrati nezavisnim prognostičkim faktorom.³¹¹ Mnogo važnije je da je ekspresija ER receptora najpouzdaniji prediktivni faktor odgovora na endokrinu terapiju kod karcinoma dojke.³¹² Kvantitativna analiza ekspresije ER receptora u jedrima tumorskih ćelija se može dovesti u vezu sa značajnim kliničkim parametrima, kao što su vreme dijagnoze, odgovor na endokrinu terapiju i preživljavanje.³¹³ Međutim, autofluorescenca kao nerazdvojivi pratilac tkiva fiksiranih formalinom, kao i razlika u karakteristikama mikroskopa mogu da otežaju dobijanje preciznih i proverljivih kvantitativnih podataka. Pojedini autori su pozadinsku autofluorescencu uspeli da svedu na minimum, fluorescencom koja nije

varirala iz dana u dan, kao i korišćenjem kombinacije magarećeg i kozjeg seruma kao sekundarnih antitela.³¹³

Procena ekspresije hormonskih receptora u jedrima tumorskih ćelija karcinoma dojke je deo rutinske dijagnostike, a omogućuje važne informacije o prognozi i relevantnom terapijskom pristupu.³⁰² Danas je imunohistohemijska procena ekspresije ER i PR receptora široko prihvaćena.^{309,314,315} Procena intenziteta imunohistohemijskog bojenja, posebno u svrhu scoringa različitih histopatoloških uzoraka suštinski se zasniva na subjektivnom određivanju prosečnog prisustva vidljivog hromogena. U stvari, pozitivnost imunohistohemijski obojenih tkiva nije sasvim definisana kategorija i predstavlja više od običnog proseka nivoa intenziteta bojenja.³¹⁶

2.4.3. HER-2 receptori

HER-2 je proto-onkogen mapiran na hromozomu 17q21,^{317,318} a član je familije HER-2 gena.^{317,319,320} HER-2 gen kodira transmembranski glikoprotein od 185 kDa označen kao p185^{HER2}.^{317,321,322} p185^{HER2} je takođe poznat kao c-erbB-2 i obično se odnosi na HER 2 protein ili HER 2. HER 2 protein ima tri domena,³²³ a igra centralnu ulogu u signalnoj transdukciji faktora rasta.^{324,325}

Modeli humanih karcinoma ukazali su da jaka prekomerna ekspresija HER 2 receptora igra glavnu ulogu u onkogenoj transformaciji i tumorogenezi.^{326,327} Jaka prekomerna ekspresija HER 2 je uočena u 20-30% invazivnih karcinoma dojke.^{319,328}

Slično, Human epidermal growth factor receptor 2 (HER 2) služi kao značajan marker za benefit od "target" terapije, ovog tirozin kinaznog receptora, kao što je trastuzumab i lapatinib. U 2007. zajednički odbor sastavljen od strane American Society of Clinical Oncology (ASCO) i College of American Pathologists (CAP) sastavio je tehničke i analitičke odredbe koje se odnose na precizno HER 2 testiranje i izdao zbirku vodiča koji bi imali pozitivan uticaj na evaluaciju i tretman žena sa karcinomom dojke.³²⁹

HER-2/neu genski produkt retko se imunohistohemijski detektuje u "in situ" i invazivnim lobularnim karcinomima.³³⁰ Reis-Filho i saradnici opisali su slučaj in situ i invazivnog E-cadherin negativnog pleomorfog karcinoma kod koga su c-myc i HER-2/neu bili amplifikovani.³³¹

2.4.4 BRCA 1 tumor supresorni gen

BRCA 1 je smešten na hromozomu 17q21 i kodira nuklearni protein od 220 kilodaltona sa 1863 aminokiseline.³³²⁻³³⁴ Taj protein reguliše aktivaciju transkripcije, popravku DNK, apoptozu, kontrolne tačke ćelijskog ciklusa i remodelovanje hromozoma.³³⁵ Kod familijarnih karcinoma dojke BRCA 1 predstavlja klasični tumor supresor gen.³³⁶ Urođene BRCA 1 genske mutacije su praktično nedetektibilne kod sporadičnih karcinoma dojke, pa otuda neki autori smatraju da gubitak funkcije BRCA 1 proteina dovodi do smanjene ekspresije ili nepravilne subcelularne lokalizacije ovog proteina.³³⁷⁻³⁴¹ Postoje sugestije da je BRCA 1 uključen u karcinogenezu sporadičnih tumora mehanizmima koji nisu povezani sa genskim mutacijama. Neki podaci ukazuju da epigenetski gubitak funkcije BRCA 1 može da se dogodi na transkripcionom nivou ili u sledećem koraku utičući na akumulaciju RNA i hipermetilaciju promotora.^{342,343} Lokalizacija BRCA 1 saopštena je u jedru i citoplazmi, gde su ispitivanja pokazala da se on nalazi u jedrima normalnih ćelija, a abnormalna je citoplazmatska lokalizacija.^{337-339,344,345} Jedan od mehanizama koji inhibiraju BRCA 1 ekspresiju je metilacija promotora, kojom se objašnjava trećina sporadičnih tumora dojke sa niskom ekspresijom ovog gena.³³⁴⁻³⁴⁶ Ovi podaci sugerisu da BRCA 1 predstavlja "čuvara" genoma, koji održava njegov integritet. Gubitkom njegove funkcije može se objasniti zašto BRCA 1 mutacije predisponiraju razvoj karcinoma, ali ne i sklonost ka određenim tipovima tumora, posebno ka karcinomima dojke i drugim hormon-zavisnim tumorima.³⁴⁷ BRCA-1 genomom objašnjava se 40-50% naslednih karcinoma dojke.

Po nekim autorima nasledni karcinomi dojke bez BRCA1 mutacija zastupljeni su sa 67%, dok su BRCA1 mutacije prisutne kod 33% naslednih karcinoma dojke.^{347,348} Drugi autori saopštavaju da je zastupljenost podjednaka.^{349,350} Što se tiče nenaslednih karcinoma dojke, aberantni BRCA1 protein je prisutan u 33%.³⁴⁹

BRCA 1 protein ima funkcionalne "ulazne" i "izlazne" jedarne signale, što znači da on može da bude lokalizovan u jedru ili u citoplazmi.³⁵¹ BRCA 1 je fosfoprotein koji se eksprimira i fosforiliše na cikličan način, sa maksimumom ekspresije/fosforilacije u kasnoj G1 ili ranoj do srednjoj S fazi ćelijskog ciklusa.^{352,353} Saopšteno je da kod

normalnog epitela dojke postoji i nuklearna i citoplazmatska prebojenost i da ne postoji povezanost citoplazmatskog bojenja i klinickog ponasanja.³⁴¹

BRCA-1 genomom objašnjava se 40-50% naslednih karcinoma dojke. BRCA-1 inhibira signalni put ligandom aktivisanog ER-Alfa, posredstvom estrogen-reaktivnih elemenata i tako blokira funkciju AF2 kod ER-Alfa kao aktivatora transkripcije.³⁵⁴ Iako BRCA 1 nije sekventno specifični DNK vezujući transkripcioni faktor, on može da bude u interakciji sam različitim transkripcionim faktorima i tako stimuliše ili inhibira njihovu aktivnost (p53, c-Myc, ATF-1, Jun B i dr.).³⁴⁷

2.4.5 p53 tumor supresorni gen

Kod sporadičnih karcinoma dojke identifikovano je nekoliko pretpostavljenih tumor supresornih genskih lokusa. To su studije gubitka heterozigotnosti i alelskog disbalansa, a do sada je samo za TP53 gen nađeno da je mutiran u značajnijem procentu kod sporadičnih karcinoma dojke.³⁵⁵ TP53 protein ima brojne funkcije: transkripcioni faktor gde je aktivator nekih gena, a supresor drugih. Najvažnije njegovo dejstvo je prevencija formiranja tumora i progresija, što je u vezi sa njegovom funkcijom "čuvara" genoma. Nakon oštećenja DNK, normalna ćelija stoji u G1/S fazi da bi se obezbedilo dovoljno vremena za "popravku". Ćelije sa alterisanim TP53 genom ne staju u G1/S fazi, tako da se oštećenja ne repariraju, a pojavljuje se genomska nestabilnost sa akumulacijom delecija i amplifikacija.^{355,356}

U normalnom tkivu dojke duktalni i lobularni epitel je p53 negativan.³⁵⁷ Nekoliko studija je pokazalo veliku učestalost p53 imunobojenja i p53 mutacija u BRCA 1 karcinomima u odnosu na sporadične slučajeve. Tako su te alteracije zapažene u 37-77% BRCA 1-udruženih tumora, dok su samo one bile prisutne u oko 20% sporadičnih kontrola.^{348,358-362} Osim toga, nekoliko zapažanja sugerišu da BRCA 1 mutacije utiču na tip i distribuciju p53 mutacija viđenih kod karcinoma dojke. Komparacijom spektra p53 mutacija kod BRCA 1 pacijenata sa onim u sporadičnim tumorima, dobija se značajna razlika u distribuciji i izmenama baznih parova. Mutacije A-T baznih parova su češće kod BRCA 1 udruženih tumora. Dosta tih mutacija ranije nije saopšteno kod humanih karcinoma, dok su se druge dešavale veoma retko. Promene su bile učestale na p53

kodonima koji nisu bili mutaciona "opasna mesta", a mutirani su van p53 DNK-vezujućeg mesta.³⁶³ Prisustvo tih izmenjenih amino kiselina na ne-DNK-vezujućim mestima p53 molekula, mogu da predstavljaju jednu interakcionu površinu za drugi, nepoznati protein.

Kada se uporedi sa infiltrativnim duktalnim karcinomom, klasični ILC je mnogo češće Cathepsin D pozitivan, ali je tipično negativan na p53 protein i vimentin.³⁶⁴ Nuklearna reaktivnost na p53 detektovana je u mnogim slučajevima pleomorfnog ILC-a.¹⁸³

2.4.6 Ki-67 proliferativni marker

Protein Ki-67 je jedarni fosfoprotein čija ekspresija zavisi od faze ćelijskog ciklusa. Ki-67 je prisutan u svim ćelijama koje prolifериšu, pa otuda proističe i veliki značaj Ki-67 kao markera proliferacije.³⁶⁵ Korišćenjem Ki-67 antitela može se detektovati nehistonski jedarni protein od 395 kDa, koji je prisutan u svim aktivnim fazama ćelijskog ciklusa osim u G0 fazi.³⁶⁵ Proliferacioni Ki-67 marker se smatra prognostičkim faktorom za karcinom dojke i ispitivan je u nekoliko većih studija.³⁶⁶⁻³⁶⁸

Prema preporukama St.Gallen konsenzus konferencije iz 2009. godine proliferativni Ki-67 indeks u karcinomima dojke može da bude: 1) nizak (do 15%), 2) srednji (16-30%) i 3) visok (preko 31%), tako da su preporučene granične vrednosti 15% ili 30%.³⁶⁹ U tom smislu, pojedini autori su za graničnu vrednost koristili Ki-67 indeks od 20%.³⁷⁰

2.4.7 E-cadherin

E-cadherin je epitelno-specifični molekul uključen u ćelijsko-ćelijsku adheziju, koji ima ulogu tumor supresornog gena tumorske invazije. Kada se pravi poređenje sa invazivnim duktalnim karcinomima, E-cadherin ICH ekspresija se značajno smanjuje ili gubi kod većine ILC-a,^{33,57,371-374} a takođe se gubi i ICH reaktivnost za alfa-,beta- i gama-katenine.³⁷¹ Quershi i saradnici našli su E-cadherin reaktivnost u 203 od 204 (99,5%) invazivnih duktalnih karcinoma.³⁷⁴ Među klasičnim ILC-ima 44 od 49 (90%) bilo je E-

cadherin negativno, a 5 (10%) E-cadherin pozitivno. Učestalost E-cadherin negativnosti bila je neznatno manja - 8 od 10 (80%) među pleomorfim lobularnim karcinomima. Gubitak E-cadherin reaktivnosti kod karcinoma koji izgledaju po histološkim kriterijumima kao duktalni se mnogo češće viđa kod loše diferentovanih tumora,^{33,374} ali se dešava i kod dobro diferentovanih karcinoma.³⁷⁵

Gubitak E-cadherinske imunoreaktivnosti je dosledno praćen kod klasičnog i pleomorfog LCIS-a sa ili bez ILC-om.^{376,377} Kada su proučeni komparativnom genomskom hibridizacijom, istovremena prisutnost LCIS i ILC-a kod svakog pacijenta ponaosob prikazala je slične obrasce genomskih promena, sugerišući klonalnost i progresiju od in-situ do invazivnog karcinoma.^{378,379} U jednoj studiji upoređivani su LCIS i ILC kod 24 pacijenata. Kod svih je detektovan gubitak 16q kraka i zaključeno je da velika sličnost u genomskim promenama između in situ i invazivnih komponenti tumora jasno prikazuju običnu klonalnost dve promene.³⁷⁹

Katenini su proteini uključeni u povezivanje E-cadherin membranskog kompleksa sa intracelularnim aktinskim citoskeletom. Saopšteno je da lobularni karcinomi klasičnog i pleomorfog tipa prikazuju odsustvo membranske imunoreaktivnosti za katenin, paralelno sa gubitkom E-cadherinske reaktivnosti kod tih karcinoma.^{380,381} Kao što se ponekad dešava sa E-Cadherin imunohistohemijski, p120 katenin retko ima tačkasto membransko bojenje "u vidu brojanice" kod ćelija lobularnog karcinoma. Jako difuzno citoplazmatsko ili tačkasto paranuklearno p120 katenin bojenje obično se viđa kod ćelija lobularnog karcinoma dojke.^{380,381} Nasuprot tome, duktalni karcinomi i normalni epitel dojke pokazuje kontinualnu membransku p120 kateninsku reaktivnost. Međutim, Brandt i saradnici zapazili su slabo membransko p120 kateninsko bojenje u 10% duktalnih karcinoma i zaključili da taj deo promena može da bude pogrešno klasifikovan kao lobularni karcinom, ako se dijagnoza zasniva na p120 katenin bojenju.³⁸² Mada je E-cadherin bojenje samo po sebi dovoljno da bi se napravile razlike između lobularnih i duktalnih karcinoma, u većini slučajeva p120 katenin može da bude od pomoći zajedno sa E-cadherinom kod dvosmislenih slučajeva.²⁸

2.4.8 Ostali biomarkeri od značaja za dijagnozu lobularnog karcinoma dojke

Prekomerna ekspresija Cyclin D1 onkogen je otkrivena u značajnom delu invazivnih lobularnih karcinoma.²²⁵ Za većinu klasičnih ILC-a saopšteno je da pokazuju Cyclin D1 protein reaktivnost.^{225,383} Imunohistohemijska studija otkrila je ekspresiju Cyclina D1 u 80% ILC-a, a vrlo malu učestalost imunoreaktivnosti kod LCIS-a.²²⁵ Većina Cyclin D1 pozitivnih ćelija je pokazala slabu reaktivnost na Ki-67. Nije utvrđena korelacija između Cyclina D1 i p27 ekspresije kod ILC-a, ali je pokazano da postoji obrnuta srazmera između p27 i Ki-67 u cyclin D1 pozitivnim tumorima. Takva zapažanja navode na zaključak da Cyclin D1 ne ubrzava normalno trajanje ćelijskog ciklusa kod ILC-a.²⁸ Neke studije pokazuju da između ekspresije cyclina D1 i TP53 nema statistički značajne razlike između duktalnih i lobularnih karcinoma, dok po nekim autorima postoje značajne razlike.³⁸⁴ Kod lobularnih karcinoma dojke ne postoji koakumulacija PT53 i cyclina D1, a kod duktalnih karcinoma postoji u 12%.^{384,385}

Ekspresija ER receptora je udružena sa prekomernom ekspresijom cyclina D1 kod svih lobularnih karcinoma. U 35% tumora dojke cyclin D1 je prekomerno ekspimiran. Iako duktalni i lobularni karcinomi imaju sličan procenat ekspresije cyclina D1, prekomerna ekspresija cyclina D1 bez odgovarajuće cyclin D1 genske amplifikacije kod lobularnih karcinoma dojke govori o molekularnim razlikama između lobularnih i duktalnih karcinoma dojke. Ciklin D1 indukuje tumorogenezu, ne preko ubrzanja ćelijskog ciklusa, nego kao onkogen, aktivacijom ER receptora.²²⁵

Povišena ekspresija cyclina D1 u invazivnom lobularnom karcinomu je zbog interakcije tumorskih ćelija sa strukturnim proteinima ili faktorima rasta iz strome. Invazivni lobularni karcinomi se zato jače boje na integrine koji služe kao receptori za matriksne proteine (alfa 1, alfa 6 i beta 1).²²⁵

Imunohistohemijske analize ekspresije receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) kod ILC-a nisu dale dosledne rezultate. Jedno saopštenje formulisalo je da su EGFR-pozitivni slučajevi mnogo manje uobičajeni kod ILC-a nego kod invazivnih duktalnih karcinoma, i ta razlika je statistički značajna.³⁸⁶ Drugi autori takođe saopštavaju manju učestalost EGFR-pozitivnosti u ILC-a nego kod IDC-a, ali razlika kod

njih nije statistički značajna.³⁸⁶ Treća grupa istraživača iznela je da ne postoji signifikantna veza između količine EGFR u tumoru i histološkog tipa.³⁸⁷

Mnogi tripl negativni tumori dojke imaju pozitivne bazalne citokeratine, a nađeno je da ekspresija citokeratina 14 udružena sa HER-2 ekspresijom. Predloženo je da se bazalni tip tumora i tripl negativni tip stave u posebne kategorije.³⁸⁸

Imunoreaktivnost na GCDFP-15 prisutna je kod ILC-a, a najviše kod onih sa pleomorfnom i signet ring citologijom.^{41,181,183,389,390}

Znatan broj ILC-a pokazuje reaktivnost na karcinoembrionalni antigen (CEA).³⁹¹⁻³⁹³ Intenzitet ekspresije je u korelaciji sa sekrecijom mucina, koja je prisutna kod tumora sa naglašenim "signet ring"-ćelijskim osobinama.

Različita reaktivnost za α -laktalbumin je opisana kod ILC-a i varira od 19% do 100%.^{391,392,394} Kazein- pozitivne ćelije nalaze se u većini lobularnih karcinoma, ali reaktivnost može da bude ograničena na samo nekoliko ćelija.²⁸

Grimelius-pozitivne ćelije su opisane kod manjeg broja ILC-a, i to uglavnom kod tumora sa posebnim načinom rasta.³⁹¹ Imunoreaktivnost na hromogranin zabeležena je i kod klasičnih i pleomorfni ILC-a, najviše do 5% tumorskih ćelija.¹⁸³ Granule sa gustim jezgrom "neurosekretornog" tipa takođe su detektovane elektronmikroskopski.^{391,395} Taj nalaz i prisustvo dva tipa tumora kod nekih slučajeva, može da sugerise da sitnoćelijski (oat-cell) neuroendokrini karcinomi mogu da budu varijanta ILC-a.³⁹⁶ Neki sitnoćelijski karcinomi dojke imaju komponentu ILC-a.²⁸

2.5 OSTALE METODE ISPITIVANJA LOBULARNOG KARCINOMA DOJKE

2.5.1 Citologija lobularnog karcinoma dojke

Dijagnoza ILC-a može da bude sugerisana korišćenjem FNA (Fine Needle Aspiration).^{397,398} Uzorak je često slabo celularan, a to je okolnost koja vodi u lažno negativnu dijagnozu.³⁹⁹ U jednoj seriji od 56 bolesnica, samo kod 29 (52%) je postavljena FNA dijagnoza ILC-a na citologiji.⁴⁰⁰ Deset od 27 bolesnica koje nisu podvrgnute FNA citologiji, dijagnostikovano je kasnije iglenom biopsijom. Slični podaci su saopšteni u seriji od 66 bolesnica sa ILC-om koji su ispitivani FNA metodom.

Citološki uzorci otkrili su karcinom u 27 (41%) slučajeva, a 20 (30%) slučajeva označeni su kao sumnjivi ili atipični. Negativni aspirati dobijeni su kod 19 (28%) bolesnica.⁴⁰¹ Na citološke rezultate, u znatnoj meri nije uticala veličina tumora.

Male ćelije ILC-a sa oskudnom, neupadljivom citoplazmom su pojedinačno razbacane ili u manjim grupama na pločicama FNA uzoraka.⁴⁰² "Signet ring" ćelijske forme mogu da se nađu, ali su one upadljive u manjem broju slučajeva. Jedna studija je otkrila da se intracitoplazmatski lumeni nalaze u 58% aspirata ILC-a.⁴⁰² Neki citoplazmatski lumeni mogu da sadrže centralnu kap zgusnutog sekreta. Ukoliko ona postoji pomaže u razlikovanju pravog intracitoplazmatskog lumena od nespecifičnih vakuola.⁴⁰³ Linearni raspored tumorskih ćelija je karakteristično obeležje aspirata sa klasičnim ILC-om. FNA uzorak dobijen od pleomorfnog ILC-a je "hibrid" između izgleda duktalnog i lobularnog karcinoma.⁴⁰² Uzorci su mnogo celularniji nego aspirati od klasičnog lobularnog karcinoma, ćelije su veće, a jedra su mnogo pleomorfija.⁴⁰⁴ Obrazac u vidu rozeta se može naći u aspiratu alveolarnog podtipa lobularnog karcinoma.⁴⁰² Intranuklearne vakuole su zastupljene sa manjom učestalošću kod podtipova nego u klasičnom ILC-u.⁴⁰⁵

2.5.2 Elektronska mikroskopija i ultrastrukturne karakteristike lobularnog karcinoma dojke

Kod lobularnih karcinoma dojke dominiraju pretežno svetle ćelije koje pripadaju B-tipu normalnih acinusa. A-ćelije, mioepitelne ćelije i epitelne ćelije izvodnih kanalića ne učestvuju u proliferaciji. Kao znaci proliferacije uočavaju se grupe epitelnih ćelija u vidu "mostića " ili "pupoljaka". Citoplazma proliferišućih ćelija je slabo diferentovana a broj normalnih ćelijskih organela je redukovan. Osim atipičnih diferencijacionih komponenti, u vidu fibrilarnih struktura se sreće veliki broj citozoma koji verovatno predstavljaju mikrotelašca i lizosome. Bazalna membrana koja okružuje acinuse lobularnog karcinoma, za razliku od normalnih lobula dojke, je zadebljana, a okolno vezivno tkivo je gusto i sadrži brojne aktivne fibroblaste.

Kod ILC-a se javljaju sledeći diferencijacione komponente koje nisu karakteristične za normalne ćelije žlezdanog epitela dojke:

- a) intracitoplazmatske fibrile, strukture u vidu pera sa vlaknima debelim od 50 do 60 Å u vidu koncentričnih nakupina oko ćelijskih jedara, ili u vidu grubo grudvaste forme koje se nalaze u okolini drugih ćelijskih organela. Nije uočena strukturna povezanost ovih elemenata sa dezmozomima na površini tumorskih ćelija.
- b) globularna inkluziona telašca, označena i kao citozomi, koja predstavljaju okrugle ili ovalne partikule, deponovane u citoplazmi, a veličine su 250-500 µm. Na većem povećanju prepoznaje se da je njihov matriks sastavljen od gusto zbijenih granula sa najvećim prečnikom od 200 Å, koje su okružene tankom (50 - 60 Å) membranom. Kod izvesnog broja citozoma sreću se vakuolarne i vezikularne zone prosvetljenja, a u drugim se vide izrazito zgusnuta i homogena područja granularnog matriksa. Ove ćelijske inkluzije su prisutne u ćelijama dubljih partija, kao i u ćelijama koje se graniče sa lumenom. Pritom, kod ćelija luminalnog sloja, one su znatno brojnije u apikalnom delu citoplazme.
- c) u lumenu terminalnih žlezda vide se elementi proliferacije sa suženjem i iščezavanjem lumena. Kada kod ILC-a proliferišu ćelije jednog tipa, i kada potpuno ispunjavaju lumen žlezda, svetlosnomikroskopski se uočava svetla prozirna citoplazma, a elektronooptički u tim brojnim svetlim ćelijama B-tipa postoji različiti sadržaj ribozoma. Tamne A-ćelije leže uglavnom pojedinačno na bazi ćelijske grupe i imaju obično manji udeo u proliferativnom procesu.
- d) mikrotelašca
- e) brojna lizozomima slična citoplazmatska inkluziona telašca.¹⁵

Elektronomikroskopske studije su pokazale poreklo LCIS-a iz lobularnih epitelnih ćelija. Intracitoplazmatski lumeni oivičeni mikrovilima su prisutni ultrastrukturno kod tipičnog slučaja. Protruzija LCIS ćelija kroz bazalnu membranu je neuobičajen fenomen koji je opisao *Ozzello*.⁴⁰⁶ *Anderson* je histohemijski dokazao diskontinuitet bazalne membrane u LCIS-u.⁴⁰⁷ Praznine se mogu dokazati i kod normalnih lobula.⁴⁰⁷

Elektronska mikroskopija ILC-a pokazala je različite ultrastrukturne nalaze.^{39,391,408,409} Kod nekih slučajeva ćelije LCIS-a i ILC-a imaju bledu ili svetlu citoplazmu sa malo organela. Intracitoplazmatski lumeni su često ali ne uvek prisutni.

Ćelije sa tamnim iregularnim jedrima i citoplazmom bogatom organelama odgovaraju slučajevima "mioidnog" ILC-a. Nađeno je da neoplastične ćelije u alveolarnoj formi ILC-a imaju citoplazmu siromašnu organelama sa ovalnim bledim jedrima i neupadljivim jedarcima.^{391,409}

2.5.3 Protočna ("flow") citometrija i molekularna genetika

Molekularne analize sprovedene u cilju detekcije gubitka heterozigotnosti u slučajevima LCIS-a i ALH, izolovanih mikrodisekcijom, pokazale su gubitak heterozigotnosti (LOH) hromozoma 11q13 u 33% ispitivanih slučajeva.²²⁶ Frekvencija gubitka heterozigotnosti je veća (50%) u LCIS-u udruženog sa infiltrativnim lobularnim karcinomom nego u LCIS-u bez invazivne komponente (11%). Gubitak heterozigotnosti 11q13 je otkriven u 10% slučajeva atipičnih lobularnih hiperplazija i 41% infiltrativnih lobularnih karcinoma. Zaključeno je da gubitak heterozigotnog statusa 11q13 u LCIS-u može da bude marker povećanog rizika za razvoj sledećeg - invazivnog karcinoma. Gubitak E-cadherin i katenin reaktivnosti je rani događaj u razvoju lobularnih neoplazmi. Progresija karcinoma "in situ" u invazivni tip udružena je sa mutacijom E-cadherinskog genskog lokusa.⁵⁶

Klasični ILC-i proučavani protočnom citometrijom tipično su bili diploidni sa niskom frakcijom S faze, a ti faktori su imali malu prediktivnu i prognostičku ulogu.^{410,411} Nayar i saradnici proučavali su gubitak heterozigotnog stanja na hromozomu 11q13 u ILC-ima koristeći mikrosatelitne markere INT2 i PYGM. Gubitak heterozigotnosti nađen je u 9 od 22 (41%) slučajeva. Postavljen je postulat da je gubitak heterozigotnog stanja na hromozomu 11q13 u vezi sa gubitkom jednog ili više tumor-supresorskih gena, a takva promena može doprineti kancerogenezi u dojci.²²⁶

Nishizaki i saradnici upoređivali su učestalost genetskih alteracija u IDC-ima i ILC-ima. Dobijeni broj DNA kopija bio je značajno niži kod lobularnih karcinoma. Međutim, 15 od 19 (79%) ILC-a imali je povećani broj kopija 1q, a 12 (63%) pokazalo je gubitak 16q. Takve genetske promene nisu bile u signifikantnoj korelaciji sa nodalnim statusom ili histološkom kvalifikacijom kao klasični ili pleomorfni podtip. Učestalost

gubitka 16q bila je veća u lobularnim nego u duktalnim karcinomima, a kod ILC-a je nađena mala učestalost 8q i 20q uvećanja.²⁸

2.6 PROGNOZA LOBULARNOG KARCINOMA DOJKE

2.6.1 Prognoza LCIS-a i atipične lobularne hiperplazije

Neki istraživači koji ne prave razliku između atipične lobularne hiperplazije i LCIS saopštili su procenu rizika za obe lezije pod nazivom lobularne neoplazije.^{22,412} Dijagnoza atipične lobularne hiperplazije „rezervisana je“ za atipični epitel koji zahvata lobularnu jedinicu koji se približava u izgledu tako da se može prihvatiti kao LCIS. Gubitak dve ćelijske populacije iznad bazalne membrane, skoro obliterisani lumeni u 50% zahvaćenih struktura i blago prošireni duktuli su neophodni kriterijumi za dijagnozu ALH. Ćelije imaju malu do srednju količinu svetle citoplazme i teže da imaju pravilan odnos između sebe. Jedra su okrugla, slična jedna drugima i hiperhromna. Na bazi ove definicije atipična lobularna hiperplazija je dijagnostifikovana u 3,6 % žena. 87% bolesnica sa atipičnom lobularnom hiperplazijom ima od 31 do 55 godina, i svi sledeći karcinomi razvili su se kod žena koje su bile tih godina.⁴¹²

Sledeća analiza iste serije bolesnica opisala je značaj duktalnog zahvatanja kao marker za rizik od razvoja karcinoma dojke kada je udružen sa atipičnom lobularnom hiperplazijom.⁴⁶ Duktalno zahvatanje je prisutno u 37% bolesnica sa ALH. Po nekim autorima oko 20% žena sa ALH kasnije razvija invazivni karcinom dojke.⁴¹³ Page i saradnici su saopštili da se rizik za razvoj karcinoma kod žena sa ALH povećava kada postoji prateća atipična duktalna hiperplazija (ADH).⁴¹⁴ McLaren i saradnici su opisali 252 slučaja žena sa ALH koje su praćene prosečno 17 godina.⁴¹⁵ Invazivni karcinom je dijagnostifikovan u 19% tih žena posle prosečnog intervala od 17 godina. Autori su naglasili relativno veliku učestalost specijalnih tipova ili podtipova sa dobrom prognozom uključujući infiltrativni lobularni, tubularni tubulolobularni, „medularnu varijantu“ i „nespecifične tipove karcinoma sa lobularnim karakteristikama“. Posle 13-ogodišnjeg praćenja, 10% bolesnica sa karcinomom specijalnog tipa je umrlo. Ovi podaci

pokazuju da su bolesnice sa ALH predisponirane da razviju relativno povoljnije tipove invazivnih karcinoma.⁴¹⁵

Termin lobularna neoplazija je uveden najviše sa ciljem da se izmeni tretman LCIS izbacivanjem termina karcinom iz dijagnoze.⁴³ Lobularna neoplazija odnosi se na spektar lobularnih proliferativnih lezija uključujući blagu atipiju, atipičnu hiperplaziju sa parcijalnim lobularnim zahvatanjem i potpuno razvijeni LCIS koji je zahvatio 1 ili više lobula. U kliničkoj praksi, korišćenje ovog termina dovodi do situacije u kojoj ista dijagnoza ne pravi razlike među pacijentima sa minimalnim proloferativnim lezijama, koje mogu da budu blaga atipična hiperplazija, i pacijenata koji imaju potpuno razvijeni oblik LCIS-a. Mada otklanja potrebu da se napravi razlika između ALH i LCIS, dijagnoza lobularne neoplazije još uvek zahteva razlikovanje obične lobularne hiperplazije od neoplastične proliferacije u lobulima. Konačno podaci dobijeni od Mastracci i saradnici ukazuju na molekularnu osnovu nivoa mutacije E cadherin gena za pravljenje razlike između ALH i LCIS.⁵⁶ Zbog prethodno navedenih razloga za razlikovanje ALH i LCIS-a, a termin LIN treba izbegavati kad god je moguće u kliničkoj praksi. Termin lobularna neoplazija maskira naše podele i stvara lažni utisak specifičnosti za bolesnicu i kliničara. Opseg morfoloških promena obuhvaćenih lobularnom neoplazijom je vrlo širok, uključujući ALH, klasični LCIS i pleomorfni LCIS čineći ovu dijagnozu jednom od najmanje specifičnih u patologiji dojke, koja se ne preporučuje.²⁸

Kliničko praćenje je preporučljivo kada se postavi dijagnoza ALH i za većinu pacijenata sa LCIS. Tamoxifen može da bude indikovano. Biopsija kontralateralne dojke može da se uradi ako postoje kliničke indikacije. Kliničko praćenje pacijenata sa ALH i LCIS se preduzima do kraja života pacijentkinja zbog povećanog rizika za kasniji razvoj karcinoma. Mogućnosti da antiestrogen kao što je tamoxifen može da inhibiše evoluciju ALH ili LCIS je predložena 1978.³⁰ Kasnije je zapaženo da bolesnice koje primaju tamoxifen kao adjuvantnu terapiju pratećeg invazivnog karcinoma imaju manje očekivanu učestalost od razvoja kontralateralnog karcinoma.^{395,396} Posle 5 godina od tretmana tamoxifenom žene sa LCIS-om imaju 56 % manji rizik za razvoj invazivnog karcinoma.⁴¹⁶

2.6.2 Prognoza invazivnog lobularnog karcinoma dojke

Prognoza bolesnica sa ILC-om saopštena je u mnogobrojnim studijama. Newman je prikazao da je kod 22 bolesnice, koje su mastektomisane zbog ILC-a, smrtnost u roku od 8 godina iznosi 14% kod stadijuma I i 46% kod stadijuma II bolesti.⁶⁷ Ashikari je prikazao 5-godišnje preživljavanje od 86% i 10-godišnje preživljavanje od 74% za stadijum I bolesnica sa ILC-om tretiranih mastektomijom.¹⁰⁶ Nije bilo značajnih razlika u preživljavanju kada se te bolesnice porede sa ženama tretiranim zbog IDC-a sa istim nodalnim statusom.

Nekoliko serija uključilo je dovoljno slučajeva mastektomija da bi se uporedila prognoza bolesnica sa histološki klasičnim i različitim podtipovima ILC-a

Dixon je našao u 103 bolesnice sa ILC-om da one sa klasičnim ILC-om imaju mnogo povoljniju prognozu, nego one sa različitim podtipovima ILC-a, kada su tretirane mastektomijom.⁶⁸ Zbog toga što bolesnice sa klasičnim i drugim podtipovima nisu stadirani, takve rezultate treba uzimati sa rezervom. Na primer, učestalost slučajeva sa stadijumom I varira od 33% kod mešovitog lobularnog podtipa do 74% kod alveolarnog podtipa. Osim toga, većina bolesnica koja je bila uključena u ovu studiju nije imala disekciju aksile.

Analizom 171 bolesnice sa ILC-om otkriveno je da žene sa klasičnim podtipom imaju neznatno bolju prognozu u odnosu na one sa solidnim i alveolarnim podtipom. Najbolju prognozu uz 12-godišnje statističko preživljavanje od 100% je zapaženo kod bolesnica sa tubulolobularnim karcinomima.¹⁰⁶ Sistemsko vraćanje bolesti otkriveno je u 44% bolesnica sa klasičnim ILC-om i 40% do 57% bolesnica sa različitim podtipovima ILC-a. Rezultati ove studije su teško procenjivi zbog toga što tumori nisu stadirani i nisu tretirani na isti način. Hirurška terapija sastojala se od proste mastektomije, potkožne mastektomije ili lampektomije praćene ozračivanjem cele dojke, a status limfnih nodusa određivan je trostrukom biopsijom nodusa pre nego aksilarnom disekcijom.¹⁰⁶

Frost je prikazao 92 bolesnice sa ILC-om subklasifikovanih po histološkom načinu rasta. Nije postojala statistički značajna veza između arhitekture ILC-a (klasičnog, alveolarnog, solidnog i mešovitog) i prognoze. Podtipovi su bili identični u odnosu na

godine života, veličinu tumora, status limfnih nodusa i ekspresiju hormonskih receptora.⁴¹⁷

Upoređivanjem 176 žena sa klasičnim ILC-om i 54 žene sa različitim podtipovima ILC-a, globalno preživljavanje i vreme bez bolesti su bili isti u obe grupe. Mada nije bilo statistički značajno, preživljavanje stadijuma I i nivoa I nodus pozitivnog stadijuma II bolesnica sa klasičnim ILC-om je bilo bolje od bolesnica sa različitim podtipovima ILC-a istog stadijuma. Kada se napravi razlika prema klasičnom ILC-u, svaki od podtipova ILC-a pokazuje tendencu mnogo učestalijeg recidiva tumora i smrti zbog bolesti, ali nijedna od razlika nije statistički značajna.⁷² U daljoj analizi upoređivane su žene sa klasičnim ILC-om sa serijom bolesnica tretiranih zbog IDC-a. Bolesnice sa stadijumom I klasičnog ILC-a imale su značajno bolje preživljavanje bez bolesti, nego bolesnice sa dokazanim karcinomom istog stadijuma. Nije bilo signifikantne razlike u preživljavanju bolesnica sa ILC-om i IDC-om stadijuma II.⁷²

Weidner i Semple su našli da bolesnice sa pleomornim podtipom ILC-a imaju značajno gore preživljavanje u periodu bez bolesti nego one sa klasičnim ILC-om.¹⁸² Poređenje je bazirano na istim grupama u odnosu na veličinu tumora i status limfnih nodusa.¹⁸² Analizom bolesnica koje imaju ILC i negativne limfne noduse dobijen je relativni rizik od ponovnog javljanja od 4,13 za nodus negativne pleomorfne ILC-e, 7,35 za nodus pozitivne klasične ILC-e i 30,4 za nodus pozitivne pleomorfne lobularne karcinome. Sledeća komparativna studija iz iste institucije otkrila je kraći period preživljavanja bez bolesti za bolesnice sa pleomornim lobularnim karcinomom, ali nije bilo signifikantne razlike u odnosu na klasični lobularni karcinom u pogledu globalnog preživljavanja.⁴¹⁸ Bentz i saradnici saopštili su fatalni ishod u 9 od 12 (75%) bolesnica sa pleomornim lobularnim karcinomom, uz srednje preživljavanje od 2,1 godine posle dijagnoze. Ovaj ishod je značajno gori od poređenja grupa bolesnica sa IDC-om i klasičnim ILC-om.¹⁸⁶

U poređenju sa klasičnim ILC-om, pleomorni lobularni karcinom je češće aneuploidan sa dužom S-fazom, ćelije imaju veće nuklearne dijametre,⁴¹⁹ veći mitotski indeks i veći Ki-67 indeks.⁴¹⁸ U jednoj studiji koja je ispitivala ova dva tipa lobularnog karcinoma, nisu uočene značajne razlike u pogledu unutartumorske vaskularizacije.⁴¹⁸

Nema jasnih dokaza da pacijentkinje sa multifokalnim/multicentričnim karcinomom dojke imaju gori klinički ishod nego one sa unicentričnim karcinomom dojke, a tretirane su na isti način.^{420,421} Ove studije sugerišu da multicentričnost sama za sebe nije indikacija za postmastektomijsku radioterapiju niti za izmenjene preporuke adjuvantne sistemske terapije.

2.7 TERAPIJA LOBULARNOG KARCINOMA DOJKE

2.7.1 Hirurška terapija lobularnog karcinoma dojke

Yeatman je saopštio da je mastektomija pre nego lampektomija sa poštedom dojke, značajnije češće preduzimana kod bolesnica sa ILC-om, nego kod bolesnica sa IDC-om.⁴²² Preorijentisanje od lampektomije do mastektomije je urađeno mnogo češće kod bolesnica sa ILC-om zbog "pozitivnih" resekcioni ivica nakon lampektomije. Ukoliko se mastektomija preduzima trebalo bi da bude tipična, sa minimalnom mogućnošću ostavljanja tkiva dojke u predelu hirurške intervencije. Subkutana mastektomija nije pogodna za ove bolesnice.

Singletary je analizirao podatke National Cancer Data Base od 1989. do 2001. da bi ispitao kretanje u tretmanu invazivnog lobularnog karcinoma.⁴²³ Među 21596 bolesnica odabranih za studiju, 8108 (37,5%) imalo je neku od poštenih operacija dojke, a u ostalih 62,5% urađena je mastektomija. Učestalost poštenih operacija dojke bila je u obrnutoj srazmeri sa TN-stadijumom, ali se povećala sa oko 20-25% u 1998. do 50-60% u 2001. Takođe se udvostručila učestalost mapiranja zbog stadiranja sentinel limfnih nodusa od oko 10-15% do 20% i blizu 30% u istom periodu. Bitne regionalne razlike u učestalosti poštenih operacija dojke sa ILC-om su nađene u rasponu od 40-50% u Novoj Engleskoj, Srednjem Atlantiku i Pacifičkim regionima do oko 25% u južnim i centralnim regionima.⁴²³

Mnogi izveštaji o poštenim operacijama sa radioterapijom su objavljeni. Podaci dobijeni iz nerandomiziranih studija ukazuju da lokalna kontrola i preživljavanje za bolesnice sa ILC-om tretiranih poštenim operacijama dojke su slični podacima dobijenim za duktalne karcinome sa 5-godišnjim praćenjem.^{87,424-430} Većina ovih studija

nema sveobuhvatne podatke za 10-godišnje praćenje, koje je bitno iz razloga što je od strane nekih istraživača zapažen trend kasnog lokalnog recidiva ILC-a u dojci.¹⁰⁷

Warneke i saradnici analizirali su 111 bolesnica tretiranih zbog ILC-a stadijuma I i II u periodu preko 10 godina na Univerzitetu u Arizoni. Nije bilo razlike u učestalosti lokalnog recidiva među bolesnicama sa pošteđnim operacijama i mastektomisanim bolesnicama. Kada se upoređi sa bolesnicama koje su imale lampektomiju i radioterapiju, grupa mastektomiranih bolesnica se karakterisala: većom kliničkom veličinom tumora (3cm prema 1,6 cm), većom veličinom tumora (2,6cm prema 2,1cm) i mnogo češćim metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima (44% prema 27%). Među 34 bolesnice (37%) koje su imale lampektomiju sa radioterapijom, postojala je 1 (3%) sa lokalnim recidivom i srednjim opštim preživljavanjem od 83,6 meseci. Ostalih 59 (63%) bolesnica podvrgnuto je modifikovanoj radikalnoj mastektomiji, posle koje je bilo 2 slučaja (3%) lokalnog recidiva.⁴³⁰

Kurtz je našao da je pojava lokalnih recidiva posle 5 godina od tretmana mnogo češća kod bolesnica sa ILC-om (13,5%) nego kod bolesnica sa IDC-om (8,8), ali razlika nije statistički značajna. Praktično, svi rekurentni tumori su bili na nekoj distanci od primarnog tumora ili su bili multifokalni. Petogodišnje statističke stope preživljavanja bile su 100% za nodus negativne, a 77% za nodus pozitivne bolesnice.⁴²⁴ Schnitt je saopštio da je petogodišnji statistički rizik od lokalnog recidiva bio skoro identičan za bolesnice sa IDC-om (11%). Stopa od 12% za rekurencu ILC-a je veća od stope rekurencije kod bolesnica sa IDC-om koji ima oskudno širenje u intraduktalne delove (5%), ali manje u poređenju sa stopom rekurencije od 23% za duktalne karcinome sa opsežnim intraduktalnim karcinomom. U ovoj seriji, sve rekurencije ILC-a su bile u okolini početnog primarnog tumora. Karakteristike ILC-a koje su u vezi sa većom učestalošću lokalnih recidiva bile su: multifokalna invazija primarnog tumora, signet-ring ćelijska citologija i različiti histološki načini rasta.²⁸

U studiji 60 bolesnica sa ILC-om posle lampektomije i radioterapije i periodom praćenja od 2,5 do 10 godina (srednje vreme praćenja 5,5 godina), dve bolesnice su imale rekurencu u lokalnim nodalnim regionima, a jedna je razvila rekurentni karcinom u zahvaćenoj dojci.⁴²⁵ Tokom pet godina, kod 11 bolesnica javile su se udaljene metastaze,

što se završilo smrtnim ishodom u 6 slučajeva.⁴²⁵ White i saradnici saopštili su stope lokalnog recidiva od 3,3% za ILC i 4,2% za IDC.⁸⁷

Značajni su podaci iz studije koja se bavila upoređivanjem rezultata pošteditih terapijskih procedura u 1093 bolesnice sa IDC-om stadijuma I i II i 55 bolesnica sa ILC-om stadijuma I i II na Univerzitetu Pensilvanija u periodu 1977. i 1995. Medijana praćenja bila je 8,7 godina za bolesnice sa duktalnim i 10,2 godine za bolesnice sa lobularnim karcinomom. Nije bilo signifikantnih razlika u desetogodišnjim statističkim stopama za opšte preživljavanje, bolest specifično preživljavanje i dugo preživljavanje bez bolesti. Lokalne rekurencije bile su mnogo češće kod bolesnica sa ILC-om (18%), nego kod bolesnica sa IDC-om (12%), ali razlika nije statistički značajna. Interesantno je zapažanje 10-godišnje stope kontralateralnog karcinoma (lobularni 12% prema duktalnim 8%) koje se nisu značajno razlikovale. Ovi rezultati su dokumentovani sličnim rezultatima za žene sa stadijumom I i II lobularnog i dukalnog karcinoma, kojima je urađena poštedita operacija sa radioterapijom.⁴³¹

Zaključno, prethodni podaci sugerišu da ILC klasičnog citološkog tipa, bilo da je strukturno klasičan ili varijanta podtipa, može da bude uspešno rešen nekom od pošteditih terapijskih procedura. Kriterijumi za selektovanje bolesnica za takav tretman su u suštini isti kao i za IDC. Prisustvo invazivnog karcinoma na ivicama resekcije obično zahteva dalju eksciziju. Međutim, za razliku od duktalnih karcinoma, lobularni karcinom "in situ" na ivicama resekcije nije potrebno dodatno resecirati. Lampektomiju bi trebalo dopuniti ozračivanjem dojke, osim ako ne postoje posebne okolnosti.²⁸

Ograničen je broj korisnih informacija o tretmanu pleomorfnog ILC-a pošteditim operacijama. Ukoliko se desi, sugerise se da pleomorfni LCIS bude tretiran slično kao intraduktalni karcinom u pogledu procene ivice resekcije.²⁸

Adjuvantna hemioterapija je indikovana na bazi kriterijuma korišćenih za IDC. Postoji dokaz da ILC može da bude manje senzitivan na neke forme neoadjuvantne hemioterapije u odnosu na IDC.⁴³²

Rutinska biopsija kontralateralne dojke nije indikovana aktuelno raspoloživim podacima za bolesnice sa ILC-om.^{111,426,433} Kontralateralna biopsija je pogodna, kada je indikovana imidžing ili kliničkim nalazima, eventualno i kod bolesnica sa izraženim familijarnim opterećenjem ili drugim dokazom genetske predispozicije za karcinom

dojke. Brojne razlike u dugotrajnom riziku od bilateralnog karcinoma dojke (metahronog kao i sinhronog) među bolesnicama sa IDC-om i bolesnicama sa ILC-om u jednoj dojci su nerešive.²⁸ Podaci bazirani na ranijim studijama upotrebe Tamoxifena i drugih lekova kod bolesnica u cilju inhibicije razvoja kontralateralnog karcinoma ne smeju se direktno primeniti posle uvođenja ovih i ostalih selektivnih estrogen-receptor-modulišućih lekova.²⁸

2.7.2 Antiestrogena terapija

Karcinom dojke je vodeći malignitet kod žena koji se smatra odgovornim za preko 3.500.000 smrtnih ishoda širom sveta.¹ Estrogen igra ulogu u proliferaciji luminalnog sloja epitelnih ćelija dojke i razvoju karcinoma dojke. Oko 70% humanih karcinoma dojke pokazuje ekspresiju estrogenskih receptora.⁴³⁴ Karcinomi dojke su klasifikovani na bazi brojnih zahteva kao estrogen zavisni ili estrogen nezavisni tumori.^{434,435} Estrogen je transkripcioni faktor koji reguliše genetski program progresije ćelijskog ciklusa i rasta u žlezdama dojke. Antiestrogena terapija blokira sposobnost estrogena da kontroliše rast ćelija karcinoma dojke. To je vrlo delotvoran protein u borbi protiv estrogen zavisnih karcinoma dojke. Antiestrogene terapije blokiraju estrogene receptore:

- 1) kao selektivni modulatori (tamoksifen i raloksifen);
- 2) destabilizacijom i degradacijom estrogenih receptora selektivnom "down" regulacijom (fluvestrant) i
- 3) inhibicijom sinteze estrogena (inhibitori aromataze- anastrozol, leterozol), rezultujući značajnim smanjenjem tumorske progresije i rasta.⁴³⁶

Thomas William Nunn je 1882. uočio značaj ovarijalnih funkcija u rastu karcinoma dojke. Albert Schizinger 1889. je predložio hiruršku ooforektomiju u tretmanu karcinoma dojke. 37% bolesnica je imalo odgovor tumora na ooforektomiju, koja je saopštena ranije.⁴³⁷ "Ovarijalni hormon estrusa" i hormoni iz ovarijalnih tkiva bili su predmet istraživanja i 1923 nazvani su estrogenima.⁴³⁸

Mehanizam antiestrogene terapije zasniva se na tri glavna mehanizma:

1. Blokiranje estrogenskih receptora (Tamoxifen i Raloxifen);

2. Inhibiranje sinteze estrogena (Aromatase) i
3. "Down" regulacija estrogenskih receptora (Fluvestrant).

2.7.2.1. Blokiranje estrogenskih receptora (Tamoxifen, Raloxifen)

Tamoxifen deluje kao antiestrogen inhibiranjem vezivanja estrogena za estrogenske receptore. Food and Drug Administration (FDA) 1977. je odobrila da se Tamoxifen koristi u lečenju žena sa uznapredovalim karcinomom dojke.⁴³⁹ Tamoxifen ima estrogen-antagonističku aktivnost u tkivu dojke, opravdavajući svoju sposobnost da inhibira rast tumora.⁴⁴⁰ Tamoxifen se lako apsorbira posle oralne primene u uobičajenoj dozi od 20mg dnevno i serumskim poluživotom od 7-14 dana.⁴⁴¹⁻⁴⁴³ Može da se detektuje u serumu nekoliko nedelja, a u tumorskom tkivu nekoliko meseci posle prekida terapije.⁴⁴⁴ Antitumorski efekti tamoxifena verovatno su posledica njegove antiestrogene aktivnosti posredovane kompetitivnom inhibicijom vezivanja estrogena za estrogenske receptore.⁴⁴⁵ Posledica tog vezivanja je inhibicija ekspresije gena regulisanih od strane estrogena, uključujući faktore rasta i angiogene faktore sekretovane od strane tumora (autokrine ili parakrine). Neposredni rezultat je blokiranje G1 faze ćelijskog ciklusa i usporavanje ćelijske proliferacije. Tumori mogu podleći regresiji zbog izmenjenog balansa među proliferišućim ćelijama i ćelijama koje podležu nekrozi ili apoptozi. Tamoxifen direktno indukuje programiranu ćelijsku smrt u tumorskim tkivima i smanjuje rizik od recidiva ili smrti zbog karcinoma dojke, a ima i efektivno palijativno dejstvo kod bolesnica sa metastatskim karcinomom dojke.⁴⁴⁶ Stoga je koristan u tretmanu žena koje imaju estrogen receptor pozitivni invazivni karcinom dojke. Tamoxifen predstavlja inicijalnu hormonsku terapiju izbora za postmenopauzalne žene sa metastatskim karcinomom dojke, a koristan je i kao prva ili druga terapijska linija kod mlađih žena. Bezbedan je i dobro se toleriše, ali je rizik od pojave karcinoma endometrijuma visok.

Raloxifen je druga generacija SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) i u početku je bio proizveden za karcinome dojke. Kasnije se koristio kao alternativa hormon-nadoknađujućoj terapiji u terapiji osteoporoze. Raloxifen je benzotiofenski derivat sa strukturom koja se očigledno razlikuje od Tamoxifena.⁴⁴⁷ Mada Raloxifen ima sličnu aktivnost kao Tamoxifen u dojci i kostima, lišen je agonističke aktivnosti u

endometriju.⁴⁴⁸ Raloxifen značajno smanjuje rizik od invazivnog karcinoma dojke kod osoba sa pozitivnim estrogen-receptorskim statusom i redukuje rizik vertebralnih fraktura, ali ne nevertebralnih fraktura. Međutim, može da smanji tromboembolizam (44%), moždani udar (49%), grčeve u nogama, periferne edeme i bolesti žučne kese kod bolesnica sa karcinomom dojke.²⁸ Raloxifen nije udružen sa proliferacijom endometrija, a jasne informacije o raloxifenskom efektu u razvoju karcinoma endometrija, još uvek nisu poznate.⁴⁴⁹

2.7.2.2 Inhibitori sinteze estrogena (Aromataze)

Inhibitori Aromataze značajno smanjuju nivo estrogena u plazmi kod postmenopauzalnih žena, inhibicijom ili inaktivacijom aromataze. Aromataza je enzim odgovoran za sintezu estrogena iz androgenih substrata, a pripada superfamiliji citohroma P450 i produkt je gena CYP 19.⁴⁵⁰ Aromataza je prisutna, u manjim količinama, u tkivu normalne dojke i tkivu karcinoma dojke, kao i u nekoliko nežlezdanih tkiva uključujući: potkožno masno tkivo, jetru, mišiće, mozak.⁴⁵¹ Periferna aktivnost aromataze i nivo estrogena u plazmi su u korelaciji sa Body Mass Indexom kod postmenopauzalnih žena. Koncentracija estradiola u tkivu karcinoma dojke je otprilike 10x veća od koncentracije u plazmi.⁴⁵² Nivo estrogena je visok kod bolesnica sa karcinomom dojke, a estrogen preko ER receptora šalje signale rasta, što dovodi do nekontrolisane proliferacije ćelije. Inhibitori aromataze blokiraju estrogenu signalizaciju, što vodi smanjenju broja signala rasta do estrogenskih receptora, stoga se može desiti i smanjenje ili potpuno stopiranje rasta karcinoma.

Inhibitori aromataze inhibiraju nekoliko citohrom P450 enzima uključenih u adrenalnu steroidogenezu, što je iskorišćeno kao "farmakološka adrenalektomija" za lečenje uznapredovalog karcinoma dojke.⁴⁵¹ Opisani su kao prva, druga i treća generacija inhibitora u pogledu hronologije njihovog kliničkog razvoja i njihove dalje klasifikacije kao tip 1 ili tip 2 inhibitora ukoliko se ima u vidu mehanizam dejstva. Tip 1 inhibitori su steroidni analozi androstendiona, a vezuju se za isto mesto na molekulu aromataze. Za razliku od androstendiona, tip 1 inhibitora se vezuje ireverzibilno za aromatazu i blokira reakciju medijatora. Stoga su poznatiji i kao enzimski inaktivatori. Tip 2 inhibitora nisu

steroidi, a vezuju se reverzibilno za hem-grupu enzima glavnim azotovim atomom. Anastrozol i Letrozol su treća generacija inhibitora a vezuju se za njihove triazolne grupe. Svi inhibitori treće generacije smanjuju nivo estrogena u plazmi kod postmenopauzalnih žena. Aromataza ima intratumorsku aktivnost u većini karcinoma dojke, a analize izotopima pokazuju da takva aktivnost doprinosi smanjenju nivoa estrogena u plazmi. Anastrozol, Letrozol i Exemestane značajno inhibiraju karcinom dojke.⁴⁵³ Globalne studije su pokazale da su inhibitori aromataze pogodniji od tamoksifena kod postmenopauzalnih ER-pozitivnih bolesnica, zatim u smanjenju rekurenci i sporednih neželjenih efekata (endometrijalnog karcinoma i venske tromboze). Nedostaci inhibitora aromataze su: veći nivo osteoporoze, prateće frakture i visoki nivoi holesterola.

2.7.2.3 Estrogen receptor "down" regulatori (Fluvestrant)

Fluvestrant je selektivni estrogen receptor "down" regulator, a FDA ga je poslednjeg odobrila za korišćenje u terapiji uznapredovalog i metastatskog karcinoma dojke.⁴⁵⁴ Agonistička svojstva Tamoksifena i drugih SERM-a mogu da dovedu do povećanog rizika za pojavu endometrijalnog karcinoma i razvijanja rezistentnosti tumorskih ćelija. Fluvestrant je 7-alkil analog estradiola, posedujući jedinstven mehanizam aktivnosti u poređenju sa tamoksifenom i drugim SERM-a. Tamoxifen se vezuje za ER receptore dovodeći do odvajanja "heat shock" proteina homodimerizacijom i inhibicijom transaktivacije u tkivu dojke. Fluvestrant deluje sasvim različito, vezujući ER uzrokuje odvajanje "heat shock" proteina. Međutim, teški bočni lanac Fluvestranta sprečava dimerizaciju, što rezultuje degradacijom ER-a. Rezultat nije samo inhibicija aktivnosti ER receptora, već i značajno smanjenje nivoa ekspresije ER.⁴⁵⁴ Kao rezultat "down" regulatorne aktivnosti, Fluvestrant je nazvan SERD. Fluvestrant je značajno efikasniji kod tamoksifen rezistentne bolesti i pokazuje podjednaku ili bolju aktivnost od anastrozola kod metastatskih karcinoma dojke. Glavni neželjeni efekti Fluvestranta su muka, povraćanje, zatvor i proliv. Fluvestrant ne prolazi hematoencefalnu barijeru i izgleda da daje manje menopauzalnih simptoma od drugih antiestrogena.⁴⁵⁵ Ne uzrokuje zadebljanje endometrijuma, ali veće studije, sa dužim periodom praćenja, tek će pokazati da li postoji rizik od pojave karcinoma endometrijuma.⁴⁵⁶

3. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA

U literaturi se nailazi na veliku heterogenost klasifikacionih sistema koji nozološki dele lobularne karcinome dojke na različite kategorije, u prvom redu ističući njihov mikromorfološki način rasta i citodiferencijaciju. Prema novijim podacima iz literature imunohistohemijski profili se značajno razlikuju kod pojedinih podtipova lobularnog karcinoma dojke,^{183,184} što je postavilo kao imperativ da se lobularni karcinomi dojke detaljno prouče. Kombinovana podela invazivnog lobularnog karcinoma dojke zasniva se na dva važeća principa: 1) prema tipu rasta kancerskih ćelija: linearni (klasični tip lobularnog karcinoma), trabekularni i nelinearni tip rasta (alveolarni, solidni i disperzni) i 2) prema stepenu diferencijacije: bazaloidni, apokrini, mucin-produkujući, histiocitoidni, mioidni i pleomorfni podtip.²⁸

Ovo obilje podela u praktičnom smislu donosi visoki stepen subjektivnosti. Klasifikacija ILC-a je do sada bila bazirana na subjektivnim parametrima sa ciljem da se odrede njegov prediktivni karakter i prognostički značaj.

Iz navedenih razloga istraživanje je bilo usmereno u sledećem pravcu:

1. Uporediti mikromorfološke osobine histološkog načina rasta kod različitih podtipova lobularnog karcinoma dojke, sa posebnim osvrtom na godine života, pT stadijum tumora, histološki i nuklearni gradus, multifokalnost/multicentričnost, fokalno prisustvo dukalnog ili lobularnog karcinoma "in situ", dezmoplastičnu reakciju strome, prisustvo elastoze, disoluciju tumorskih ćelija i prisustvo metastaza u aksilarnim limfnim nodusima.
2. Uporediti različite podtipove lobularnog karcinoma dojke na osnovu njihovih mikromorfoloških, imunohistohemijskih prediktivnih (ER, PR, HER2) i prognostičkih parametara (BRCA1, p53, E-cadherin, Ki-67), kao i u odnosu na kliničke parametre (godine života, prisustvo ili odsustvo metastaza), i patohistološke karakteristike (pT stadijum tumora, histološki i nuklearni gradus, multifokalnost/multicentričnost, fokalno prisustvo dukalnog ili

lobularnog karcinoma "in situ", dezmoplastičnu reakciju strome, prisustvo elastoze, disoluciju tumorskih ćelija).

3. Upostaviti sistem kvantitativne fotometrijske i morfometrijske analize imunohistohemijskih parametara biološke agresivnosti različitih patohistoloških podtipova lobularnih karcinoma dojke, koji se može koristiti za postavljanje diferencijalne dijagnoze i upoređivanje sa sistemom trenutno važeće semikvantitativne procene.

4. MATERIJAL I METODE

Analizirano je 334 slučaja lobularnih karcinoma dojke različitih histopatoloških podtipova, od istog broja bolesnica, dijagnostikovanih u sedmogodišnjem periodu od januara 2005. do aprila 2011. godine. U tom periodu je dijagnostikovano 2486 slučajeva svih tipova karcinoma dojke, te lobularni karcinom čini 13,43% slučajeva. U ovoj studiji su korišćeni tkivni uzorci lobularnih karcinoma dojke, dobijeni ekscizionim biopsijama ili amputacijom dojki sa disekcijom aksile bolesnica, od kojih je 266 slučajeva hirurški lečeno u Kliničkom Centru u Nišu, a 68 slučajeva u drugim zdravstvenim centrima jugoistočne Srbije. Uzorci su rutinski obrađeni do parafinskih kalupa i arhivirani zajedno sa patohistološkom i kliničkom dokumentacijom na Institutu za patologiju Kliničkog Centra u Nišu.

Multifokalnost je određivana na mikroskopskom nivou, prisustvom većeg broja morfoloških centara razvoja karcinoma, a to je kod dojke ista mikromorfološka jedinica odnosno lobus. Multicentričnost je u ovoj studiji predstavljena prisustvom većeg broja karcinoma u istoj anatomske regiji sa međusobnom udaljenošću od najmanje 5 cm normalnog tkiva dojke (u različitim lobusima dojke), bilo da su unikvadrantni ili bikvadrantni. Multipnost je predstavljena prisustvom većeg broja tumora u međusobno udaljenim anatomske regijama, a kod dojke je to sinonim za bilateralnost. U obzir su uzimani samo sinhroni bilateralni lobularni karcinomi.

Za potrebe imunohistohemijskog bojenja iz područja tumora uziman je mikroskopski najkarakterističniji uzorak (region) i on se u vidu jednog ili dva parafinska kalupa podređivao ovoj specifičnoj proceduri. Po osnovnoj morfološkoj proceni načinjenoj na HE preparatima vršio se izbor jednog do dva kalupa koji sadrže tkivne uzorke lobularnog karcinoma iz prosečno reprezentativnog regiona, sa spoljašnjih infiltrativnih granica. Od parafinskih kalupa mikrotomski su načinjeni preseki debljine oko 4µm, adherirani na "super frost" pločice i bojeni imunohistohemijski na estrogenske receptore, progesteronske receptore, Her-2 receptore, BRCA1 protein, p53 protein, Ki-67 antigen i E-cadherin. Nakon deparafinacije i hidratacije isečaka kroz ksilol i seriju alkohola opadajuće koncentracije, rađeno je demaskiranje antigena u mikrotalasnoj peći, 20 min u citratnom puferu, a potom hlađenje na sobnoj temperaturi, ispiranje i blokiranje

endogene peroksidaze 3% hydrogenom. Isečci su ispirani u puferu PBS (Phosphate Buffered Saline) pH=7.4, a zatim je nanošeno primarno antitelo uz inkubaciju od 40 min na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja PBS-om sledi Labelled Streptavidin-Biotin 2 System, Horseradish Peroxidase (LSAB2 System-HRP, 15 ml, Code K0673), koji sadrži žuti i crveni LINK i inkubirani su po 20 min, a između svakog koraka rađeno je ispiranje PBS-om. Vizuelizacija je rađena DAB-om (Diaminobenzidine), a potom je primenjeno dobro ispiranje tekućom vodom 2 min, kontrastiranje hematoksilinom, dehidratacija i uklapanje tkiva DPX-om.

Imunohistohemijska procedura: za potrebe ovog bojenja su korišćena poliklonska i monoklonska antitela, a korišćena razblaženja kao i ekspresija antitela prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Karakteristike korišćenih imunohistohemijskih markera

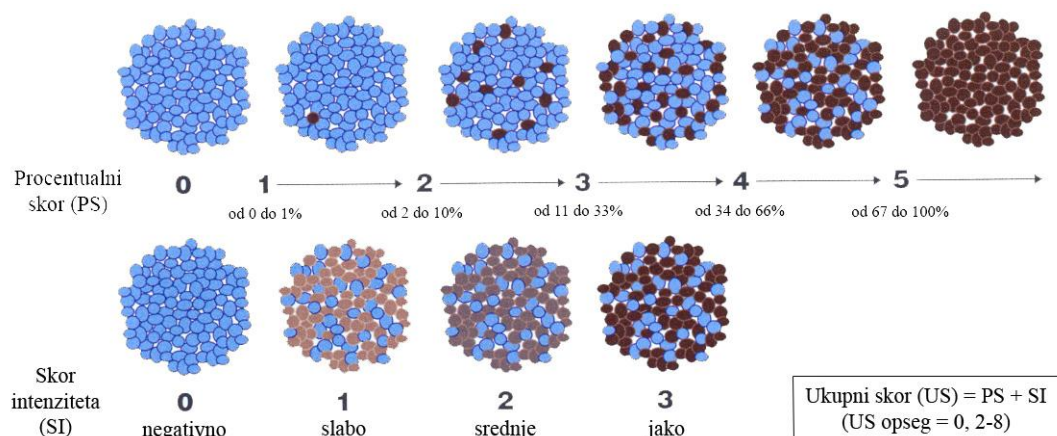
ANTITELO	Naziv/klon/code	Razblaženje	Ekspresija
ER	Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor α (ER); Clone 1D5; Code N1575	Ready-to-use	u jedru
PR	Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor; Clone PgR 636; Code N1630	Ready-to-use	u jedru
Her-2	Polyclonal Rabbit Anti-Human c-erbB-2 Oncoprotein; Code A0485	1:250 - 1:350	ćelijska membrana
BRCA1	Monoclonal Mouse Anti-Human BRCA1; Clone GLK-2; Code M3606	1:50	u jedru i citoplazmi
p53	Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein; Clone DO-7; Code N1581	Ready-to-use	u jedru
Ki-67	Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1; Code N1633	Ready-to-use	u jedru
E-cadherin	Monoclonal Mouse Anti-Human E-cadherin; Clone NCH-38; Code M3612	1:50	ćelijska membrana

Sva korišćena antitela su istog proizvođača (DAKO, Glostrup Denmark) sa rasponom razblaženja od 1:100 do 1:400 (**Dako Antibody Diluent**, Ready-to-use, Code S0809), a upotrebljen vizuelizacioni sistem je bio En Vision sa hromogenom DAB

(DAKO Cytomation). "Background" bojenje je urađeno Mayer-ovim hematoksilinom sa standardnim vremenom ekspozicije i ostalim standardizovanim pratećim delovima procedure (ispiranje i ostalo), a obojeni tkivni preseki prekriveni DPX-om i pokrovnom ljušpicom.

Rezultati imunohistohemijskih analiza su procenjivani semikvantitativno i kvantitativno i to iz najkarakterističnijeg regiona, a sa spoljašnjih infiltrativnih granica invazivnih lobularnih karcinoma na sledeći način:

1) Semikvantitativna analiza **ER** i **PR** urađena je na osnovu Allred "scoring" sistema, gde se ukupni skor dobija zbirom: **skora procentualne zahvaćenosti jedara tumorskih ćelija** (skor 1 - manje od 1% jedara tumorskih ćelija; skor 2 - od 1 do 10% jedara tumorskih ćelija; skor 3 - od 11 do 33% jedara tumorskih ćelija; skor 4 - od 34 do 66% jedara tumorskih ćelija; skor 5 - više od 67% jedara tumorskih ćelija) i **skora intenziteta bojenja jedara** (skor 1 - slabo; skor 2 - srednje; skor 3 - jako), što je prikazano na shemi 1.



Shema 1. Allred-ov "scoring" sistem

2) Analiza membranske ekspresije HER-2 receptora rađena je na osnovu originalnog HercepTesta (DAKO),⁴⁵⁷ korišćenjem "CAP scoring" sistema sa skalom od 0 do 3+, koji se bazira na karakteru bojenja ćelijske membrane u invazivnoj komponenti tumora. Skor 0 predstavlja odsustvo membranskog bojenja ili slabo membransko bojenje u manje od 10% tumorskih ćelija. Skor 1+ predstavlja slabo vidljivo membransko bojenje

u preko 10% tumorskih ćelija, a ćelijske membrane su parcijalno obojene. Skor 2+ je slabo do srednje kompletno bojenje celog obima ćelijskih membrana u više od 10% tumorskih ćelija. Skor 3+ predstavlja jaku kompletnu prebojenost ćelijskih membrana u preko 10% tumorskih ćelija. Samo tumori sa skorom 3+ su smatrani pozitivnim.⁴⁵⁷

3) Proliferativna aktivnost je određivana imunobojenjem sa Ki-67 antitelom. Udeo proliferativnih ćelija je određivan brojanjem najmanje 500 tumorskih ćelija. Nivo Ki-67 indeksa je izražen kroz procenat pozitivnih ćelija za svaki slučaj ponaosob. Granicom visokog i niskog Ki-67 indeksa je smatrano 15% pozitivnih tumorskih ćelija. Svi slučajevi ILC-a dojke koji imaju 15% ili više od 15% pozitivnih tumorskih ćelija su svrstani u grupu karcinoma sa visokim Ki-67 indeksom.⁴⁵⁸

4) p53 pozitivnost je određivana na sličan način kao i Ki-67 indeks, osim što je granica pozitivnosti za p53 data kao srednje do jako bojenje najmanje 10% jedara tumorskih ćelija. Intranuklearna ekspresija p53 u više od 10% tumorskih ćelija je povezana sa mutacijama u genomu.⁴⁵⁹

5) U normalnom tkivu dojke postoji jaka uniformna jedarna ekspresija BRCA1. Kod karcinoma dojke ekspresija BRCA1 je heterogena i često manje intenzivna nego u normalnoj dojci, a prisutna je u jedru i/ili u citoplazmi.⁴⁶⁰ Imunohistohemijski, karcinomi dojke su BRCA 1 pozitivni kada postoji odsutna ili smanjena nuklearna i/ili pozitivna citoplazmatska ekspresija BRCA 1 proteina.⁴⁶⁰

6) Imunohistohemijski, anti-E-cadherin antitelom se jako boje intercelularne granice luminalnih ćelija kako interlobularnih duktusa, tako i intralobularnih terminalnih duktusa i duktula. Mioepitelne ćelije duktusa i duktula pokazuju mnogo slabiju imunoreaktivnost između susednih ćelija, a nekad su i negativne. Ove karakteristike E-cadherin imunobojenja služe kao pozitivne unutrašnje kontrole, jer svi lobularni karcinomi "in situ" i invazivni lobularni karcinomi pokazuju smanjenu ekspresiju ili potpuni gubitak E-cadherin membranskog bojenja.

Imunohistohemijski preparati su zatim proučeni na morfo- i fotometrijskom sistemu Instituta za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Nišu, koji je sačinjen od mikroskopa BX-50 (OLYMPUS, Japan) sa SONY-evom CCD Color Video kamerom HYPER HAD, povezana sa PC-računarskim sistemom, koji obavlja skladištenje digitalizovane mikroskopske slike u vidu TIFF (Tagged Image File Format).

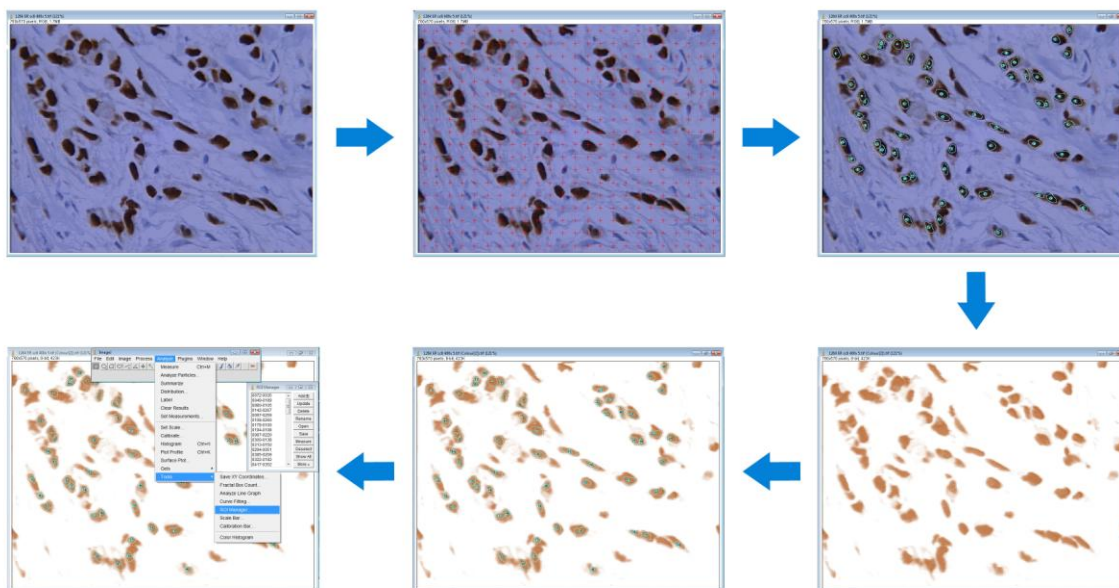
Izbor polja sa mikroskopskih imunohistohemijskih preparata za analogno-digitalnu konverziju obavljen je sa najmanje 10 mikroskopska polja, a pod ukupnim povećanjem od 400x. Izabrana su ona polja koja se nalaze na periferiji uzorka karcinoma prema okolnim normalnim tkivnim strukturama dojke. Polja sa normalnim tkivnim strukturama, polja displastično izmenjenih delova dojke, kao i fokalnog lobularnog karcinoma "in situ" (LCIS-a), nisu uzimani u analizu. U okviru analogno-digitalne konverzije ceo mikroskopski sistem je podešen na uniforman način i pod tim konstantnim, istovetnim uslovima načinjene su sve mikroskopske slike, koje su kasnije analizirane morfo- i fotometrijski.

Po podešavanju Kelerovog i iluminacionog polja, otvor blende na kondenzoru je postavljen na konstantnu vrednost od 0,3; jačina osvetljenja je potencijometrijski podešena na ustaljenu vrednost, a na digitalnoj kameri su isključene sve funkcije automatskog podešavanja slike, kao što su: "SHUTTER", "GAIN", a "WHITE BALANCE" je podešeno u konstantni opseg od 3200; korišćen je plavi filter mikroskopa uz upotrebu indiferentnog filtra ND6.

Digitalizovane mikroskopske slike, sačuvane u TIFF formatu, bez daljih korekcija ("BACKGROUND CORRECTION", "BACKGROUND SUBTRACTION", "BRIGHTNESS", "CONTRAST"), analizirane su u programu za analizu slike *Image J* version 1.42. Za potrebe nesubjektivnog selektovanja jedara ispitivanih karcinoma, korišćen je planimetrijski mrežni "OVERLAY" sistem, koji spomenuti "Image analysis" sistem koristi kao "PLUG IN". Rastojanje (d) između tačaka na kojima se ukrštaju linije mrežnog sistema je ekvivalent izračunatog prosečnog dijametra kancerskih ćelija iz pilot merenja na manjem broju slučajeva (n=30). Ovako definisan mrežni sistem upotrebljen je na svim slikama svih ispitivanih slučajeva. Uz upotrebu svetlosnog pera ocrta je kontura jedra svake kancerske ćelije koja je bila pogođena nekom od tačaka testnog sistema, makar i u predelu njene citoplazme. Kod svakog analiziranog slučaja je mereno najmanje po 100 jedara. Ocrt ("outline") svakog jedra ponaosob učitani (upisani) je u "ROI (Region of Interest) Manager", a niz tako upisanih ocrta snimljen je za kasniju upotrebu i učitavanje.

Digitalizovane mikroskopske slike su zatim podvrgnute dekonvoluciji boja, a uz upotrebu dekonvolucionog Landini-evog algoritma koji je inkorporisan kao "PLUG IN" u

novije verzije *Image J* version 1.42.^{461,462} Ovaj algoritam izdvaja iz hematoksilin-DAB (H-DAB) slike, kao jednu od matrica, matricu koja sadrži koloritet koji pripada isključivo DAB hromogenu i ima braon prebojenost. Spomenuta matrica se snima kao osmobaritna "TIFF" slika i služi kao supstrat za dalju fotometrijsku analizu slika. Preko ovih slika se zatim učitavaju prethodno snimljeni "outlines", koji predstavljaju granice ranije mrežnim sistemom selektovanih jedara, unutar kojih će se za svako jedro ponaosob fotometrijskim funkcijama izračunati optička gustina ("optical density") (OD). Na slici 1 su prikazani funkcionalni moduli koji simbolizuju različite faze u procesu analize mikroskopskih slika.



Slika 1. Funkcionalni moduli analize slike u programu *Image J*

Fotometrijska kalibracija sistema: za potrebe kalibracije optičke gustine u opciji programa "calibrate" korišćena je funkcija "uncalibrated OD" za raspon intenziteta prebojenosti piksela od 0 do 255 i sa eksponencijalnim karakterom. Nakon kalibracije određena je prosečna vrednost optičke gustine svih piksela koji pripadaju u okvirima "outline"-a svakog od selektovanih jedara ponaosob, gde svetliji pikseli teže ka vrednosti 0 (na binarnoj slici bela boja, a na područjima H-DAB slike nespecifično vezanog hematoksilina-plavo), dok tamniji delovi teže ka višim vrednostima, gde je u okviru nekalibrisanog sistema optičke gustine vrednost za crnu 255 maksimalno. Dobijene vrednosti optičke gustine na prethodno opisani način za sva ispitivana jedra svih

ispitivanih slučajeva su zatim poslužile za nepristrasno (unbiaset) skorovanje imunohistohemijskog intenziteta prebojenosti jedara na ER receptore. U skladu sa Lambert-Beer-ovim zakonom količina prisutne boje određena je na osnovu specifične talasne dužine boje, gde je optička gustina (OD) proporcionalna koncentraciji boje.⁴⁶² Tako je količina boje linearno zavisna od OD (absorbance). Konverzija u optičku gustinu se dobija kao negativni logaritam za osnovu 10 intenziteta svetlosti detektovane nakon prolaska kroz preparat. Optička gustina je bezdimenziona logaritamska jedinica, gde absorbanca 0 znači da svi fotoni prolaze kroz preparat, OD = 1.0 znači da je absorbovano 90% fotona, a OD = 2.0 da je 99% fotona absorbovano. Imunohistohemijska bojenja mogu pojedinačno da imaju optičku gustinu najviše 1 OD.²⁹¹ Skor koji se tiče procentualne zastupljenosti jedara imunohistohemijski "pozitivnih" ili "negativnih" unutar jednog patohistološkog slučaja određivan je tako što je ukupan broj kvantifikovanih jedara po slučaju smatran 100%, a zatim je granica između „pozitivnih“ i „negativnih“ jedara postavljena u odnosu na vrednost 0,1, što predstavlja 10% ukupne skale homogenog intenziteta (optičke gustine) za DAB.⁴⁶³ Kvantitativni ER skor po svakom ispitivanom slučaju određivan je, slično ASCO preporukama za semikvantitativni skor, zbirom skora prosečnog intenziteta jedara prethodno pomnoženim sa 100 i skorom procentualne zastupljenosti, a zatim deljenjem zbira sa 2.

Digitalna mikroskopska slika se sastoji od sitnih tačaka (piksela), a korišćena je kao polazna veličina za određivanje jedarnog areala (površine preseka jedara), što je uz faktore oblika jedan od najčešće analiziranih parametara u patohistologiji tumora.⁴⁶⁴

Površina preseka jedara (*areal*) za sva jedra svih ispitivanih slučajeva je dobijena kao broj piksela po svakom jedru, a zatim je izračunata u μm^2 na sledeći način:

1 μm na digitalnim slikama je imao dužinu od 3,7 pixela

$$\text{areal } (\mu\text{m}^2) = \text{areal } (\text{pixel}^2)$$

$$1 \mu\text{m}^2 = 3,7^2 = 13,69 (\text{pixel}^2)$$

$$\text{areal } (\mu\text{m}^2) = \text{area } (\text{pixel}^2) / 13,69$$

Za određivanje jedarnog areala se koristi površina koja odgovara jednom pikselu. Areal (A) jednog piksela se dobija kao proizvod broja piksela koji pripadaju jedru (P_f) i površine (a) koja odgovara jednom pikselu:

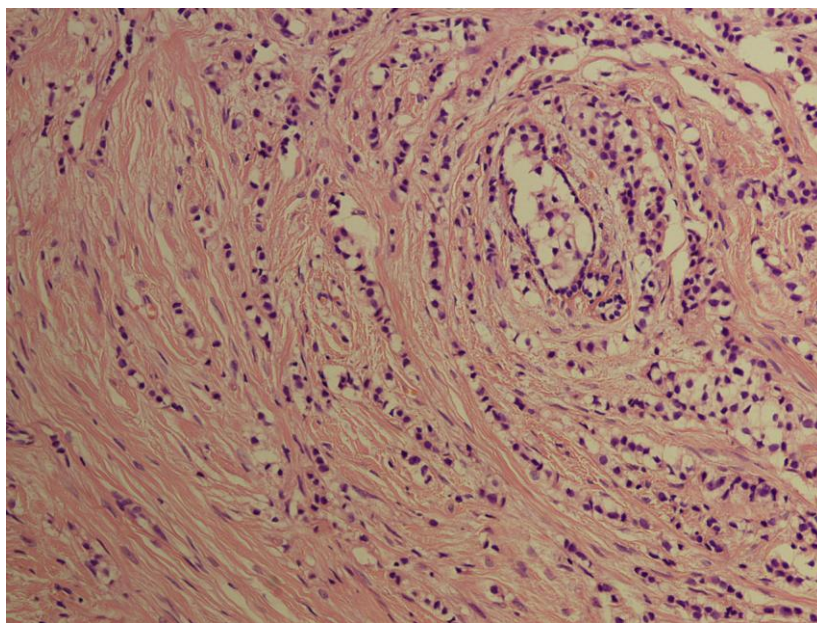
$$A = P_f \cdot a$$

Dobijene vrednosti za ispitivane morfo- i fotometrijske parametre, kao i starost bolesnica, histološki podtip, pT stadijum tumora, prisustvo multifokalnosti/multicentričnosti, procenat zahvaćenosti aksilarnih limfnih nodusa i subjektivni semikvantitativni ER skor (Allred scoring sistem)^{286,465-467} su podvrgnute sledećim metodama: 1) deskriptivnom statistikom (prosečna vrednost, standardna devijacija, medijana), 2) komparativnim testovima (parametrijskog (t-test, ANOVA) i neparametrijskog (Fisher-ov test) tipa i 3) korelacionim testom (Pirsonov test) analizama. Svi statistički proračuni su obavljeni uz pomoć programa *Jandel Sigma Stat 2.0* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), *GraphPad Prism version 5.03*, (San Diego, CA, USA). Efekat veličine uočenih razlika dobijenih morfometrijskih parametara izračunat je pomoću G*Power statističkog kalkulatora version 3.1.9.2 (<http://www.gpower.hhu.de>).

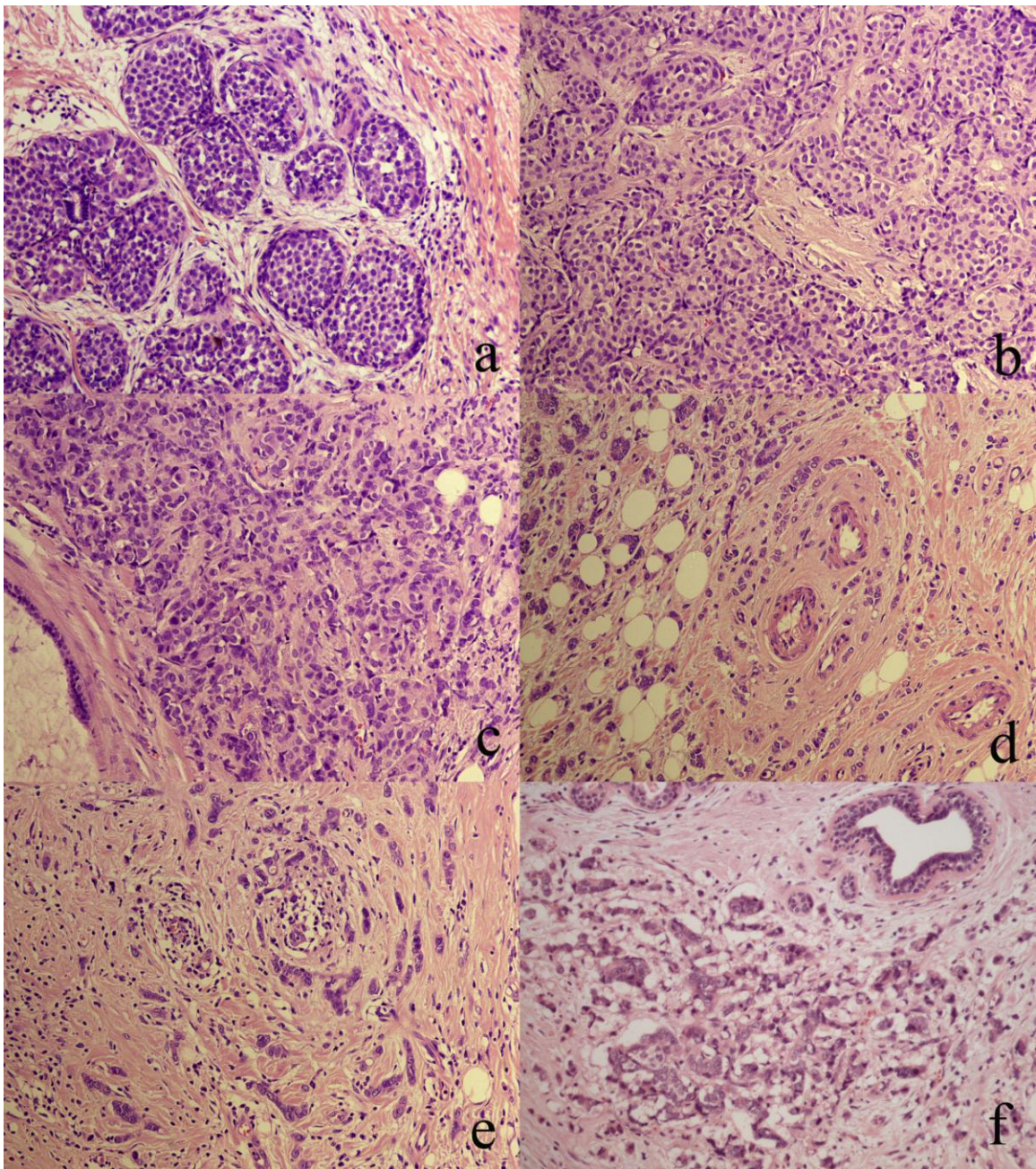
5. REZULTATI

5.1 REZULTATI KLINIČKE I MIKROMORFOLOŠKE ANALIZE BOLESNICA SA LOBULARNIM KARCINOMOM DOJKE

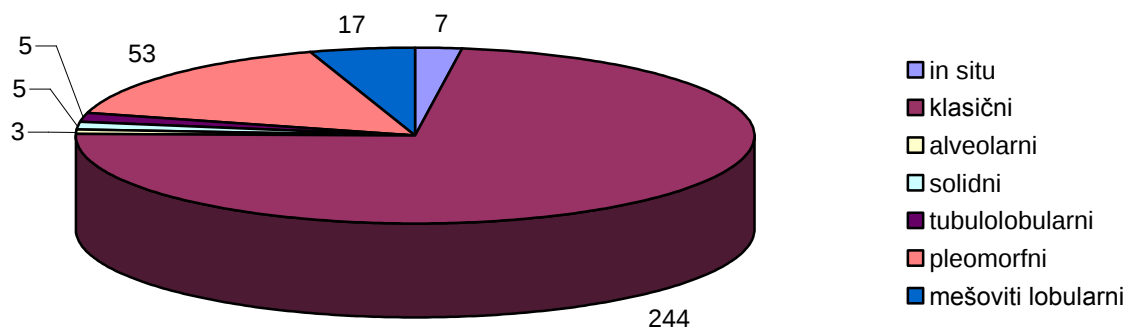
Ispitivanjem je analizirano 334 bolesnica sa lobularnim karcinomom dojke koje su bile podvrgnute tumorektomiji ili radikalnoj mastektomiji sa disekcijom aksile. Prosečna starost bolesnica bila je $57,58 \pm 11,8$ godina, gde je najmlađa bolesnica imala 20, a najstarija 86 godina. Lobularni karcinomi su podeljeni na 7 podtipova: 1) "in situ", 2) klasični, 3) alveolarni, 4) solidni, 5) tubulolobularni, 6) pleomorfni i 7) mešoviti lobularni podtip. Najveći broj bolesnica - 224 (73,1%) imao je klasični podtip lobularnog karcinoma (slika 2), dok je "in situ", alveolarni, solidni, tubulolobularni, pleomorfni i mešoviti lobularni podtip imalo: 7 (2,1%), 3 (0,9%), 5 (1,5%), 5 (1,5%), 53 (15,9%) i 17 (5,1%) bolesnica. Struktura bolesnica u odnosu na podtip lobularnog karcinoma prikazana je na grafikonu 1. Mikromorfološki prikaz ostalih podtipova lobularnog karcinoma prikazan je na slici 3.



Slika 2. Klasični invazivni lobularni karcinom dojke sa karakterističnim linearnim rasporedom tumorskih ćelija (HE x 200)



Slika 3. Podtipovi lobularnog karcinoma dojke: a) lobularni karcinom "in situ"; b) alveolarni podtip ILC-a; c) solidni podtip ILC-a u blizini ciste; d) tubulolobularni podtip ILC-a sa "target"-oidnim načinom rasta oko krvnih sudova; e) pleomorfni podtip ILC-a sa "target"-oidnim načinom rasta; f) mešoviti lobularni podtip sa alveolarnim i trabekularnim načinom rasta (HE x 200)



Grafikon 1. Struktura bolesnica u odnosu na podtip lobularnog karcinoma

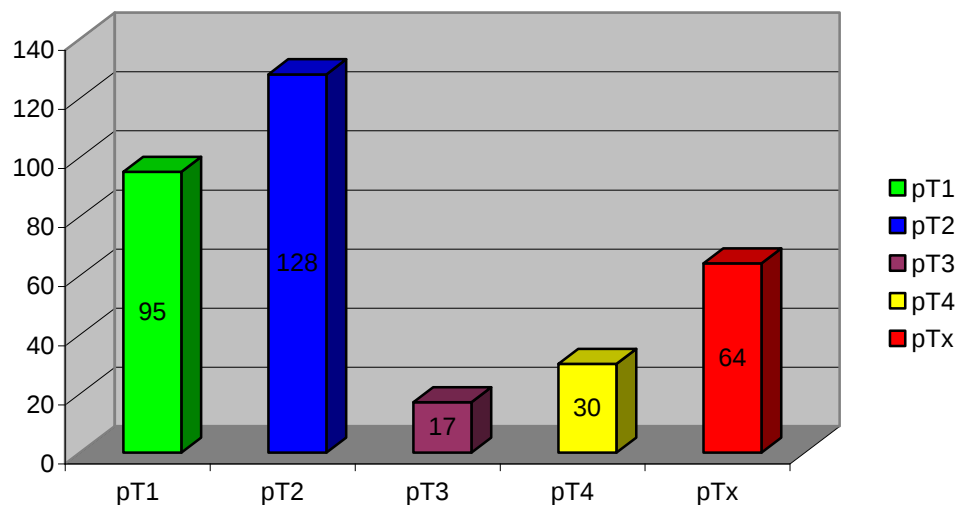
Razlika u prosečnoj starosti bolesnica između različitih podtipova lobularnog karcinoma prikazana je u tabeli 3.

Tabela 3. Razlika u prosečnoj starosti bolesnica sa različitim podtipovima lobularnog karcinoma

Podtip lobularnog karcinoma	$\bar{X} \pm SD$
"in situ"	45,28±8,62
klasični	57,97±11,14
alveolarni	65±11,53
solidni	44,8±10,26
tubulolobularni	51,4±10,36
pleomorfni	57,48±13,65
mešoviti lobularni	61,76±12,12

Nisu utvrđene statistički signifikantne razlike između dve najbrojnije grupe bolesnica (klasični i pleomorfni podtip) sa lobularnim karcinomom dojke u odnosu na starost (t test, $p > 0,05$).

Analiza stadijuma (od pT1 do pT4) pokazala je najveću učestalost u pT2 stadijumu kod 128 (38,3%) bolesnica. Učestalost u pT1 stadijumu bila je 28,4% (95), u pT3 5,1% (17), a u pT4 stadijumu 9% (30). Kod 64 (19,2%) bolesnice nije mogao da bude precizno određen pT stadijum bolesti (Grafikon 2).



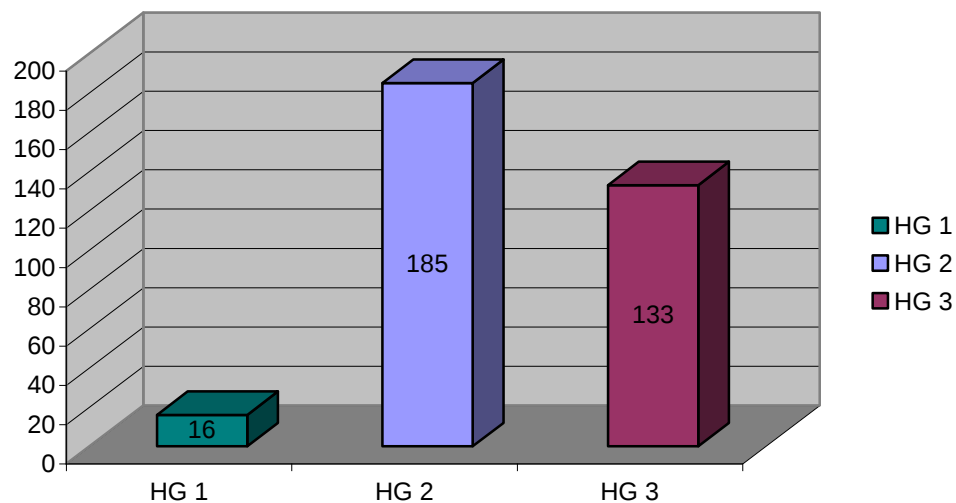
Grafikon 2. Struktura bolesnica u odnosu na pT stadijum tumora

pT stadijum bolesti statistički značajno češće nije mogao da bude određen kod "in situ" lobularnih karcinoma dojke (57,14%) u odnosu na ostale podtipove ILC-a (Fisherov test, $p=0,0273$) (Tabela 4).

Tabela 4. Odnos između pT stadijuma različitih podtipova lobularnog karcinoma

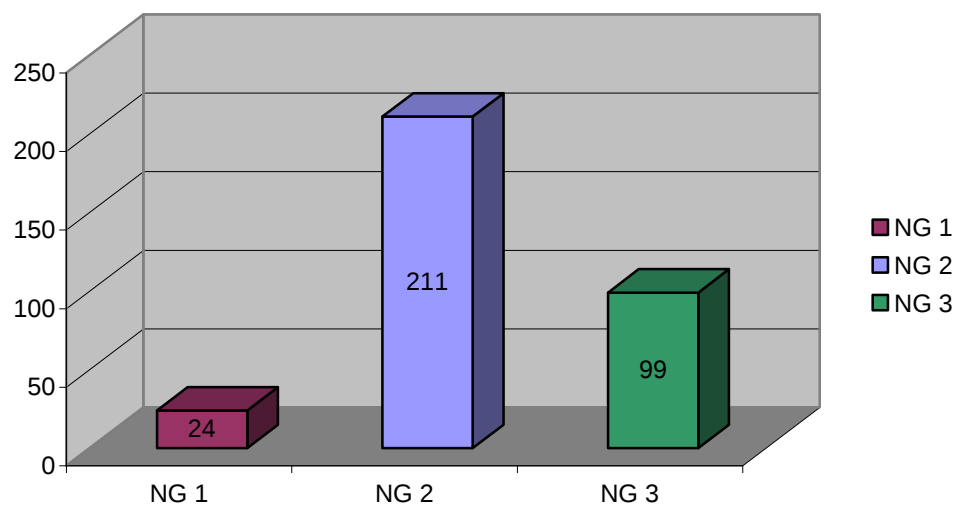
Podtip tumora	pT1	p	pT2	p	pT3	p	pT4	p	pTx	p	ukupno
"in situ"	2	$p>0,05$	1	0,2575	0	$p>0,05$	0	$p>0,05$	4	0,0273*	7
klasični	67	0,5847	93	0,8997	11	0,411	24	0,5176	49	0,5337	244
alveolarni	0	0,561	2	0,5608	0	$p>0,05$	1	0,2467	0	$p>0,05$	3
solidni	1	$p>0,05$	1	0,6528	1	0,2311	0	$p>0,05$	2	0,2449	5
tubulolobularni	3	0,1415	2	$p>0,05$	0	$p>0,05$	0	$p>0,05$	0	0,5877	5
pleomorfni	14	0,8683	22	0,6452	4	0,3248	5	0,7989	8	0,5678	53
mešoviti lobularni	8	0,0982	7	0,8028	1	0,5977	0	0,3817	1	0,2124	17
ukupno	95		128		17		30		64		334

Na grafikonu 3 prikazana je struktura bolesnica u odnosu na histološki gradus (HG) tumora, gde je najveći broj tumora 185 (55, 4%) imao histološki gradus 2.



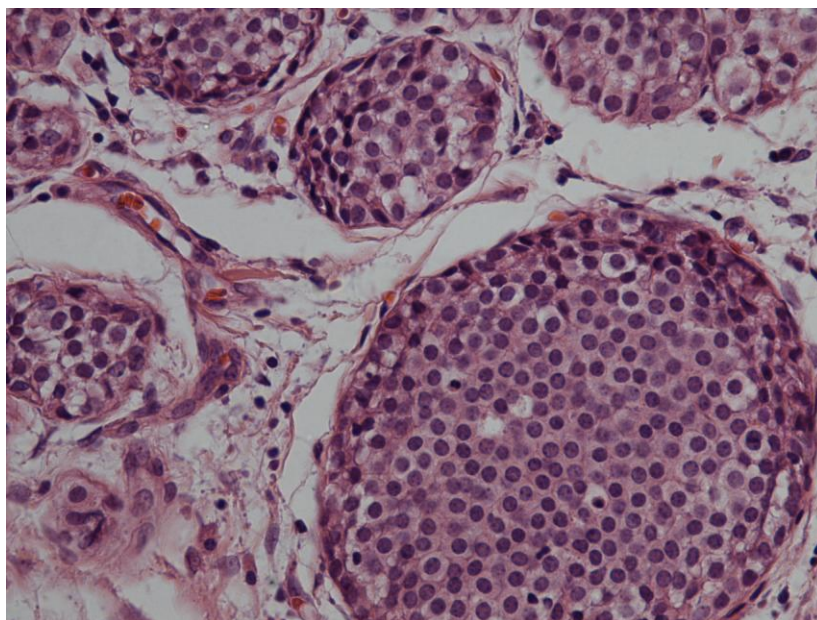
Grafikon 3. Struktura bolesnica u odnosu na HG tumora

Učestalost nuklearnog gradusa (NG) tumora ispitivanih bolesnica prikazan je na grafikonu 4. Najučestaliji nuklearni gradus je gradus 2 (211 bolesnica - 63,2%).

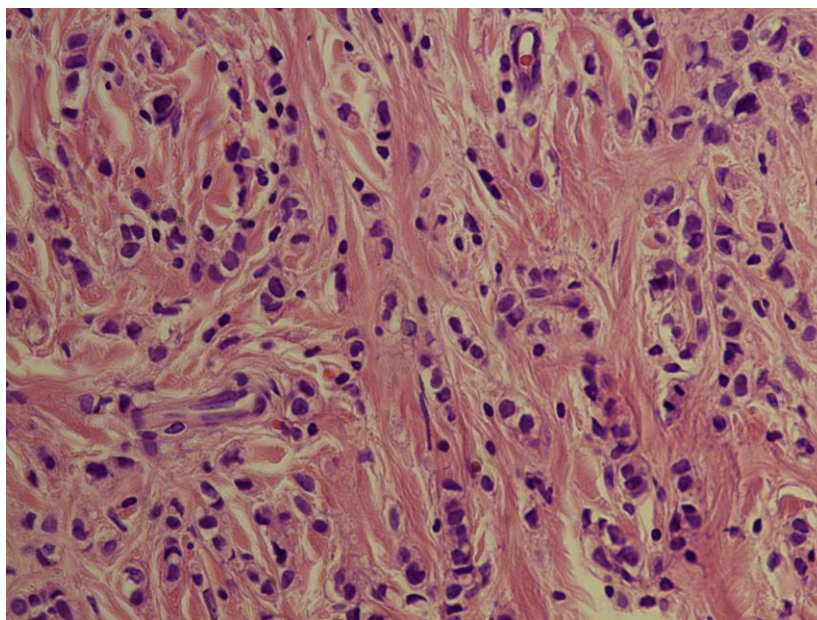


Grafikon 4. Struktura bolesnica u odnosu na NG tumora

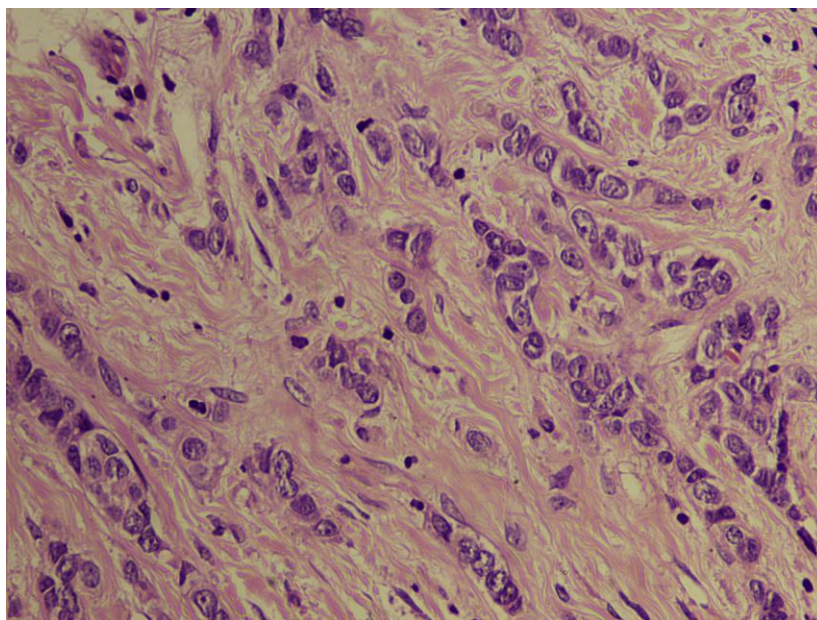
Pleomorfizam jedara lobularnog karcinoma prikazan je na slikama 4, 5 i 6.



Slika 4. Lobularni karcinom "in situ" sa uniformnim jedrima, NG I (HE x 400)



Slika 5. Invazivni lobularni karcinom dojke srednjeg stepena diferentovanosti, NG II (HE x 400)



Slika 6. Izražena nejednakost jedara kod pleomorfnog lobularnog karcinoma dojke, NG III (HE x 400)

Multifokalnost, multicentričnost i bilateralnost su zapažene kod 27 (8,1%) bolesnica, a pojedinačna zastupljenost prikazana je u tabeli 5. Pri tome, fokalno prisustvo LCIS-a i DCIS-a nisu bili parametri za određivanje multicentričnosti/multifokalnosti tumora.

Tabela 5. Struktura bolesnica u odnosu na multifokalnost, multicentričnost i bilateralnost lobularnog karcinoma

mf/mc/bil	n	učestalost (%)
odsutna multifokalnost, multicentričnost i bilateralnost	307	91,9
multifokalni	10	3
multicentrični	15	4,5
bilateralni	2	0,6
ukupno	334	100

Statističkom analizom utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnoj starosti između bolesnica sa multifokalnim, multicentričnim i bilateralnim lobularnim karcinomom ($p < 0.05$, ANOVA). Naknadnom ("post hoc") analizom utvrđeno je da postoji razlika između bolesnica sa bilateralnim karcinomom i onih koje nisu imale ni

multifokalni, ni multicentrični, ni bilateralni lobularni karcinom ($p < 0,0001$, Dunnett T3), kao i između bilateralnog i multifokalnog lobularnog karcinoma ($p = 0,0001$, Dunnett T3) i bilateralnog i multicentričnog karcinoma dojke ($p < 0,0001$, Dunnett T3) (Tabela 6).

Tabela 6. Razlika u prosečnoj starosti između bolesnica sa multifokalnim, multicentričnim i bilateralnim lobularnim karcinomom

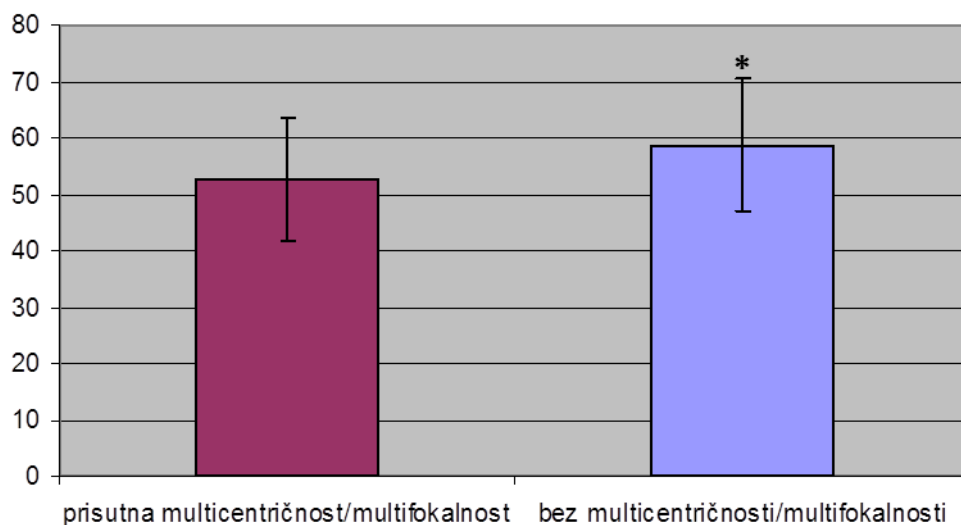
mf/mc/bil	$\bar{X} \pm SD$	F	P (ANOVA)	Dunnett T3
odsutna multifokalnost, multicentričnost i bilateralnost	57,95 ± 11,72	4,026	0,008*	A, B, C
multifokalni	58 ± 12,33			
multicentrični	53,07 ± 9,51			
bilateralni	32 ± 5,39			

A - bilateralni prema odsutnoj mf/mc/bil

B - bilateralni prema mf

C - bilateralni prema mc

Kada je definicijom multicentričnosti/multifokalnosti obuhvaćeno i fokalno prisustvo LCIS-a i DCIS-a,⁹² takođe je utvrđena statistički signifikantna razlika u prosečnoj starosti bolesnica (t test, $p < 0,01$) (Grafikon 5)



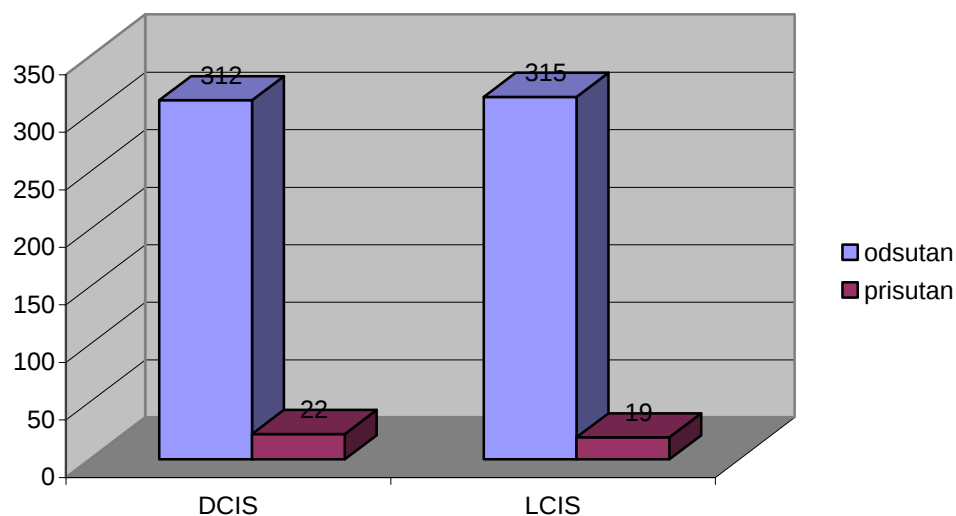
Grafikon 5. Razlika u prosečnoj starosti između bolesnica sa i bez prisustva multicentričnosti/multifokalnosti; statistički signifikantna razlika prikazana je (*) za $p < 0,01$

Statistički signifikantna značajnost između klasičnog i pleomorfnog podtipa lobularnog karcinoma nije nađena u odnosu na multifokalnost, multicentričnost i bilateralnost tumora (Fisher-ov test, $p > 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Odnos između multifokalnosti, multicentričnosti i bilateralnosti lobularnog karcinoma kod klasičnog i pleomorfnog podtipa tumora.

mf/mc/bil	Podtip tumora		ukupno	p
	klasični	pleomorfni		
odsutna multifokalnost, multicentričnost i bilateralnost	224	49	273	$p > 0,05$
multifokalni	8	0	8	0,3584
multicentrični	10	4	14	0,2859
bilateralni	2	0	2	$p > 0,05$
ukupno	244	53	297	

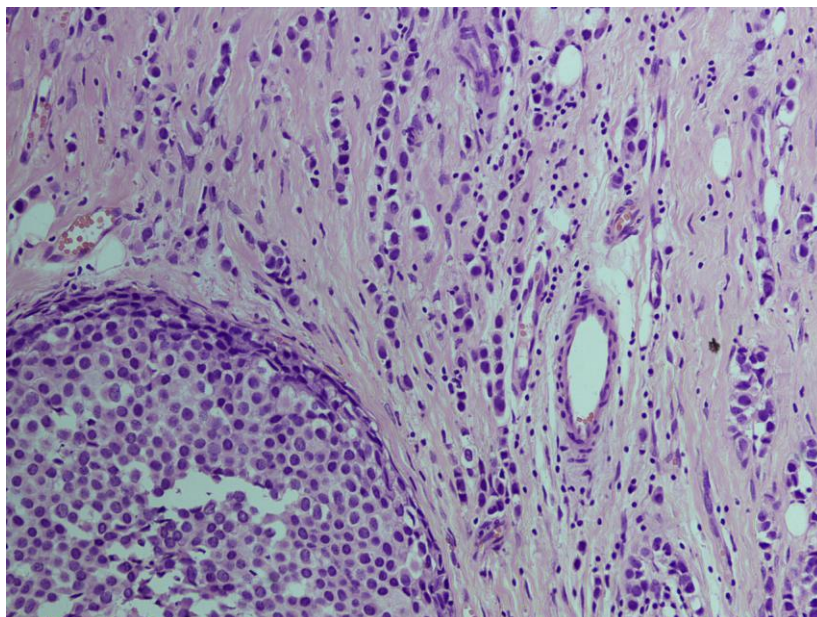
Prisustvo fokalnog DCIS-a je verifikovano kod 22 (6,6%) bolesnice, dok je fokalni LCIS nađen kod 19 (5,7%) bolesnica (Grafikon 6).



Grafikon 6. Struktura bolesnica u odnosu na fokalno prisustvo DCIS-a i LCIS-a (od ukupnih 334 slučaja lobularnih karcinoma)

Određivanjem statistički značajnih razlika između prosečne starosti bolesnica sa i bez fokalnog DCIS-a kao i sa i bez fokalnog LCIS-a, pokazano je da ne postoji značajna

razlika kod bolesnica sa fokalnim DCIS-om (t test, $p>0,05$), dok je statistički značajna razlika utvrđena kod bolesnica sa fokalnim LCIS-om (t test, $p<0,01$) (Tabela 8). Fokalno prisustvo LCIS-a u okolini invazivnog lobularnog karcinoma prikazano je na slici 7.



Slika 7. LCIS u blizini invazivnog lobularnog karcinoma dojke (HE x 200)

Tabela 8. Razlika u prosečnoj starosti između bolesnica sa i bez fokalnog DCIS-a i LCIS-a

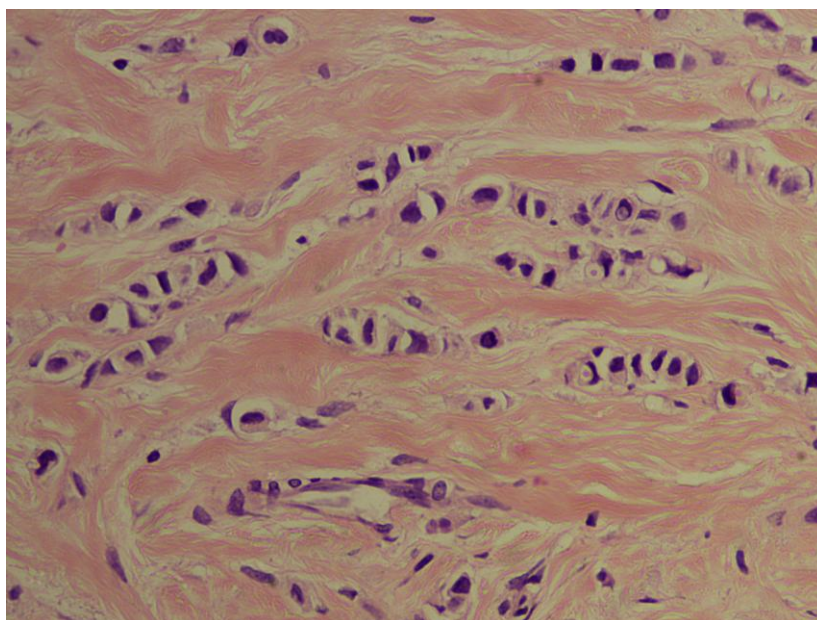
parametar	prisustvo	$\bar{X} \pm SD$	t	p
fokalni DCIS	da	54,18±10,86	1,402	0,162
	ne	57,83±11,84		
fokalni LCIS	da	48,79±7,37	3,401	0,001*
	ne	58,12±11,81		

Analizom odnosa između prisustva fokalnog DCIS-a i fokalnog LCIS-a kod klasičnog i pleomorfnog podtipa lobularnog karcinoma nisu utvrđene statistički značajne razlike između ova dva podtipa ILC-a (Fisher-ov test, $p>0,05$) (Tabela 9).

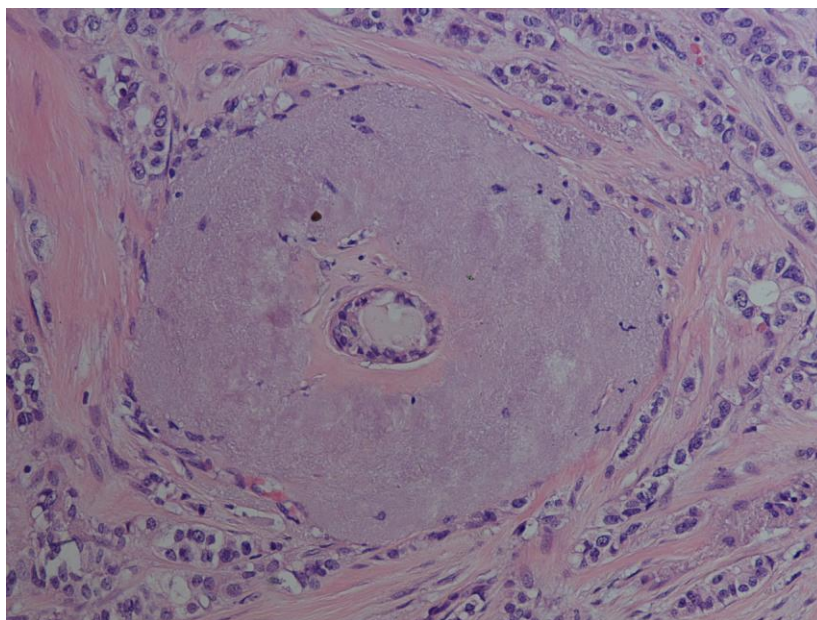
Tabela 9. Odnos između prisustva fokalnog DCIS-a ili fokalnog LCIS-a kod klasičnog i pleomorfnog podtipa tumora

parametar	prisustvo	Podtip tumora		ukupno	p
		klasični	pleomorfni		
fokalni DCIS	da	227	50	277	p>0,05
	ne	17	3	20	
fokalni LCIS	da	233	51	284	p>0,05
	ne	11	2	13	

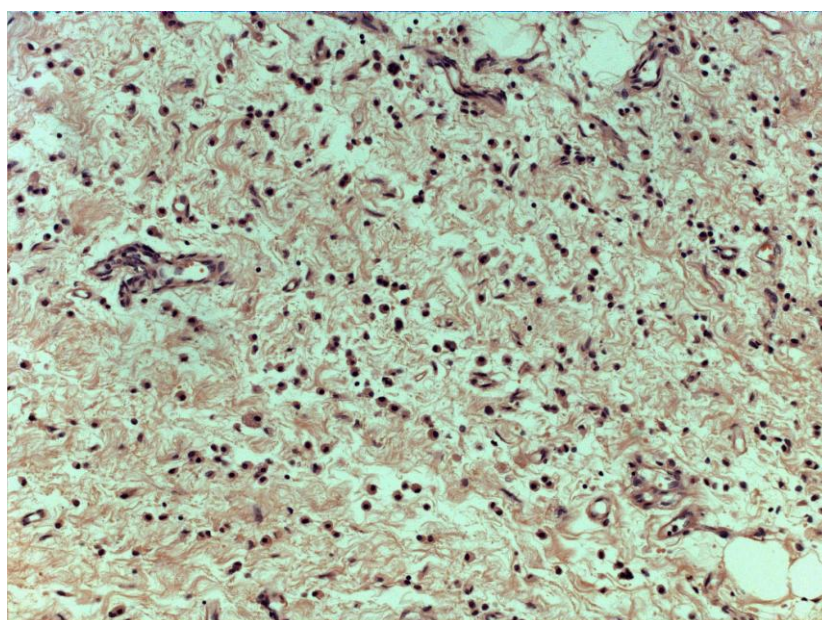
Dezmoplazija, elastoza i disolucija su otkrivene u malom broju slučajeva u odnosu na broj ispitivanih bolesnica: dezmoplazija kod 31 (9,3%), elastoza kod 7 (2,1%) i disolucija kod 16 (4,8%) bolesnica (Grafikon 7). Dezmoplastična reakcija strome oko ćelija lobularnog karcinoma prikazana je na slici 8, periduktalna elastoza na slici 9, a disolucija tumorskih ćelija na slici 10.



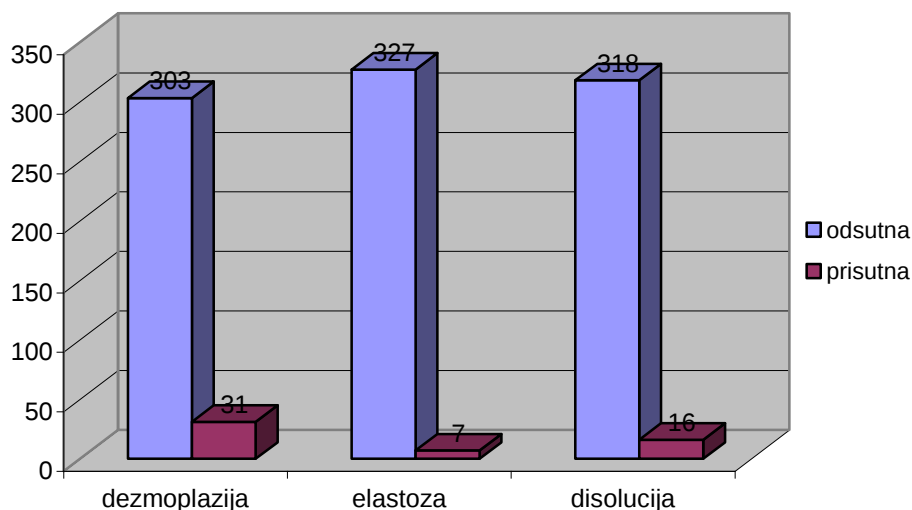
Slika 8. Dezmoplastična stroma oko linearno raspoređenih tumorskih ćelija invazivnog lobularnog karcinoma (HE, x 400)



Slika 9. Periduktalna elastoza sa okolnim rasporedom tumorskih ćelija u vidu "mete"
(HE 200)



Slika 10. Tumorske ćelije ILC-a rasute po fibroznoj stromi (HE x 100)



Grafikon 7. Struktura bolesnica u odnosu na prisustvo dezmoplazije, elastoze i disolucije (od ukupnih 334 slučaja lobularnih karcinoma)

Statistički ne postoji značajna povezanost između podtipa tumora i dezmoplazije (Fisher-ov test, $p > 0,05$), ali postoji između podtipa tumora i disolucije tumorskih ćelija (Fisher-ov test, $p < 0,0000001$) (Tabele 10 i 11). Disolucija tumorskih ćelija je bila statistički značajna karakteristika pleomornog podtipa (28,3%), kod klasičnog nije bila uočena, a u samo jednom slučaju mešovitoj lobularnog podtipa (5,88%). Post hoc analizom utvrđeno je da je disolucija tumorskih ćelija statistički značajno češća kod pleomornog podtipa u odnosu na klasični podtip ILC-a (Fisher-ov test, $p < 0,001$).

Tabela 10. Povezanost između podtipa tumora i prisustva dezmoplazije

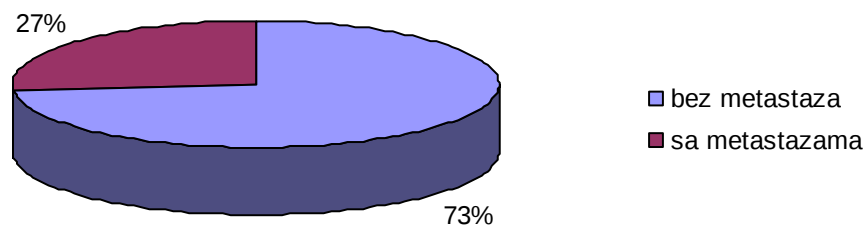
Podtip tumora	dezmoplazija		ukupno	p
	odsutna	prisutna		
in situ	7	0	7	p>0,05
klasični podtip	222	22	244	0,8322
alveolarni podtip	3	0	3	p>0,05
solidni podtip	3	2	5	0,0699
tubulolobularni podtip	3	2	5	0,0699
pleomorfni podtip	49	4	53	0,799
mešoviti lobularni podtip	16	1	17	p>0,05
ukupno	303	31	334	

Tabela 11. Povezanost između podtipa tumora i prisustva disolucije

Podtip tumora	disolucija		ukupno	p
	odsutna	prisutna		
in situ	7	0	7	p>0,05
klasični podtip	244	0	244	p<0,0001*
alveolarni podtip	3	0	3	p>0,05
solidni podtip	5	0	5	p>0,05
tubulolobularni podtip	5	0	5	p>0,05
pleomorfni podtip	38	15 ^a	53	p<0,0001*
mešoviti lobularni podtip	16	1	17	0,575
ukupno	318	16	334	

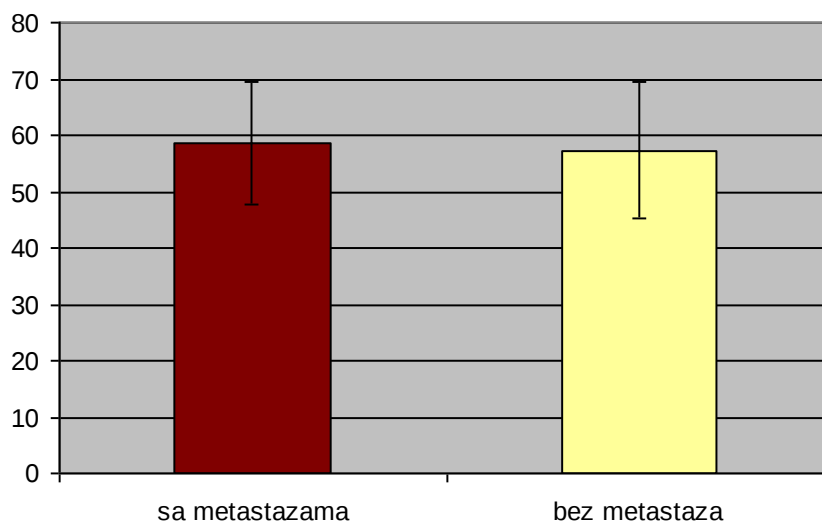
a - p<0,001 u odnosu na klasični podtip

Evaluacijom prisustva metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima u vreme dijagnoze nađena je metastatska proširenost tumora u 89 (26,6%) bolesnica, dok kod 245 (73,4%) bolesnica nisu nađene metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima (Grafikon 8).



Grafikon 8. Struktura bolesnica u odnosu na prisustvo metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

Statistički signifikantne razlike u prosečnoj starosti nisu nađene između bolesnica sa i bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima (t test, $p > 0,05$) (Grafikon 9), kao i u odnosu između podtipa tumora i prisustva metastaza (Fisher-ov test, $p > 0,05$) (Tabela 12).



Grafikon 9. Razlika u prosečnoj starosti između bolesnica sa i bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

Tabela 12. Odnos između podtipa tumora i prisustva metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

Podtip tumora	metastaze		ukupno	p
	odsutne	prisutne		
klasični podtip	173	71	244	0,2023
alveolarni podtip	2	1	3	p>0,05
solidni podtip	4	1	5	p>0,05
tubulolobularni podtip	5	0	5	0,3285
pleomorfni podtip	39	14	53	p>0,05
mešoviti lobularni podtip	15	2	17	0,1712
ukupno	238	89	327	

Postoji signifikantna povezanost između veličine primarnog tumora (manji ili veći od 2cm) i metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima (Fisher-ov test, p=0,0018) (Tabela 13), gde su analizirani ILC-i veličine do 2 cm imali statistički značajno manju učestalost metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima (16,84%) u odnosu na ILC-e veće od 2 cm gde je učestalost metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima iznosila 34,85%.

Tabela 13. Odnos veličine primarnog tumora (< ili > 2cm) i metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

Metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima	Veličina tumora		ukupno	p
	manji od 2cm	veći od 2cm		
prisutne	16	61	77	0,0018*
odsutne	79	114	193	
ukupno	95	175	270	

Značajna statistička povezanost multifokalnosti, multicentričnosti i bilateralnosti lobularnog karcinoma i prisustva metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima nije utvrđena primenom Fisher-ovog testa (p>0,05) (Tabela 14).

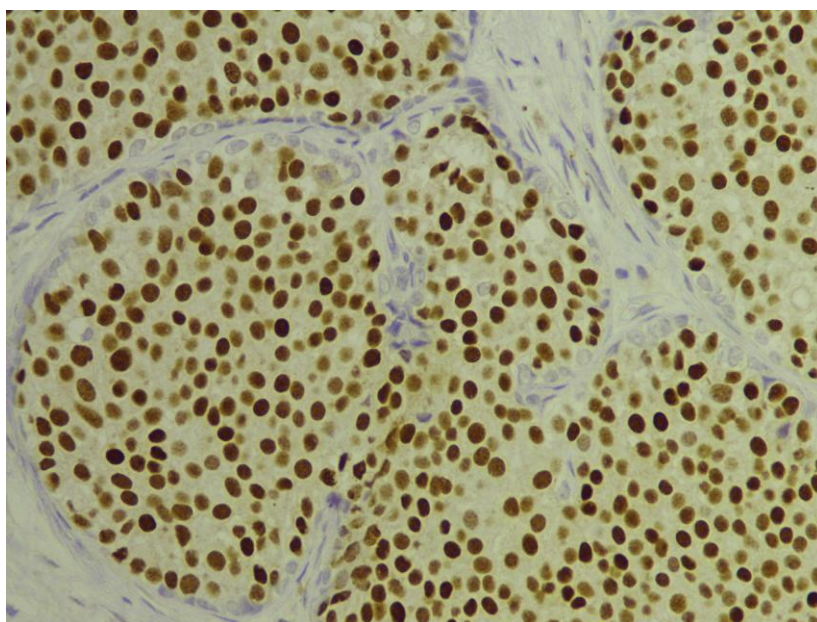
Tabela 14. Odnos između multifokalnosti, multicentričnosti i bilateralnosti i prisustva metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

mf/mc/bil	metastaze		ukupno	p
	odsutne	prisutne		
odsutna multifokalnost, multicentričnost i bilateralnost	226	81	307	0,8205
multifokalni	6	4	10	0,4662
multicentrični	11	4	15	p>0,05
bilateralni	2	0	2	p>0,05
ukupno	245	89	334	

5.2. REZULTATI ANALIZE IMUNOHISTOHEMIJSKIH KARAKTERISTIKA TKIVNIH MARKERA U LOBULARNOM KARCINOMU DOJKE

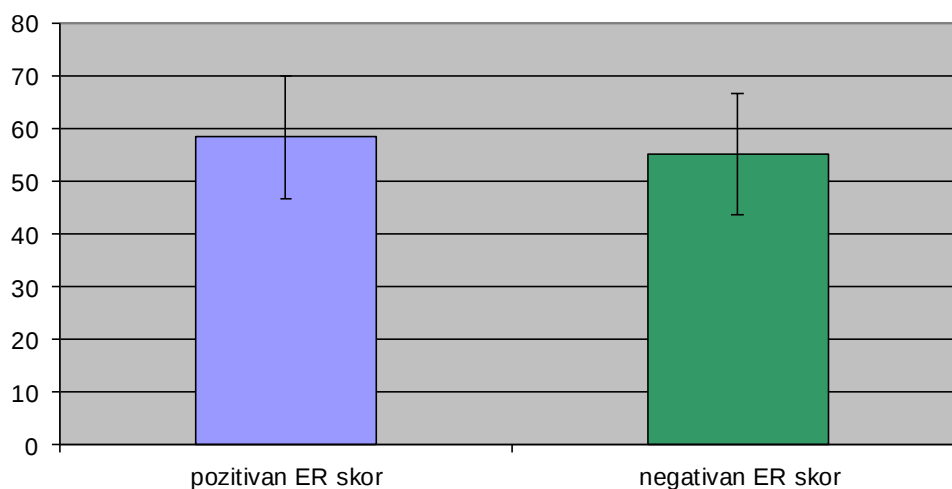
5.2.1 Estrogenski receptori (ER)

Analizirani lobularni karcinomi dojke su u 79,87% slučajeva imali pozitivan skor ER receptora. Različiti nivoi ekspresije ER receptora u tkivu lobularnih karcinoma dojke prikazani su na slikama 11, 12, 13, 14, 15 i 16.



Slika 11. Difuzna ekspresija estrogenskih receptora u jedrima LCIS-a (LSAB x 400)

Nije postojala statistički značajna razlika u prosečnoj starosti bolesnica sa pozitivnim i negativnim ER skorom (t test, $p > 0,05$) (Grafikon 10).



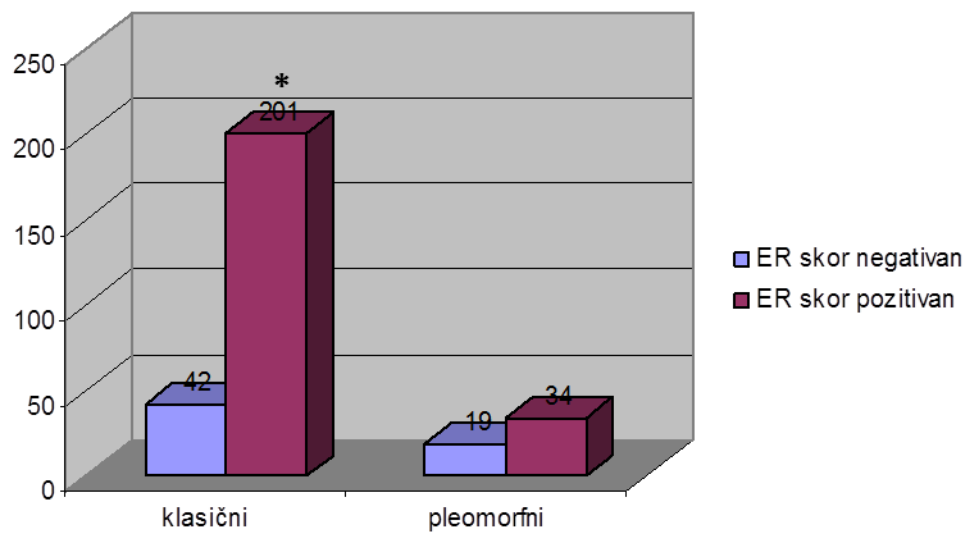
Grafikon 10. Razlika u prosečnoj starosti bolesnica sa pozitivnim i negativnim ER skorom

Statističkom analizom odnosa između podtipa lobularnog karcinoma i ER skora, utvrđene su statistički signifikantne razlike (Tabela 15). Dobijeni podaci pokazuju da klasični (83,12%) i pleomorfni (62,26%) podtip ILC-a statistički značajno češće imaju pozitivan ER skor u odnosu na ostale podtipove ILC-a. Naknadnom post hoc analizom utvrđeno je da klasični podtip ima značajno češće pozitivne ER receptore u odnosu na pleomorfni podtip ILC-a (Fisher-ov test, $p=0,0044$) (Grafikon 11).

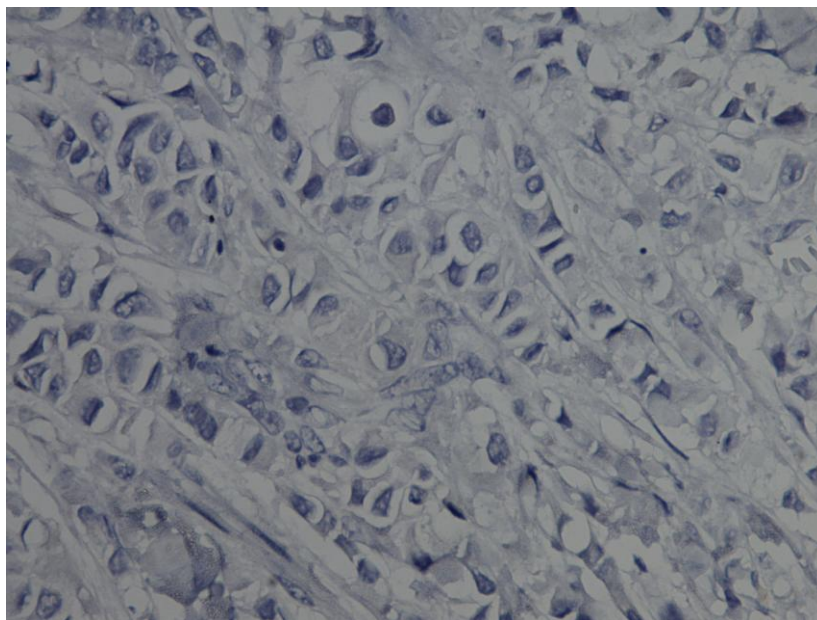
Tabela 15. Odnos podtipa lobularnog karcinoma i ER skora

Podtip tumora	ER skor		ukupno	p
	negativan	pozitivan		
in situ	1	6	7	$p>0,05$
klasični podtip	42	201 ^a	243	0,0447*
alveolarni podtip	1	2	3	0,4915
solidni podtip	0	5	5	0,5873
tubulolobularni podtip	0	5	5	0,5873
pleomorfni podtip	19	34	53	0,0043*
mešoviti lobularni podtip	4	13	17	0,7562
ukupno	67	266	333	

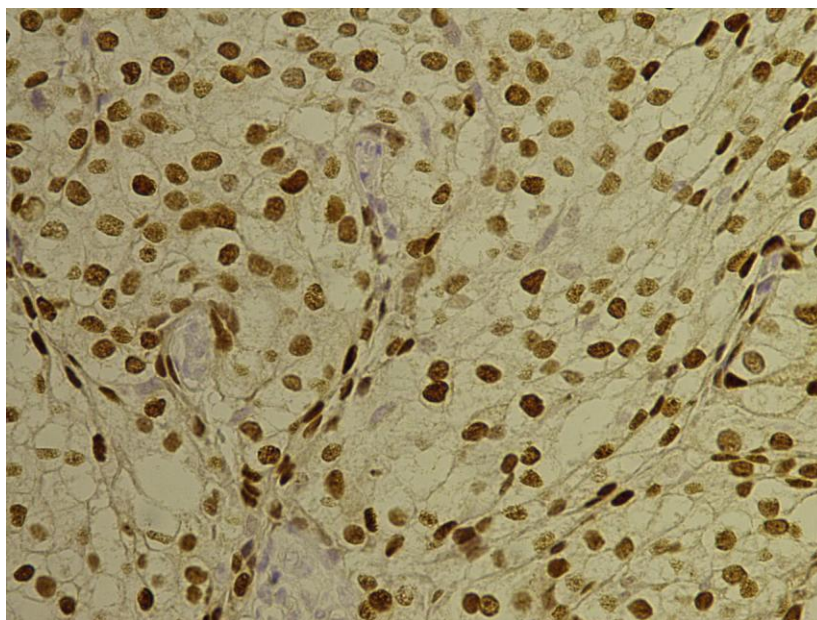
a – $p<0,05$ u odnosu na pleomorfni podtip ILC-a



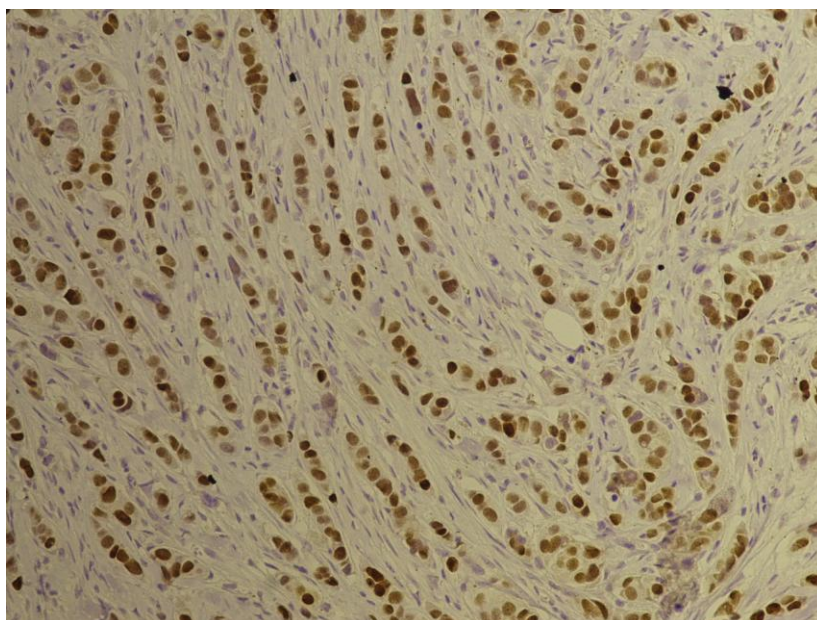
Grafikon 11. Odnos između ER skora klasičnog i pleomorfnog podtipa tumora; postojanje statistički značajne razlike označeno je (*), $p=0,0044$ u odnosu na ER pozitivni pleomorfni ILC



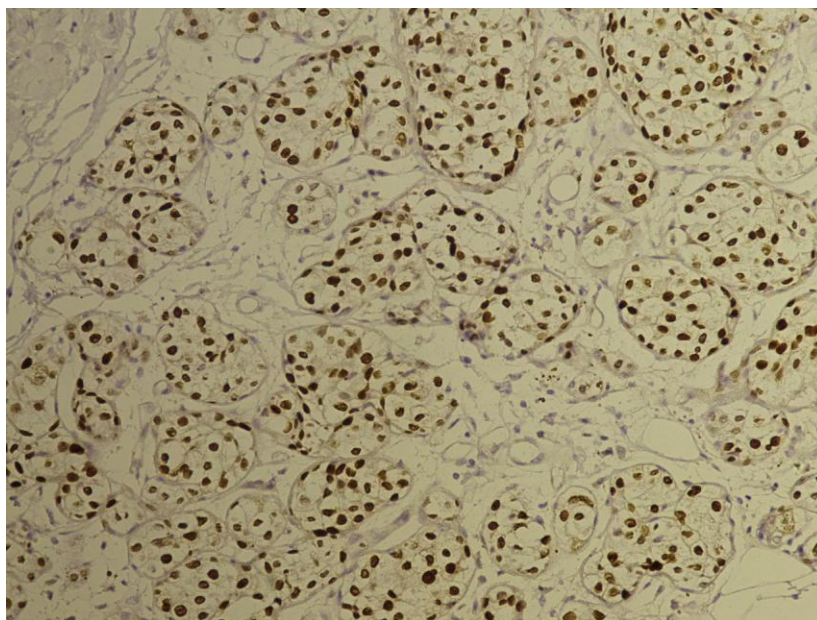
Slika 12. Negativna ekspresija estrogenskih receptora u jedrima invazivnog lobularnog karcinoma dojke (LSAB x 400)



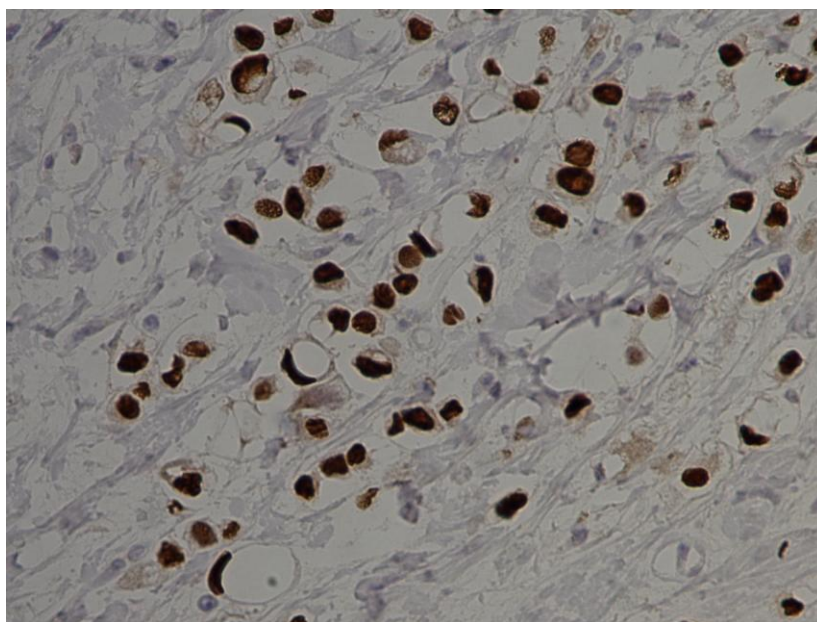
Slika 13. Umerena ekspresija estrogenskih receptora kod solidnog podtipa invazivnog lobularnog karcinoma dojke (LSAB x 400)



Slika 14. Klasični invazivni lobularni karcinom sa umerenom ekspresijom estrogenskih receptora (LSAB x 200)

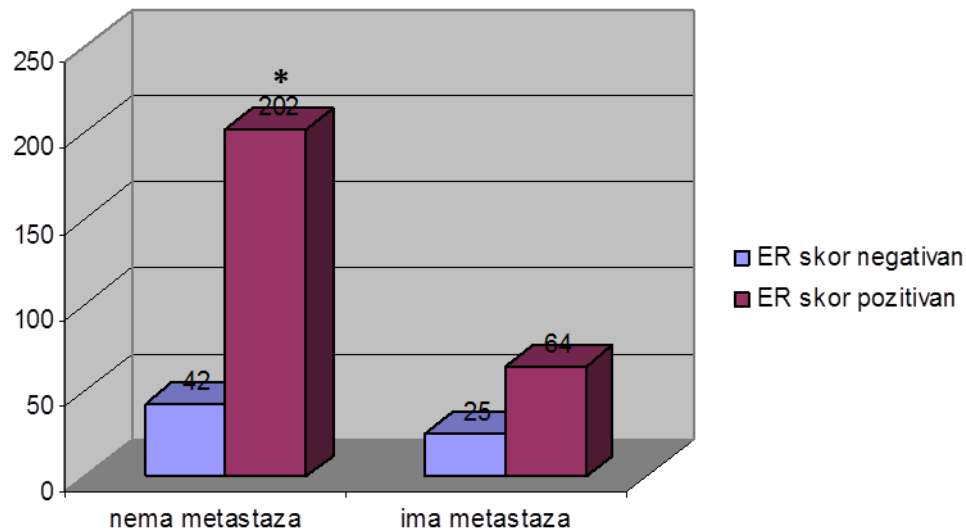


Slika 15. Alveolarni podtip invazivnog lobularnog karcinoma dojke sa umereno do jakom ekspresijom estrogenskih receptora (LSAB x 200)



Slika 16. Jaka imunohistohemijska ekspresija estrogenskih receptora kod invazivnog lobularnog karcinoma sa pojedinačnim "signet ring" ćelijama (LSAB x 400)

Određivanjem statistički značajne povezanosti ER skora i prisustva metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima, utvrđeno je da bolesnice bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima statistički značajno češće imaju pozitivan ER skor (82,78%) u odnosu na bolesnice sa metastazama (71,91%) (Fisher-ov test, $p=0,0316$) (Grafikon 12).



Grafikon 12. Odnos između ER skora i prisustva metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima; postojanje statistički značajne razlike označeno je (*), $p=0,0316$ u odnosu na ER pozitivan skor sa metastazama

5.2.2 Progesteronski receptori (PR)

Bolesnice sa pozitivnim (67,27%) i negativnim (32,73%) PR skorom se statistički značajno ne razlikuju u odnosu na prosečnu starost (t test, $p>0,05$) (Tabela 16).

Tabela 16. Razlika u prosečnoj starosti bolesnica sa pozitivnim i negativnim PR skorom

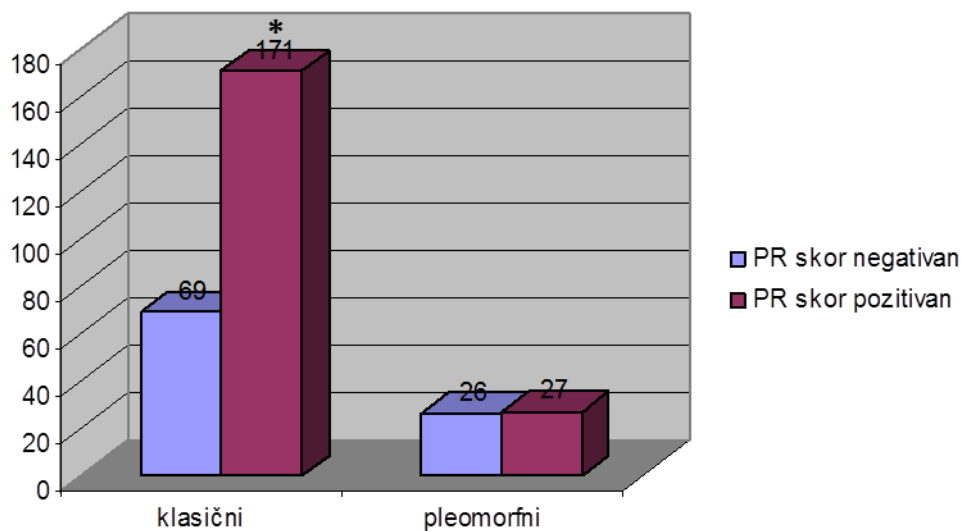
PR skor	$\bar{X} \pm SD$	t	p
pozitivan	57,22±11,77	1,046	0,296
negativan	58,67±11,67		

Imunohistohemijskim bojenjem PR receptora i određivanjem PR skora kod različitih podtipova lobularnog karcinoma dojke dobijeno je da klasični (71,25%) i pleomorfni podtip (50,94%) statistički značajno češće imaju pozitivan PR skor u odnosu na ostale podtipove ILC-a, a naknadnom post hoc analizom je utvrđeno da klasični podtip značajno češće ima pozitivan PR skor u odnosu na pleomorfni podtip ILC-a (Fisher-ov test, $p=0,0057$) (Tabela 17)(Grafikon 13).

Tabela 17. Odnos podtipa lobularnog karcinoma i PR skora

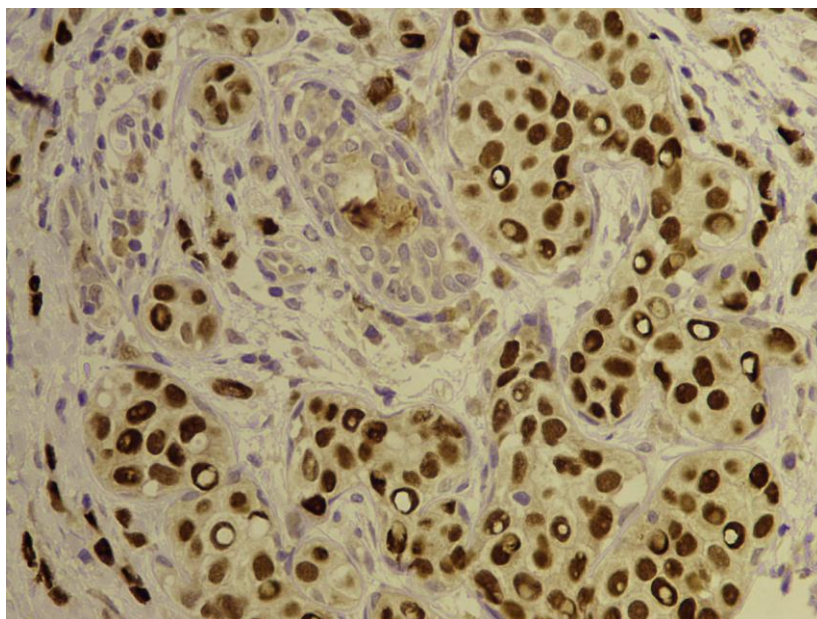
Podtip tumora	PR skor		ukupno	p
	negativan	pozitivan		
in situ	1	6	7	0,4336
klasični podtip	69	171 ^a	240	0,0174*
alveolarni podtip	2	1	3	0,2505
solidni podtip	2	3	5	0,6638
tubulolobularni podtip	0	5	5	0,1769
pleomorfni podtip	26	27	53	0,01*
mešoviti lobularni podtip	8	9	17	0,197
ukupno	108	222	330	

a - $p<0,05$ u odnosu pleomorfni podtip ILC-a

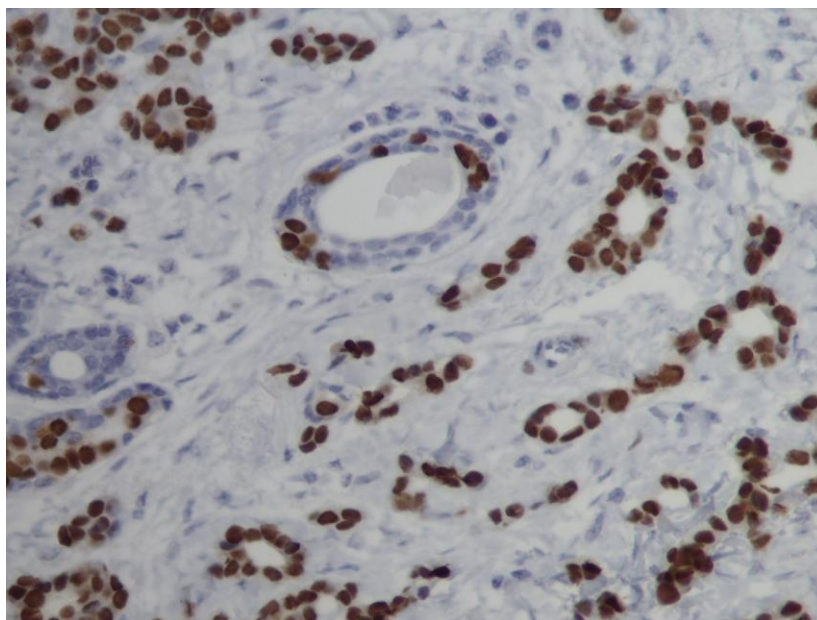


Grafikon 13. Odnos između PR skora klasičnog i pleomorfnog podtipa lobularnog carcinoma; postojanje statistički značajne razlike označeno je (*), $p=0,0057$ u odnosu na PR pozitivni pleomorfni ILC

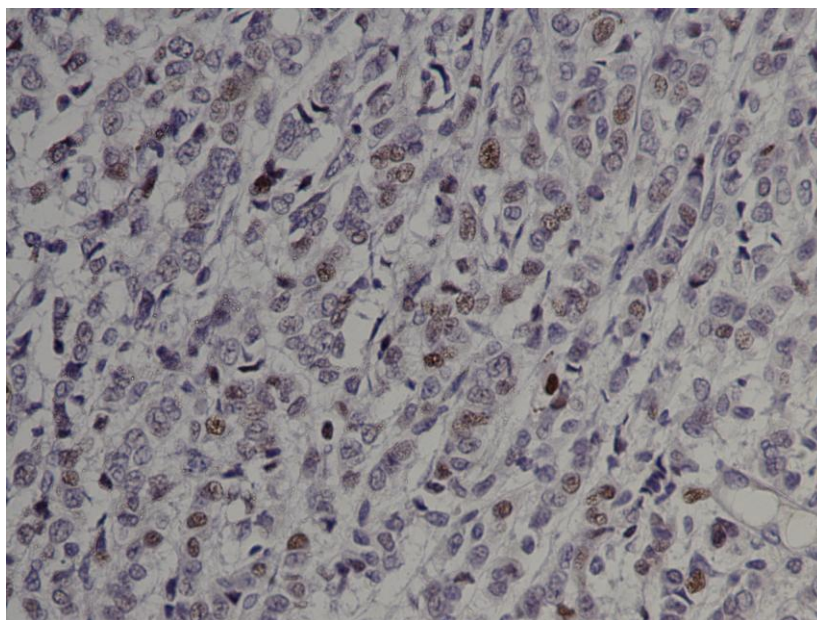
Ekspresija progesteronskih receptora u podtipovima invazivnog lobularnog karcinoma dojke je prikazana na slikama 17, 18, 19, 20 i 21.



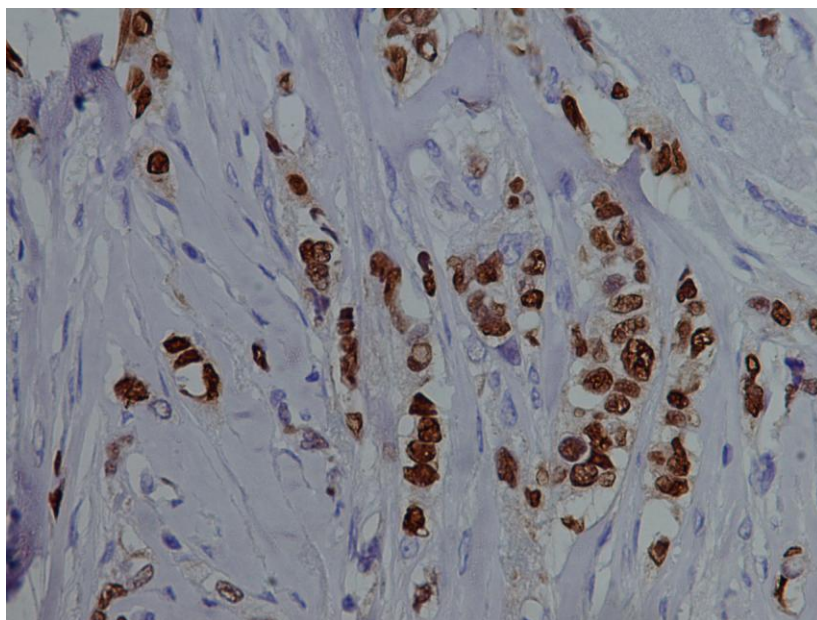
Slika 17. Fokus pleomorfnog LCIS-a sa izraženom ekspresijom progesteronskih receptora (LSAB x 400)



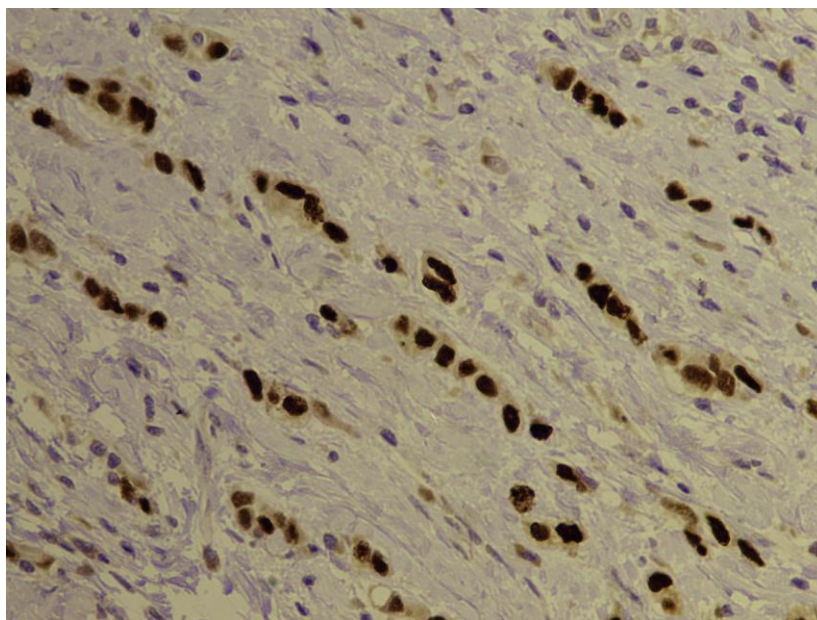
Slika 18. Umerena imunohistohemijska reaktivnost progesteronskih receptora u tubulolobularnom podtipu ILC-a (LSAB x 400)



Slika 19. Slaba imunoreaktivnost progesteronskih receptora mešovitog podtipa ILC-a (LSAB x 400)



Slika 20. Pleomorfni podtip ILC-a sa umereno jakom ekspresijom progesteronskih receptora (LSAB x 400)



Slika 21. Jaka imunohistohemijska ekspresija progesteronskih receptora kod klasičnog ILC-a (LSAB x 400)

Analizom između PR skora i prisustva metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima utvrđeno je da bolesnice bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima imaju u 69,1% slučajeva pozitivan PR skor, dok je kod bolesnica sa metastatski izmenjenim aksilarnim limfnim nodusima PR skor bio pozitivan u 62,5% slučajeva, ali razlika nije bila statistički značajna (Fisher-ov test, $p=0,2895$) (Tabela 18).

Tabela 18. Odnos između PR skora i prisustva metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

PR skor	metastaze		ukupno	p
	nema	ima		
negativan	75	33	108	0,2895
pozitivan	167	55	222	
ukupno	242	88	330	

5.2.3 HER-2

Određivanjem skora HER-2 onkoproteina kod 259 bolesnica sa lobularnim karcinomom, skor je bio pozitivan samo kod 41 bolesnice (15,83%) u odnosu na HER-2 negativan skor kod 218 bolesnica (84,17%). Razlike u prosečnoj starosti između bolesnica sa pozitivnim i negativnim HER-2 skorom nisu nađene (t test, $p>0,05$) (Tabela 19).

Tabela 19. Razlika u prosečnoj starosti bolesnica sa pozitivnim i negativnim HER-2 skorom

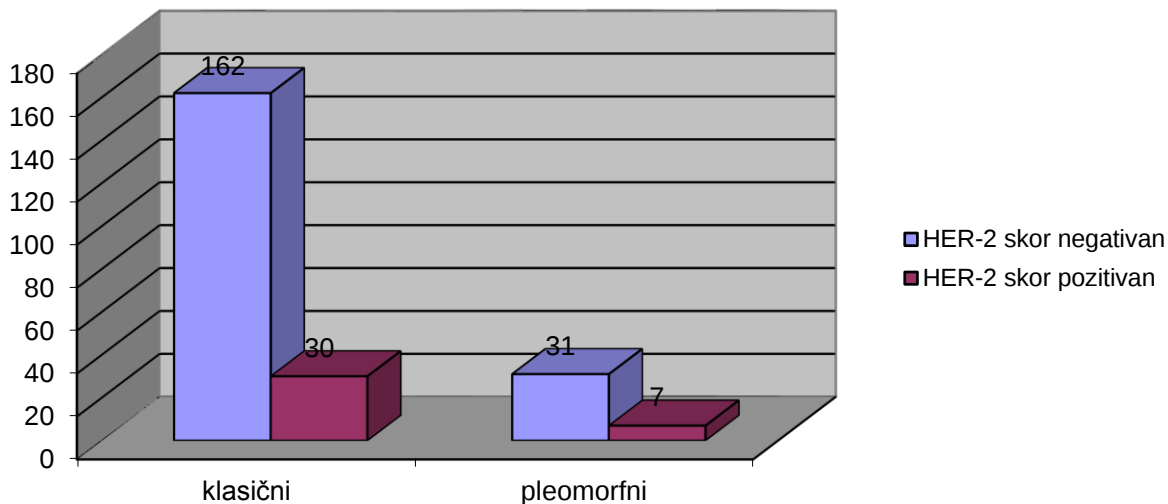
HER-2 skor	$\bar{X} \pm SD$	t	p
pozitivan	57,58±12,86	0,404	0,687
negativan	58,4±11,75		

Nije utvrđena statistički signifikantna razlika u učestalosti pojedinih podtipova lobularnog karcinoma i HER-2 skora (Fisher-ov test, $p>0,05$) (Tabela 20). Pleomorfni

ILC-i su češće imali pozitivan HER-2 skor (18,42%) u odnosu na klasični tip ILC-a (15,62%) ali bez signifikantne razlike učestalosti (Fisher-ov test, $p=0,6346$) (Grafikon 14).

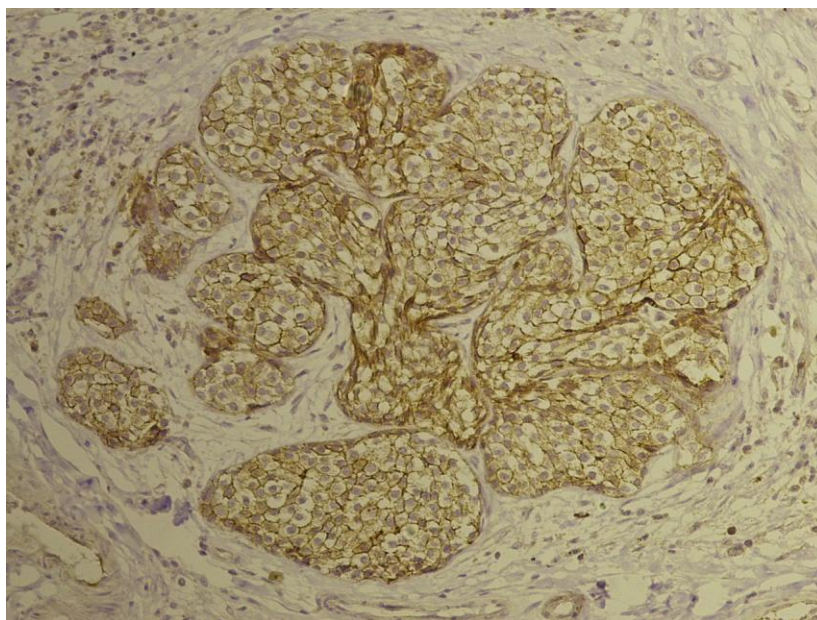
Tabela 20. Odnos podtipa lobularnog karcinoma i HER-2 skora

Podtip tumora	HER-2 skor		ukupno	p
	negativan	pozitivan		
in situ	4	1	5	0,5806
klasični podtip	162	30	192	0,8482
alveolarni podtip	1	2	3	0,0662
solidni podtip	4	0	4	$p>0,05$
tubulolobularni podtip	3	0	3	$p>0,05$
pleomorfni podtip	31	7	38	0,6329
mešoviti lobularni podtip	13	1	14	0,7045
ukupno	218	41	259	

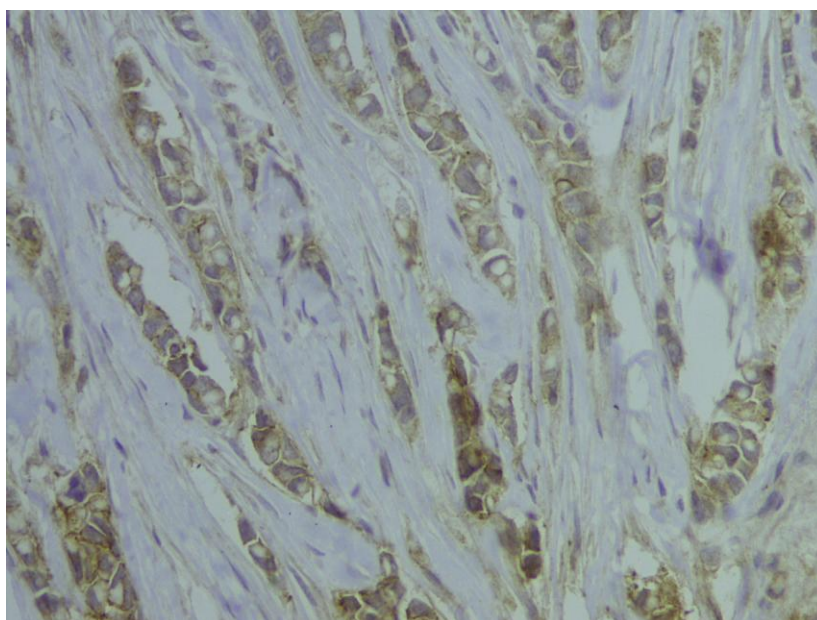


Grafikon 14. Odnos između HER-2 skora klasičnog i pleomorfnog podtipa tumora

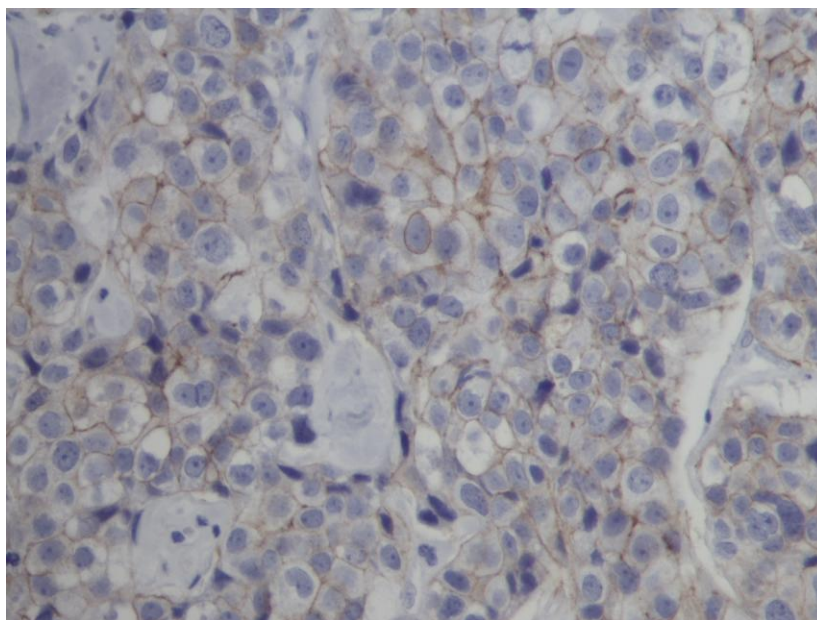
Membransko bojenje HER-2 onkoproteina ćelija različitih podtipova invazivnog lobularnog karcinoma dojke je dato na slikama 22, 23, 24, 25 i 26.



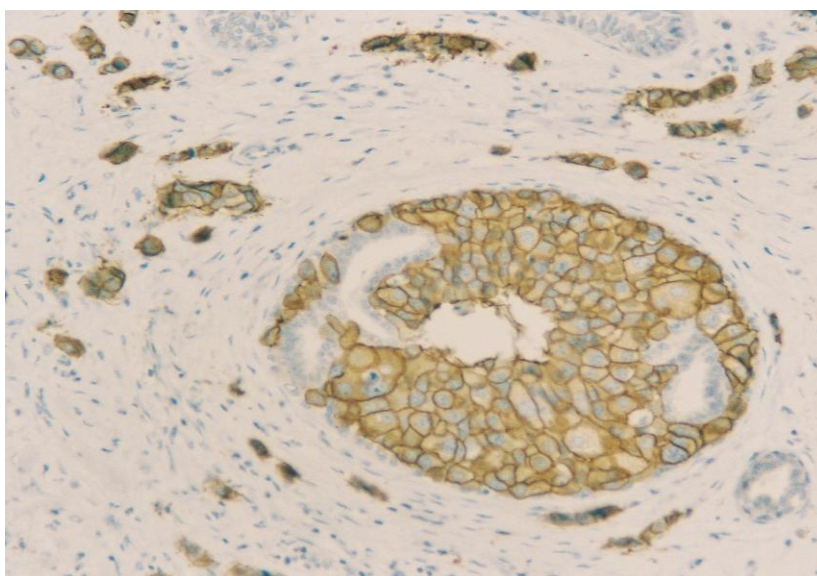
Slika 22. Slabo membransko bojenje HER-2 onkoproteina kod LCIS-a (LSAB x 200)



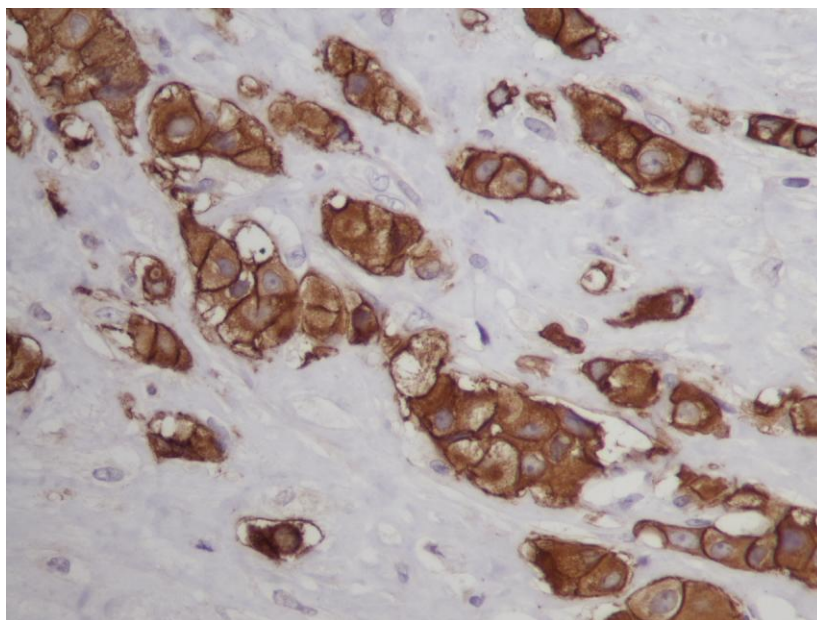
Slika 23. Slaba i nekompletna membranska prebojenost HER-2 onkoproteina ćelija klasičnog ILC-a (LSAB x 400)



Slika 24. Difuzno membransko bojenje HER-2 onkoproteina ćelija solidnog podtipa ILC-a (LSAB x 400)



Slika 25. Izražena membranska HER-2 ekspresija u invazivnoj i "in situ" komponenti klasičnog ILC-a (LSAB x 200)



Slika 26. Pleomorfni podtip ILC-a sa izraženom membranskom HER-2 aktivnošću
(LSAB x 400)

Pozitivan HER-2 skor je bio prisutan kod 18,52% bolesnica sa metastatski izmenjenim aksilarnim limfnim čvorovima u odnosu na pozitivan HER-2 skor kod 14,61% bolesnica bez metastaza. Razlika nije bila statistički značajna (Fisher-ov test, $p=0,4641$)(Tabela 21).

Tabela 21. Odnos između HER-2 skora i prisustva metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

HER-2 skor	metastaze		ukupno	p
	nema	ima		
negativan	152	66	218	0,4641
pozitivan	26	15	41	
ukupno	178	81	259	

5.2.4 BRCA1

U studiji je izdvojeno 50 bolesnica sa lobularnim karcinomom dojke koje su imale pozitivnu porodičnu anamnezu, a BRCA1 pozitivnost je potvrđena u 68% slučajeva. Statistički značajne razlike u prosečnoj starosti između bolesnica sa negativnim i pozitivnim nalazom BRCA1 nisu postojale (t test, $p>0,05$) (Tabela 22).

Tabela 22. Razlika u prosečnoj starosti bolesnica sa i bez prisustva BRCA 1 proteina

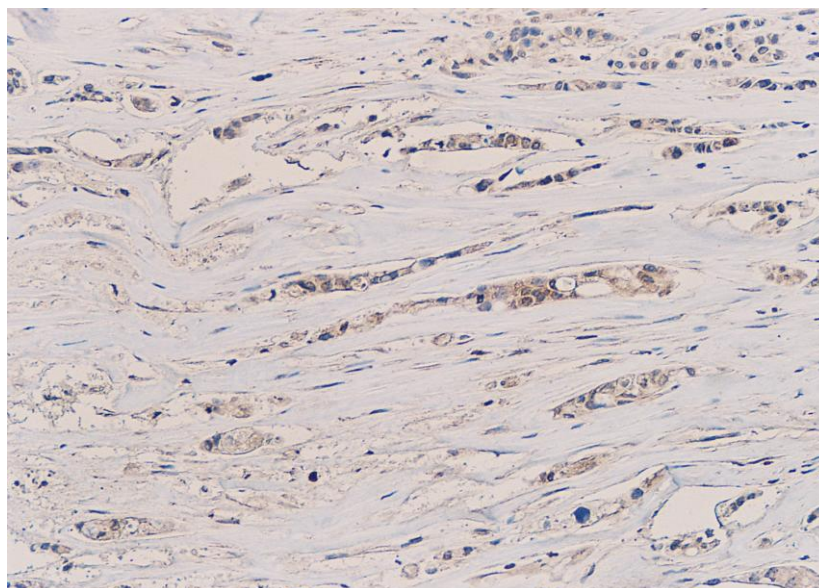
BRCA 1	$\bar{X} \pm SD$	t	p
negativan	58,94±11,57	1,04	0,304
pozitivan	55,06±12,61		

U odnosu na podtip lobularnog karcinoma nije utvrđena statistički značajna razlika između podtipa i prisustva BRCA1 proteina (Fisher-ov test, $p>0,05$) (Tabela 23).

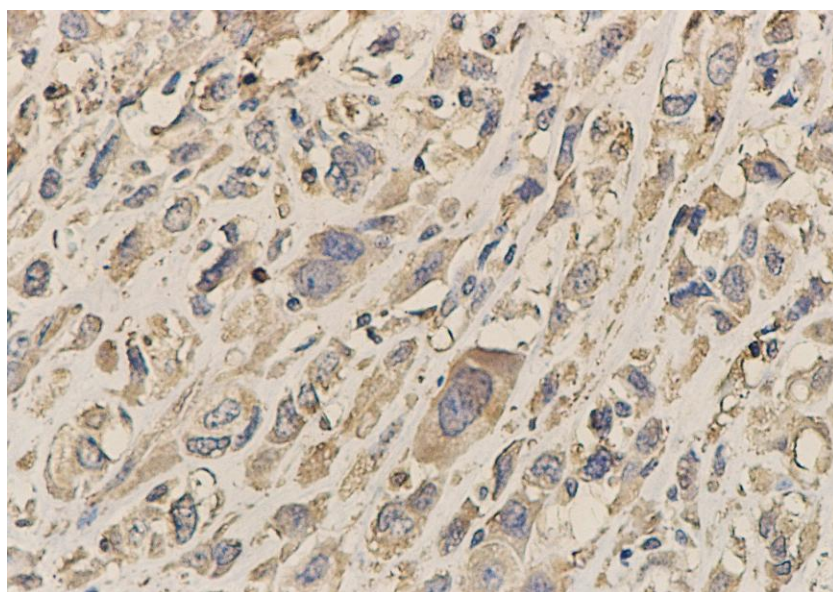
Tabela 23. Odnos između podtipa tumora i prisustva BRCA1 proteina

Podtip tumora	BRCA1		ukupno	p
	negativan	pozitivan		
in situ	0	1	1	$p>0,05$
klasični podtip	10	23	33	0,7568
solidni podtip	0	1	1	$p>0,05$
pleomorfni podtip	6	7	13	0,3006
mešoviti lobularni podtip	0	2	2	$p>0,05$
ukupno	16	34	50	

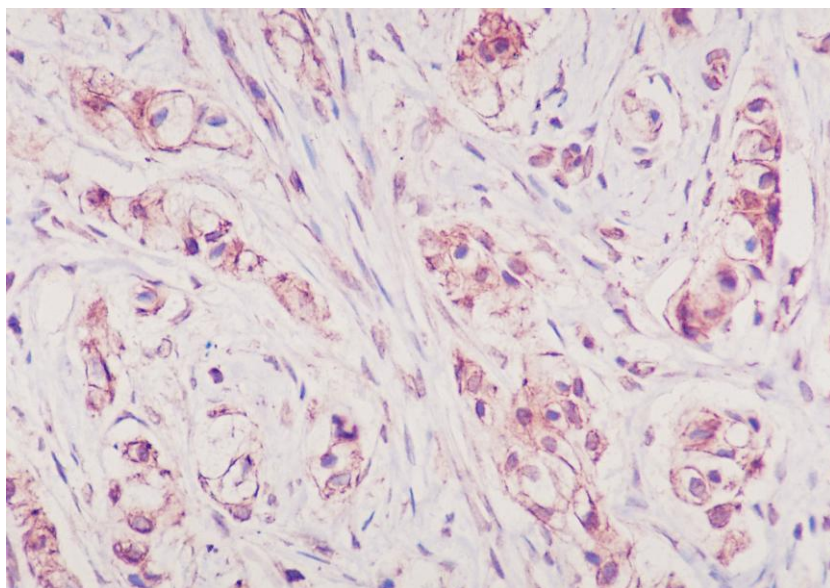
Imunohistohemijska ekspresija BRCA 1 proteina u citoplazmi ćelija invazivnog lobularnog karcinoma dojke je prikazana na slikama 27, 28 i 29.



Slika 27. Citoplazmatska akumulacija BRCA 1 proteina kod klasičnog ILC-a sa
dezmoplastičnom stromom (LSAB x 100)



Slika 28. Pleomorfni histiocitoliki podtip ILC-a sa izraženom citoplazmatskom
ekspresijom BRCA 1 proteina (LSAB x 400)



Slika 29. Gubitak jedarne ekspresije i pojava citoplazmatske ekspresije BRCA 1 proteina kod ILC-a sa "signet ring" ćelijama (LSAB x 200)

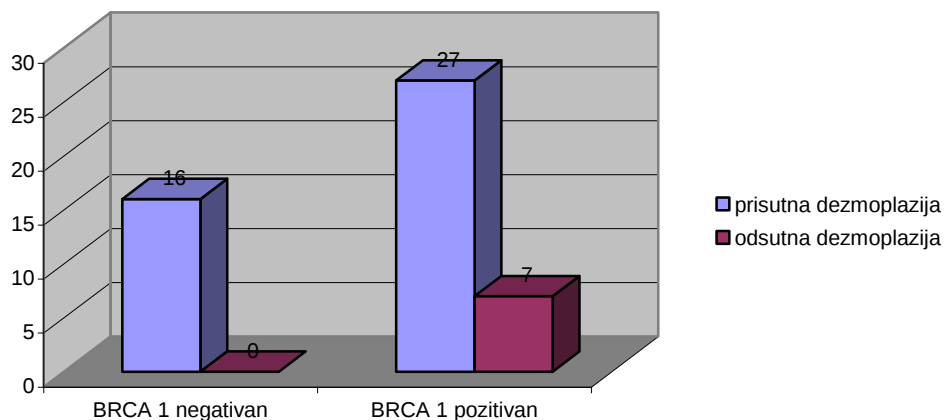
Multifokalnost i multicentričnost lobularnog karcinoma dojke i prisustvo BRCA1 nije pokazalo statistički signifikantne razlike. BRCA 1 pozitivni ILC-i su bili u 14,7% slučajeva multifokalni/multicentrični dok su BRCA 1 negativni ILC-i pokazivali multifokalnost/multicentričnost u 12,5% slučajeva (Fisher-ov test, $p > 0,05$) (Tabela 24).

Tabela 24. Odnos između multifokalnosti i multicentričnosti tumora i prisustva BRCA1 proteina

mf/mc	BRCA1		ukupno	p
	negativan	pozitivan		
odsutna multifokalnost i multicentričnost	14	29	43	$p > 0,05$
multifokalni	2	1	3	0,2367
multicentrični	0	4	4	0,2919
ukupno	16	34	50	

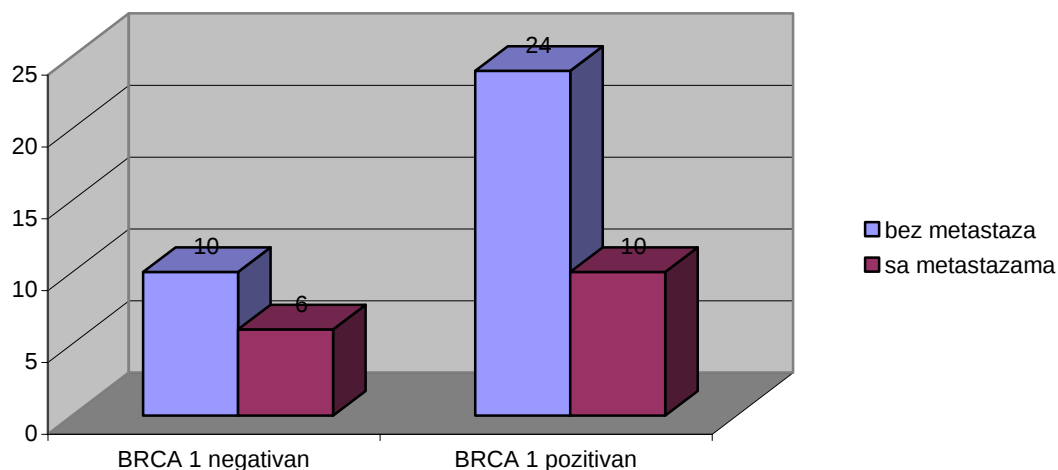
Kod svih BRCA 1 negativnih ILC-a je bila prisutna dezmodoplastična reakcija strome u odnosu na BRCA 1 pozitivne ILC-e gde je dezmodoplastična reakcija uočena u

79,41% slučajeva, a razlika nije statistički značajna (Fisher-ov test, $p = 0,0812$) (Grafikon 15).



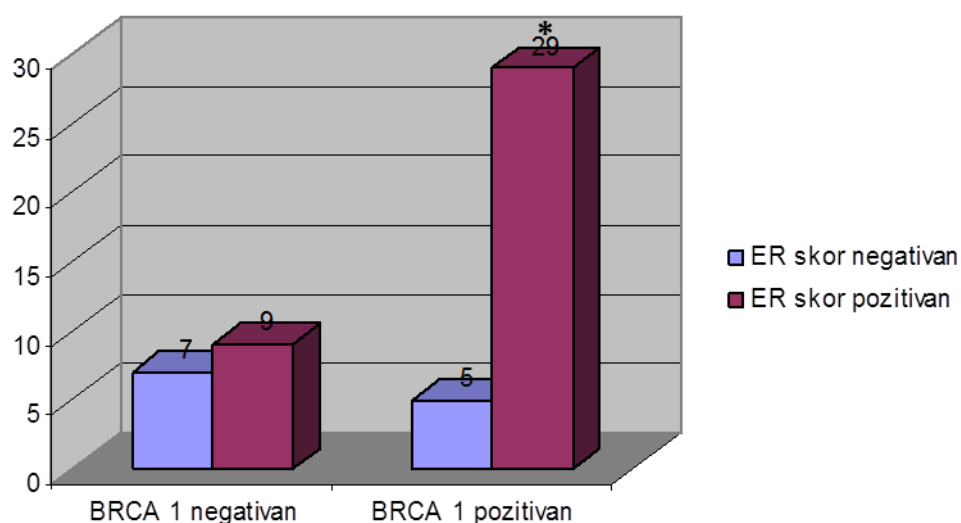
Grafikon 15. Odnos između dezmozplazije i prisustva BRCA1 proteina

Metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima su češće bile prisutne kod BRCA 1 negativnih ILC-a (37,5%) u odnosu na BRCA 1 pozitivne ILC-e gde je učestalost metastaza bila 29,41%, ali bez statističke značajnosti (Fisher-ov test, $p=0,7462$) (Grafikon 16).



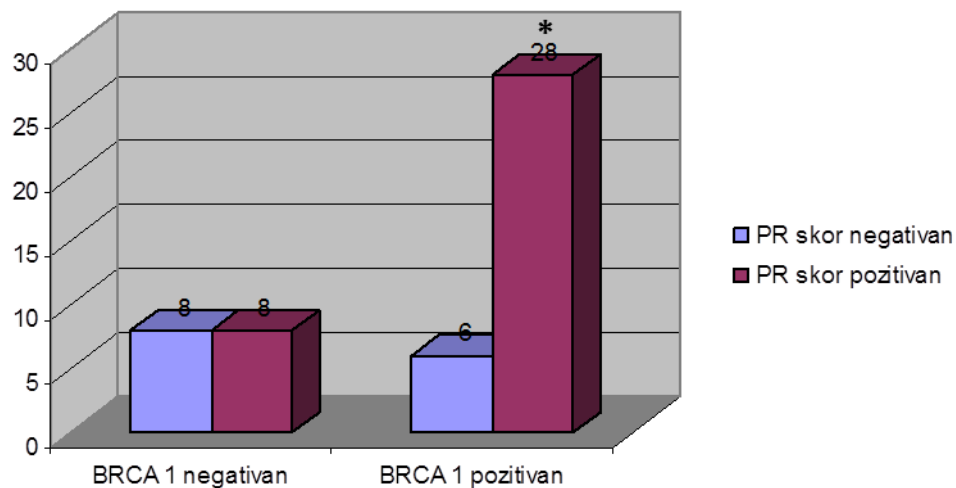
Grafikon 16. Odnos između metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima i prisustva BRCA1 proteina

Određivanjem relacije između ER skora i prisustva BRCA1 utvrđena je statistički signifikantna povezanost (Fisher-ov test, $p = 0,0363$), gde je 85,29% BRCA 1 pozitivnih ILC-a istovremeno imalo pozitivan ER skor u odnosu na BRCA 1 negativne ILC-e sa pozitivnim ER skorom (56,25%) (Grafikon 17).



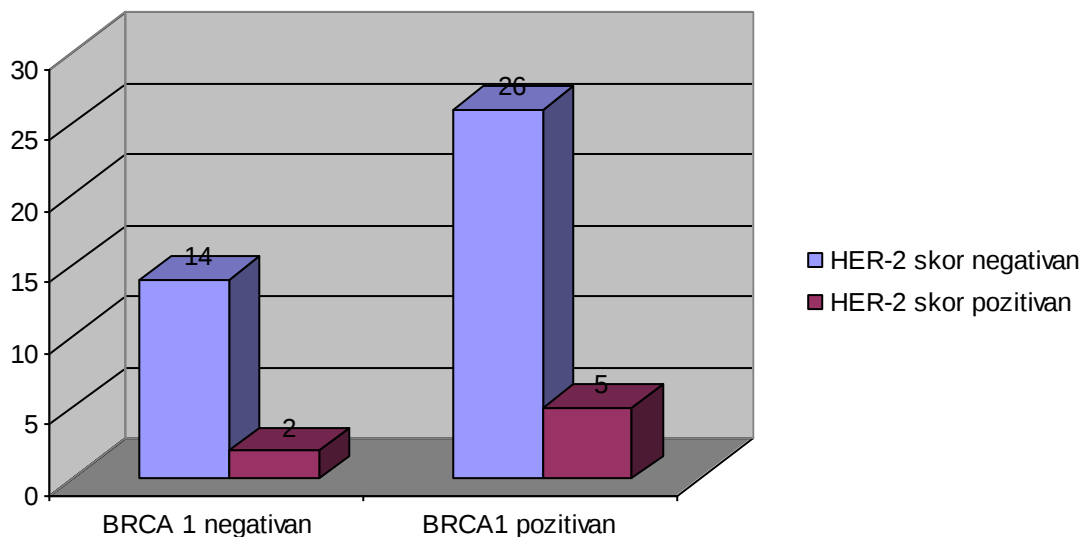
Grafikon 17. Odnos između ER skora i prisustva BRCA1; postojanje statistički značajne razlike označeno je (*), $p=0,0363$ u odnosu na BRCA 1 negativne ILC-e sa pozitivnim ER skorom

Postoji i statistički značajna povezanost pozitivnosti PR skora i prisustva BRCA1 proteina kod 82,35% slučajeva ILC-a u odnosu na 50% PR pozitivnih ILC-a negativnih na BRCA 1 protein (Fisher-ov test, $p = 0,0396$) (Grafikon 18).



Grafikon 18. Odnos između PR scora i prisustva BRCA1; postojanje statistički značajne razlike označeno je (*), $p=0,0396$ u odnosu na BRCA 1 negativne ILC-e sa pozitivnim PR skorom

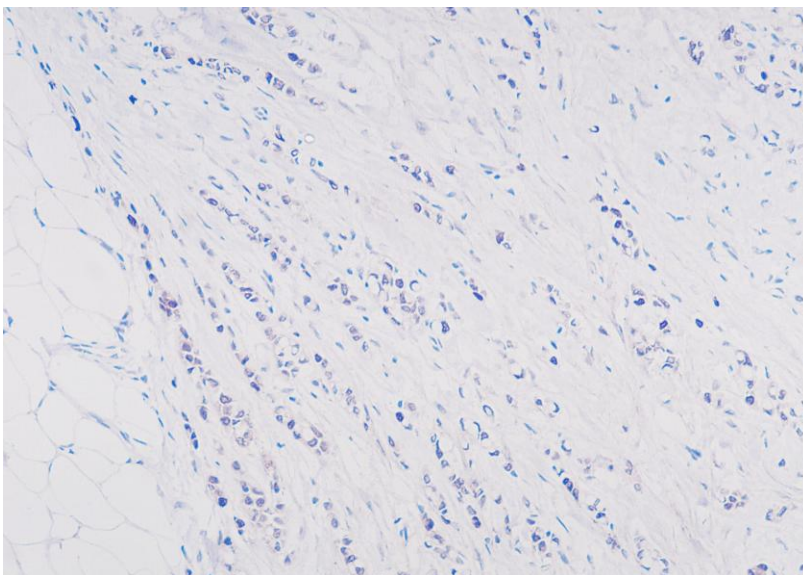
BRCA 1 pozitivni ILC-i su imali pozitivan HER-2 skor u 16,12% slučajeva, a BRCA 1 negativni ILC-i su imali pozitivan HER-2 skor u 12,5% slučajeva, bez statistički značajne razlike (Fisher-ov test, $p>0,05$) (Grafikon 19).



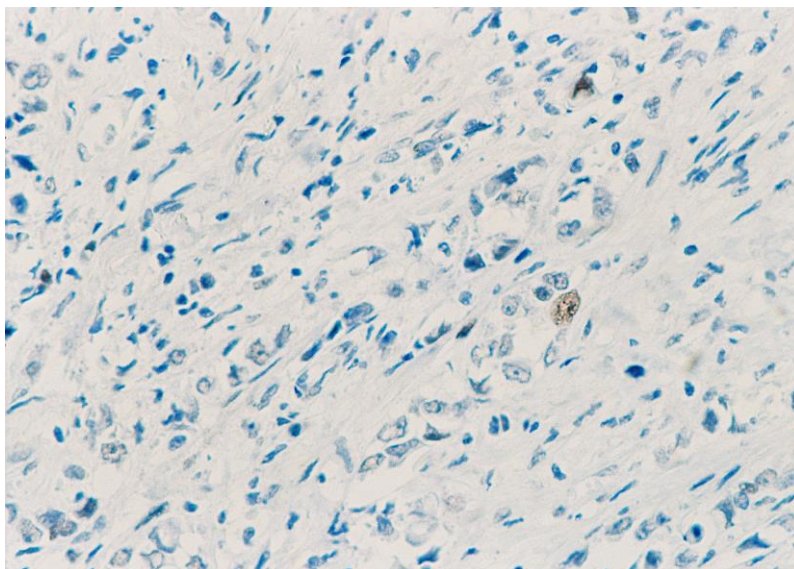
Grafikon 19. Odnos između HER-2 scora i prisustva BRCA1

5.2.5 Supresorni p53 gen

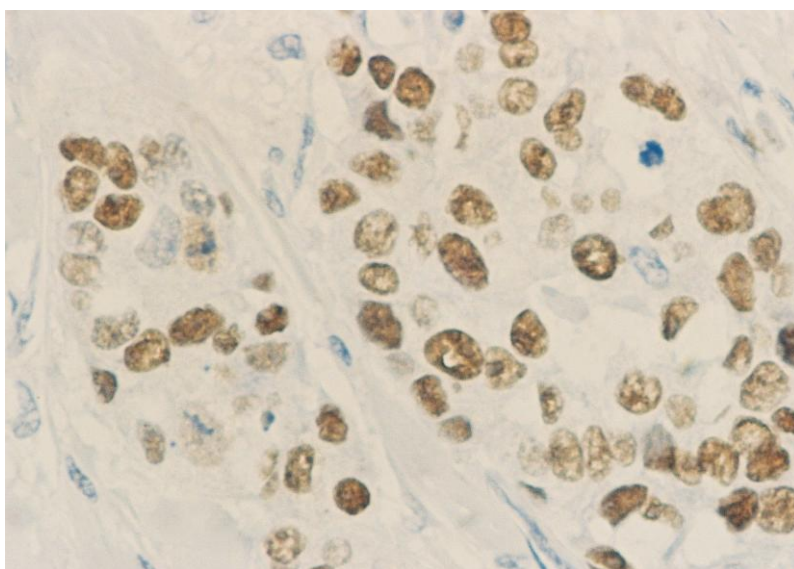
Akumulacija p53 proteina praćena je kod 125 bolesnica sa lobularnim karcinomom dojke. 41,6% analiziranih slučajeva je imalo intranuklearnu ekspresiju u više od 10% tumorskih ćelija tj. bilo je p53 pozitivno. Različiti nivoi ekspresije p53 u jedrima tumorskih ćelija su prikazani na slikama 30, 31 i 32.



Slika 30. Slaba p53 imunoreaktivnost u jedrima ćelija klasičnog ILC-a (LSAB x 100)



Slika 31. Retke p53 pozitivne ćelije ILC-a (LSAB x 200)



Slika 32. Jaka p53 imunoreaktivnost kod ILC-a visokog nuklearnog gradusa (LSAB x 400)

Analiza ekspresije p53 u odnosu na prosečnu starost bolesnica sa lobularnim karcinomom dojke nije pokazala statistički značajne razlike (t test, $p > 0,05$) (Tabela 25).

Tabela 25. Razlika u prosečnoj starosti bolesnica sa i bez prisustva p53

p53	$\bar{X} \pm SD$	t	p
negativan	57,92±10,52	0,377	0,707
pozitivan	57,13±12,61		

Analizom odnosa između podtipa tumora i prisustva p53 nije dokazana statistički značajna povezanost. Klasični i pleomorfni podtip ILC-a su imali skoro identičnu učestalost p53 pozitivnosti (42,26% prema 42,1%) , dok je nešto veća bila kod mešovito lobularnog podtipa (50%) (Fisher-ov test, $p > 0,05$) (Tabela 26).

Tabela 26. Odnos između podtipa tumora i p53

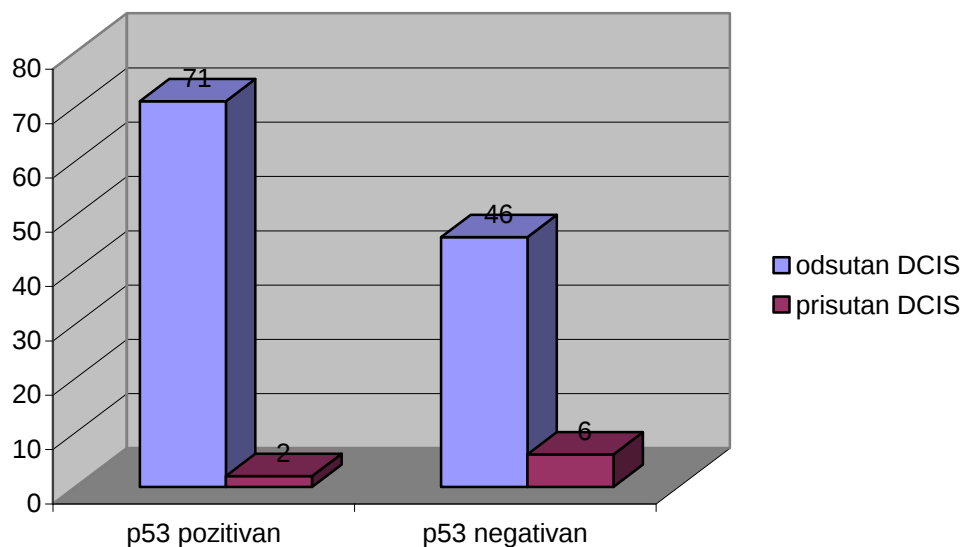
Podtip tumora	p53		ukupno	p
	negativan	pozitivan		
in situ	1	0	1	p>0,05
klasični podtip	56	41	97	0,8305
alveolarni podtip	2	0	2	0,5102
pleomorfni podtip	11	8	19	p>0,05
mešoviti lobularni podtip	3	3	6	0,6923
ukupno	73	52	125	

ILC-i koji nisu ni multifokalni ni multicentrični statistički signifikantno češće (45,04%) pokazuju p53 pozitivnost u odnosu na p53 pozitivne multifokalne/multicentrične ILC-e (14,28%) (Fisher-ov test, p=0,037) (Tabela 27).

Tabela 27. Odnos između multifokalnosti/multicentričnosti i prisustva p53

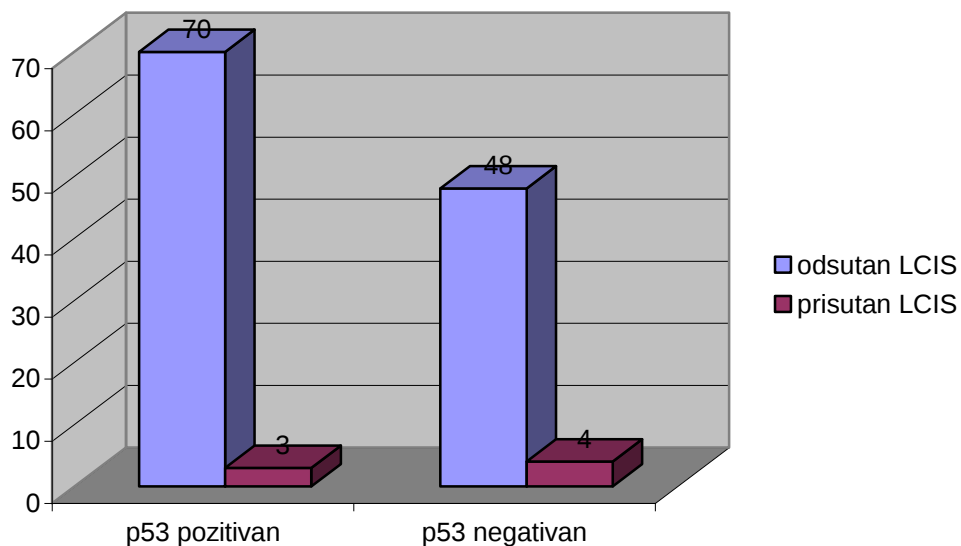
mf/mc	p53		ukupno	p
	negativan	pozitivan		
odsutna multifokalnost i multicentričnost	61	50	111	0,037*
multifokalni/multicentrični	12	2	14	
ukupno	73	52	125	

p53 pozitivni ILC-i su češće bez fokalnih DCIS promena (60,68%) u odnosu na p53 pozitivne sa fokalnim DCIS-om (25%), ali bez statistički značajne razlike (Fisher-ov test, p = 0,0659) (Grafikon 20).



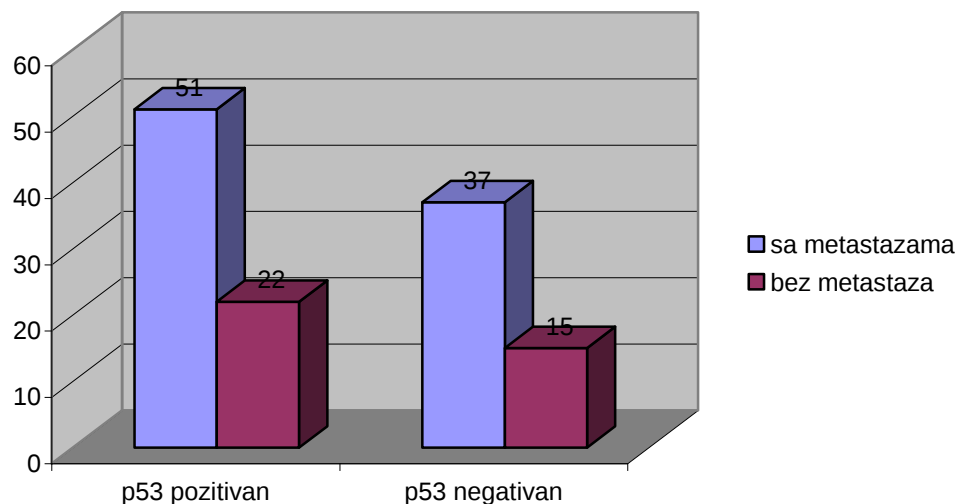
Grafikon 20. Odnos između prisustva fokalnog DCIS-a i p53

Odnos između fokalnog LCIS-a i prisustva p53 takođe nije statistički signifikantna. Dobijeni podaci pokazuju da ILC-i sa fokalnim LCIS-om su pozitivni na p53 u 42,85% slučajeva u odnosu na p53 pozitivne ILC-e bez LCIS promena (59,32%) (Fisher-ov test, $p=0,4486$) (Grafikon 21).



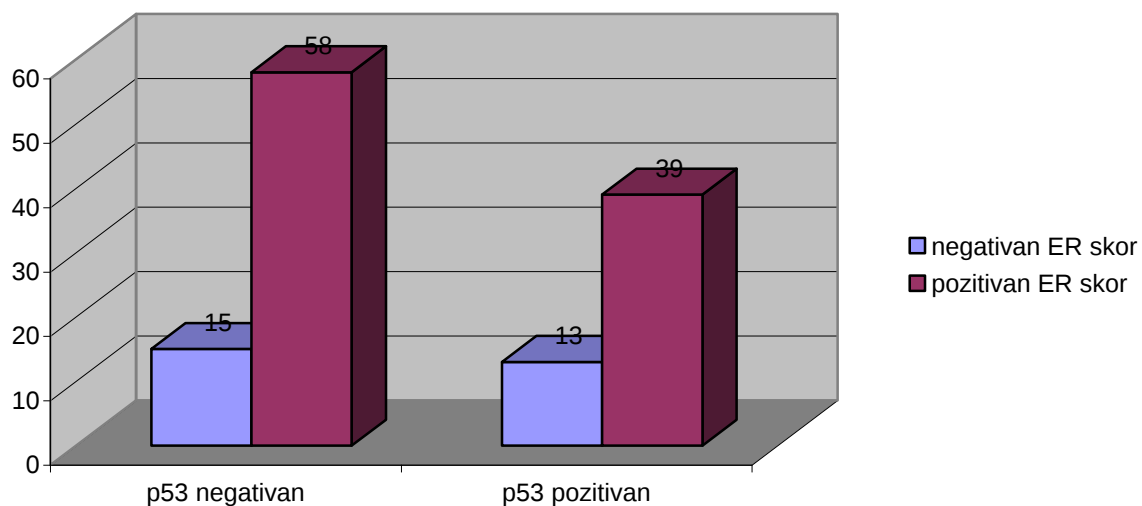
Grafikon 21. Odnos između prisustva fokalnog LCIS-a i p53

Statistički značajna povezanost metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima i prisustva p53 nije nađena: metastaze je imalo 57,95% bolesnica sa p53 pozitivnim ILC-om u odnosu na 59,45% bolesnica bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima sa p53 pozitivnošću (Fisher-ov test, $p>0,05$) (Grafikon 22).

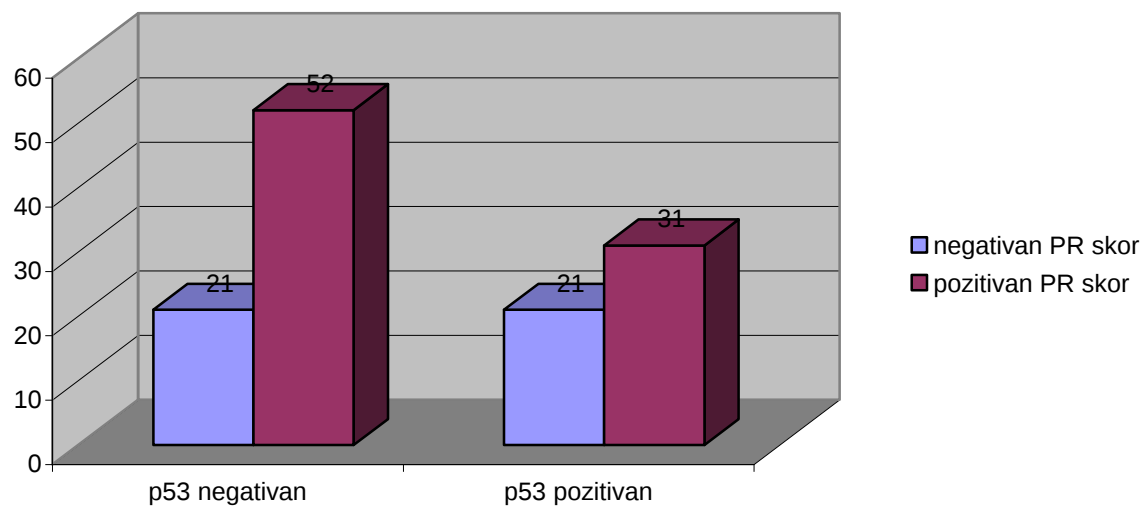


Grafikon 22. Odnos između metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima i p53 pozitivnosti

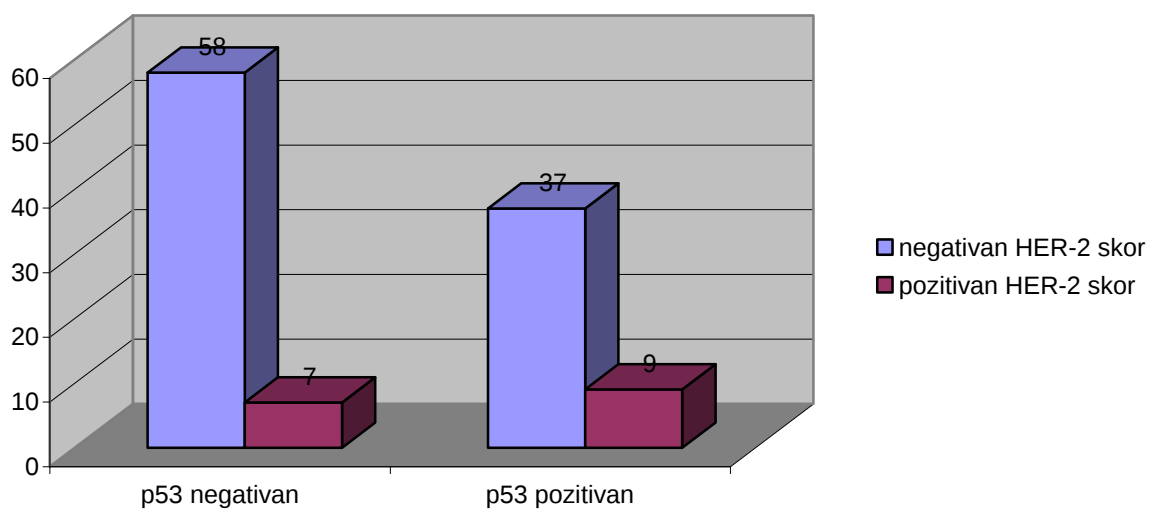
Statističkom analizom odnosa između ER skora i p53, PR skora i p53 i HER-2 skora i p53 nisu utvrđene statistički značajne razlike (Fisher-ov test, $p>0,05$) (Grafikoni 23, 24 i 25).



Grafikon 23. Odnos između ER skora i p53



Grafikon 24. Odnos između PR skora i p53



Grafikon 25. Odnos između HER-2 skora i p53

Statistički značajna razlika nije postojala ni između p53 pozitivnosti i prisustva BRCA 1 proteina (Fisher-ov test, $p=0,3515$) (Tabela 28).

Tabela 28. Odnos između p53 pozitivnosti i prisustva BRCA 1 proteina

p53	BRCA1		ukupno	p
	negativan	pozitivan		
negativan	8	22	30	0,3515
pozitivan	8	11	19	
ukupno	16	33	49	

5.2.6 Ki-67

Određivanjem Ki-67 intranuklearne ekspresije ispitana je proliferativna aktivnost ćelija lobularnog karcinoma dojke kod 60 bolesnica. Prosečna starost bolesnica nije statistički značajno povezana sa Ki-67 indeksom (t test, $p > 0,05$) (Tabela 29).

Tabela 29. Razlika u prosečnoj starosti bolesnica sa niskim i visokim Ki-67 indeksom

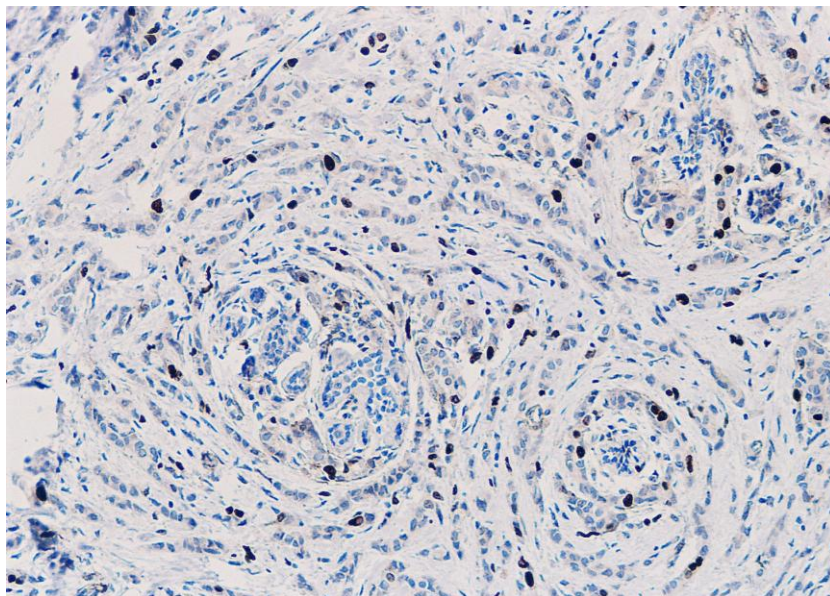
Ki-67 indeks	$\bar{X} \pm SD$	t	p
nizak	56,8±12,1	0,107	0,915
visok	56,45±11,81		

Utvrđena je statistički značajna razlika između podtipa tumora i prisustva Ki-67 imunoreaktivnosti, gde su „in situ” lobularni karcinomi statistički značajno češće imali nizak Ki-67 indeks u odnosu na ostale podtipove ILC-a (Fisher-ov test, $p = 0,0333$) (Tabela 30).

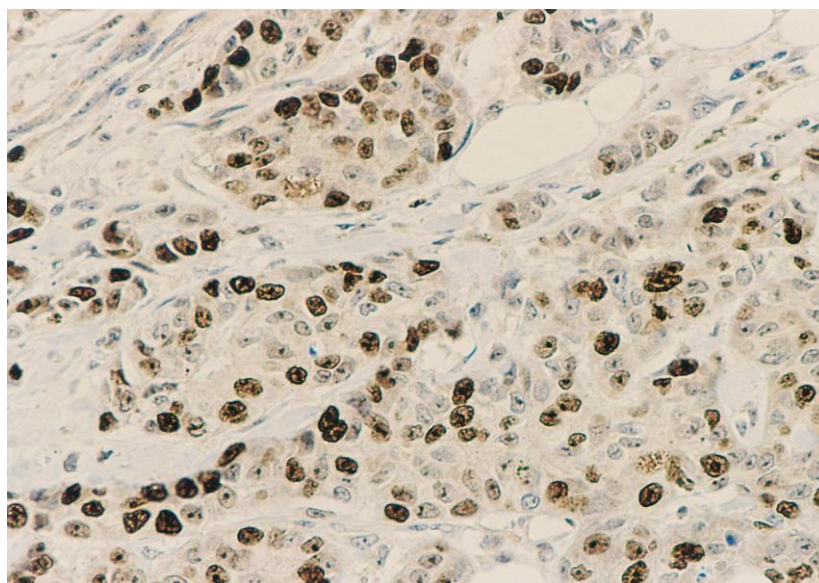
Tabela 30. Odnos podtipa tumora i Ki-67 indeksa

Podtip tumora	Ki-67 indeks		ukupno	p
	nizak	visok		
in situ	3	0	3	0,0333*
klasični podtip	10	27	37	0,2612
alveolarni podtip	1	0	1	0,3333
solidni podtip	1	0	1	0,3333
pleomorfni podtip	5	9	14	$p > 0,05$
mešoviti lobularni podtip	0	4	4	0,2909
ukupno	20	40	60	

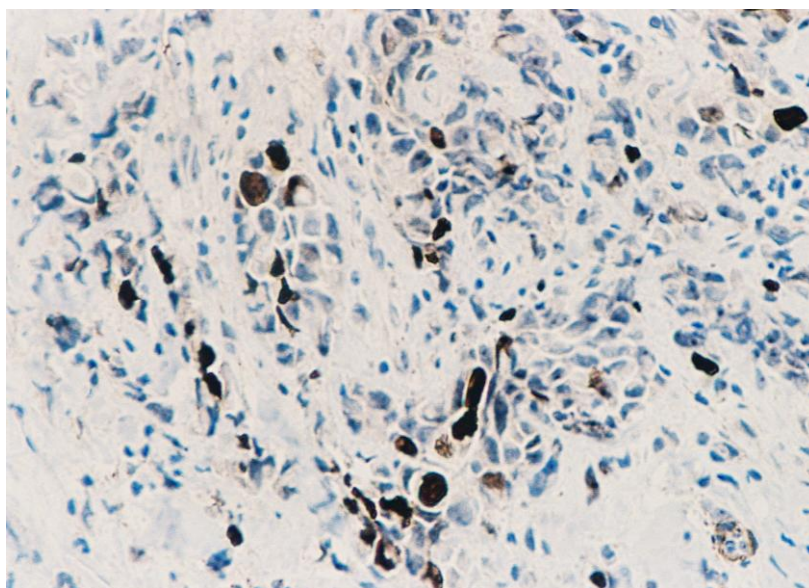
Ki-67 imunoreaktivnost jedara u invazivnim lobularnim karcinomima dojke različitih podtipova i različitog histološkog i jedarnog stepena ilustrovana je na slikama 33, 34 i 35.



Slika 33. Ki-67 imunoreaktivnost u klasičnom ILC-u (LSAB x 100)



Slika 34. Intenzivna Ki-67 imunoreaktivnost u invazivnom lobularnom karcinomu visokog jedarnog i histološkog gradusa (LSAB x 200)



Slika 35. Visok Ki-67 indeks u pleomorfnom podtipu ILC-a (LSAB x 200)

Statističkom analizom nije utvrđena značajna povezanost ER skora i Ki-67 indeksa, PR skora i Ki-67 indeksa, HER-2 skora i Ki-67 indeksa (Fisher-ov test, $p > 0,05$) (Tabela 31).

Tabela 31. Odnos između ER skora, PR skora i HER-2 skora prema Ki-67 indeksu

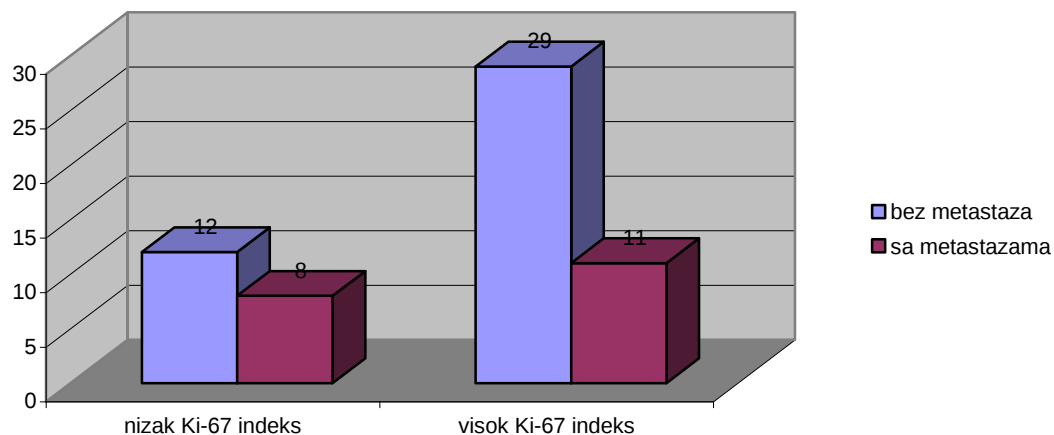
parametar		Ki-67 indeks		ukupno	p
		nizak	visok		
ER skor	negativan	8	12	20	0,5629
	pozitivan	12	28	40	
PR skor	negativan	7	16	23	0,7833
	pozitivan	13	24	37	
HER-2 skor	negativan	15	28	43	$p > 0,05$
	pozitivan	2	4	6	

Nije utvrđena statistički značajna povezanost između Ki-67 indeksa i prisustva BRCA 1 proteina (Fisher-ov test, $p = 0,2465$), ali je postojala statistički značajna povezanost između Ki-67 indeksa i p53 pozitivnosti: ILC-i sa visokim Ki-67 indeksom su imali p53 pozitivnost u 85,71% slučajeva u odnosu na 59,46% p53 negativnih ILC-a sa visokim Ki-67 indeksom (Fisher-ov test, $p = 0,0443$) (Tabela 32).

Tabela 32. Odnos Ki-67 indeksa sa prisustvom BRCA 1 proteina i p53 pozitivnošću

parametri		Ki-67 indeks		ukupno	p
		nizak	visok		
BRCA 1	pozitivan	8	11	19	0,2465
	negativan	2	9	11	
p53	pozitivan	3	18	21	0,0443*
	negativan	15	22	37	

Metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima su češće bile prisutne kod ILC-a sa niskim Ki-67 indeksom (40%) u odnosu na ILC-e bez metastaza sa visokim Ki-67 indeksom (27,5%) ali bez statističke značajnosti (Fisher-ov test, $p=0,3841$) (Grafikon 26).



Grafikon 26. Odnos između metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima i Ki-67 indeksa

5.2.7 E-cadherin

Transmembranski ćelijski adhezivni protein E-cadherin je određivan kod 38 bolesnica sa lobularnim karcinomom dojke koje su imale visok jedarni gradus ili manje od 10% duktalne komponente. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između bolesnica sa smanjenom ekspresijom ili potpunim gubitkom E-cadherina u odnosu na prosečnu starost (t test, $p>0,05$) (Tabela 33).

Tabela 33. Razlika u prosečnoj starosti bolesnica sa smanjenom ekspresijom i gubitkom E-cadherina

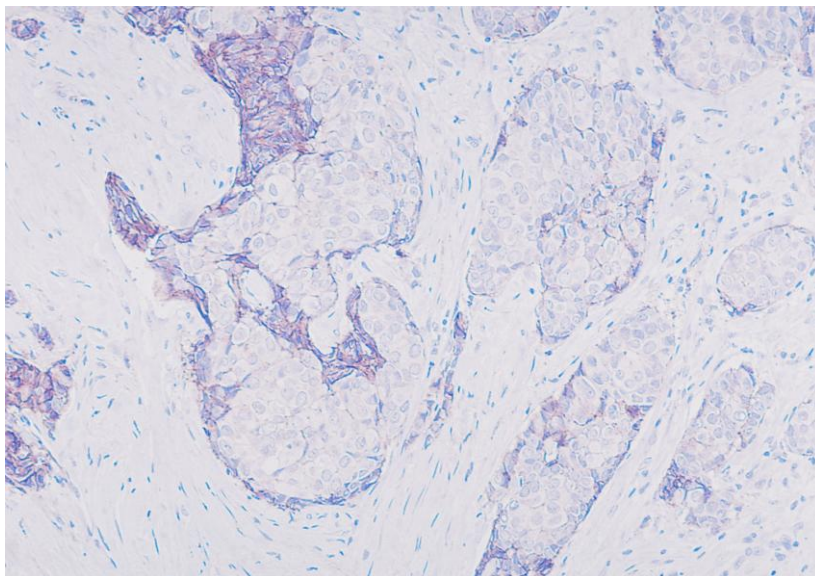
E-cadherin	$\bar{X} \pm SD$	t	p
gubitak ekspresije	57,2±12,06	1,062	0,295
smanjena ekspresija	52,78±13,61		

Relacija između podtipa lobularnog karcinoma i smanjene ekspresije ili potpunog gubitka E-cadherina nije bila statistički značajna (Fisher-ov test, $p>0,05$) (Tabela 34).

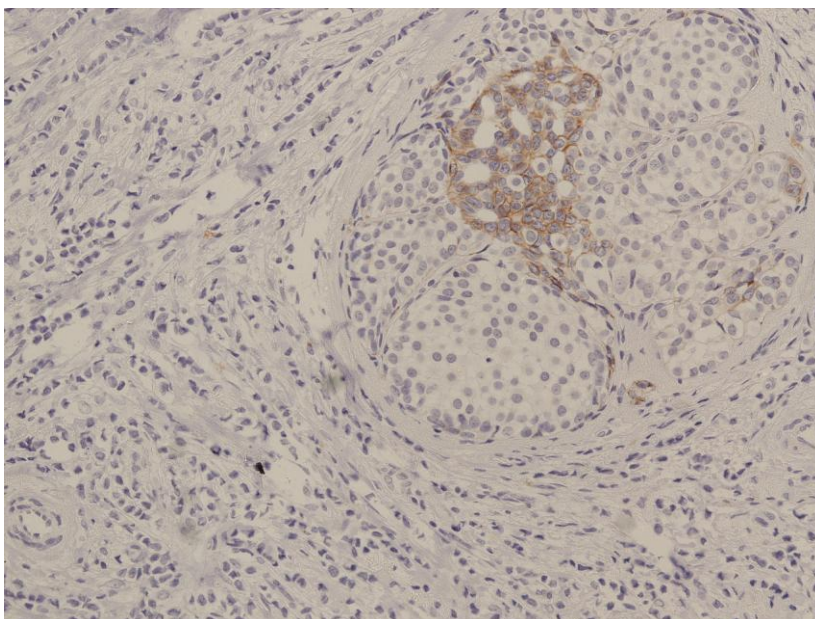
Tabela 34. Odnos podtipa tumora i ekspresije E-cadherina

Podtip tumora	E-cadherin		ukupno	p
	gubitak	smanjena		
in situ	1	0	1	$p>0,05$
klasični podtip	11	9	20	$p>0,05$
alveolarni podtip	0	1	1	0,4737
solidni podtip	0	1	1	0,4737
pleomorfni podtip	8	5	13	0,5064
mešoviti lobularni podtip	0	2	2	0,2176
ukupno	20	18	38	

Odsustvo E-cadherin membranskog bojenja kod "in situ" i invazivnog lobularnog karcinoma dojke je dato na slikama 36 i 37.

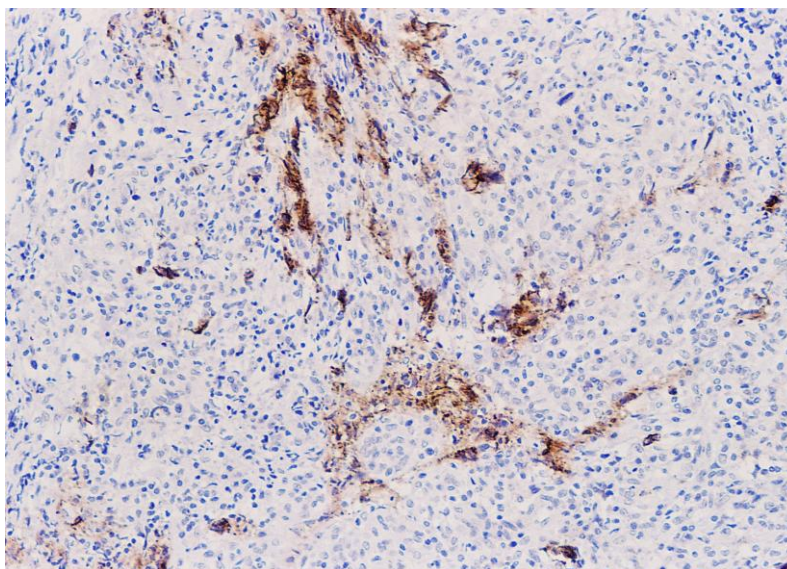


Slika 36. Odsustvo E-cadhein membranskog bojenja kod "Paget"-oidnog širenja LCIS-a kroz duktuse (LSAB x 100)



Slika 37. Gubitak membranskog bojenja na E-cadherin kod fokalnog LCIS-a i klasičnog ILC-a (LSAB x 100)

Pojedini invazivni lobularni karcinomi dojke su pokazali aberantnu ekspresiju E-cadherina (slika 38).



Slika 38. Malobrojne ćelije ILC-a pokazuju aberantnu membransku ekspresiju E-cadherina (LSAB x 100)

Odnos između ER skora i ekspresije E-cadherina, PR skora i ekspresije E-cadherina, HER-2 skora i ekspresije E-cadherina nije pokazao statističku značajnost (Fisher-ov test, $p > 0,05$) (Tabela 35).

Tabela 35. Odnos između ER, PR i HER-2 skora i ekspresije E-cadherina

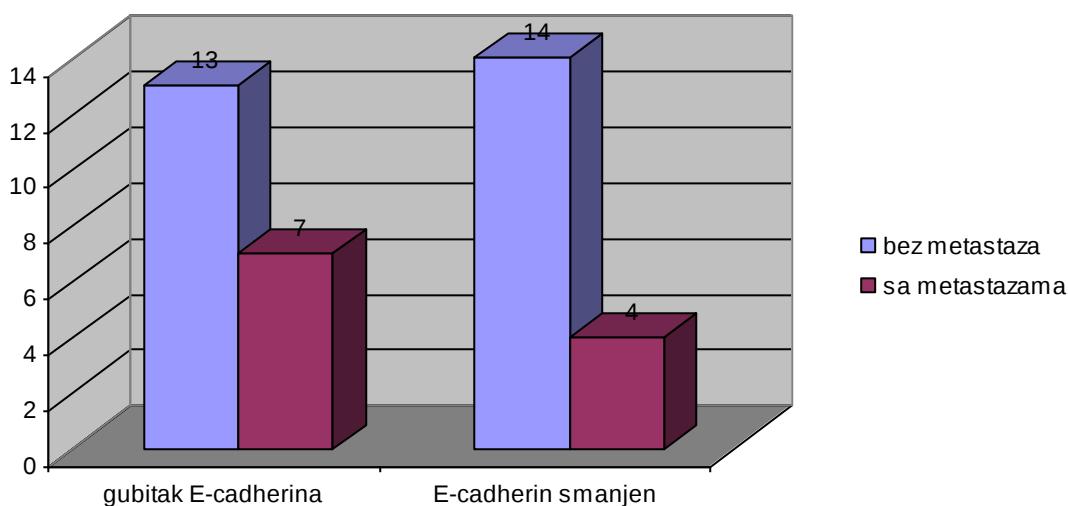
parametar		E-cadherin		ukupno	p
		gubitak	smanjen		
ER skor	negativan	7	6	13	$p > 0,05$
	pozitivan	13	12	25	
PR skor	negativan	8	7	15	$p > 0,05$
	pozitivan	12	11	23	
HER-2 skor	negativan	18	12	30	0,3738
	pozitivan	2	4	6	

Nije postojala statistički značajna razlika ni između ekspresije E-cadherina i p53 pozitivnosti, gde je potpun gubitak E-cadherinskog bojenja pokazalo 35,71% p53 pozitivnih ILC-a u odnosu na 68,18% p53 negativnih ILC-a (Fisher-ov test, $p = 0,0874$) (Tabela 36).

Tabela 36. Odnos između ekspresije E-cadherina i p53 pozitivnosti

E-cadherin	p53		ukupno	p
	pozitivan	negativan		
smanjen	9	7	16	0,0874
gubitak	5	15	20	
ukupno	14	22	36	

Analizom odnosa između metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima i ekspresije E-cadherina nisu nađene statistički značajne razlike, gdje je veći procenat (36,84%) ILC-a sa metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima imalo potpuni gubitak E-cadherinskog u odnosu na ILC-e sa metastazama i smanjenim E-cadherinskim bojenjem (22,2%) (Fisher-ov test, $p=0,4848$) (Grafikon 27).



Grafikon 27. Odnos između metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima i ekspresije E-cadherina

5.3 REZULTATI KVANTITATIVNE ANALIZE EKSPRESIJE ESTROGENSKIH RECEPTORA I POVRŠINE PRESEKA JEDARA U LOBULARNOM KARCINOMU DOJKE

Kvantitativnom analizom ER receptora kod 334 bolesnica sa lobularnim karcinomom dojke određivani su sledeći parametri: 1) procenat ER pozitivnih ćelija, 2) prosečan intenzitet bojenja jedara, 3) površina preseka jedara i 4) kvantitativni ER skor. Dobijeni podaci su korelirani sa starošću bolesnica, podtipom tumora, pT stadijumom tumora, multifokalnošću/multicentričnošću (mf/mc) tumora i procentom zahvaćenosti aksilarnih limfnih nodusa. Srednja vrednost, standardna devijacija, maksimalna, minimalna vrednost i medijana sva četiri ispitivana parametra ILC-a sumirani su u tabeli 37.

Tabela 37. Deskriptivna statistika procenta ER pozitivnih ćelija lobularnih karcinoma dojke, prosečnog intenziteta bojenja jedara, površine preseka jedara i kvantitativnog ER skora

parametar	$\bar{X} \pm SD$	Med	Min	Max
procenat pozitivnih ćelija	59,25±40,71	80	0	100
prosečan intenzitet	0,32±0,25	0,27	0	0,92
površina preseka jedara (μm^2)	27,64±9,16	26,85	13,35	57,75
kvantitativni ER skor	45,93±31,63	52,21	0	96,06

Posebno je ispitana razlika u prosečnoj vrednosti procenta pozitivnih ćelija, prosečnog intenziteta bojenja jedara, površini preseka jedara i kvantitativnog ER skora u odnosu na klasični i pleomorfni podtip lobularnog karcinoma. Nije postojala signifikantna razlika u procentu pozitivnih ćelija dva najčešća podtipa (t test, $p>0,05$) sa malim efektom veličine (ispitivani su samo slučajevi pozitivnog ER skora klasičnog i pleomornog podtipa ILC-a). Uočena je signifikantna razlika u prosečnom intenzitetu bojenja jedara (t test, $p<0,01$) sa srednjim efektom veličine, površini preseka jedara (t test, $p<0,05$) sa malim efektom veličine i kvantitativnom ER skoru (t test, $p<0,05$) sa malim efektom veličine između ova dva podtipa lobularnog karcinoma (Tabela 38).

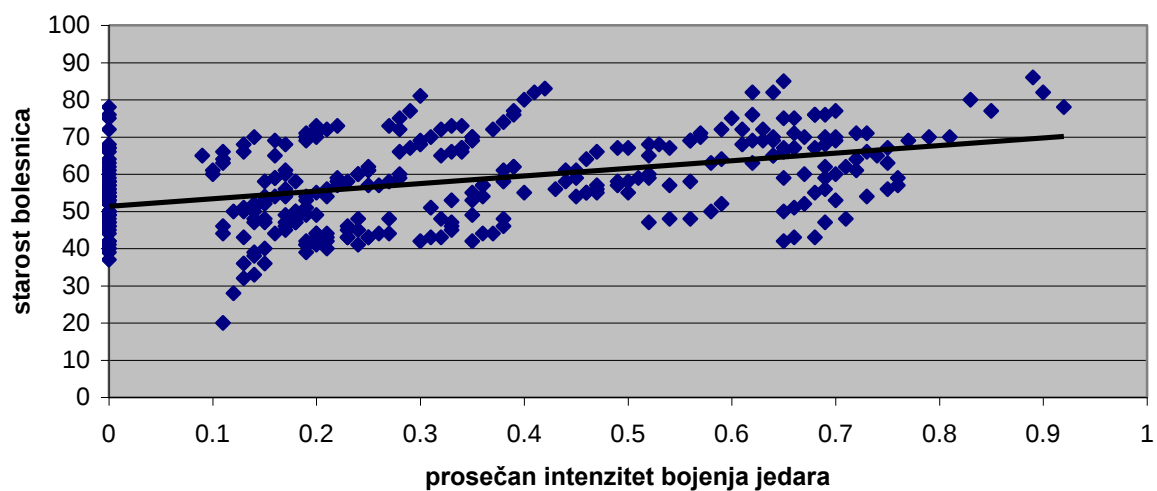
Tabela 38. Razlika u prosečnoj vrednosti procenta pozitivnih ćelija, prosečnog intenziteta bojenja jedara, površini preseka jedara i kvantitativnom ER skoru u odnosu na klasični i pleomorfni podtip lobularnog karcinoma

parametar	$\bar{X} \pm SD$		p	d
	klasični	pleomorfni		
procenat pozitivnih ćelija	60,06±39,59	72,44±42,69	0,0968	0,3007
prosečan intenzitet	0,32±0,23	0,44±0,31	0,0083	0,439
površina preseka jedara (μm^2)	25,27±8,12	28,58±12,05	0,0167	0,3221
kvantitativni ER skor	46,43±30,23	58,31±35,92	0,0405	0,3578

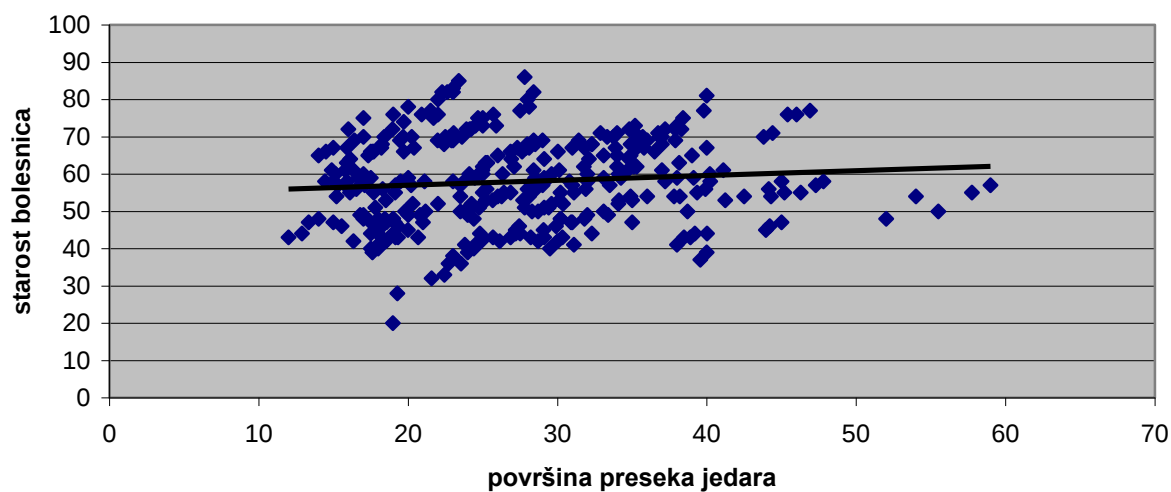
Postoji signifikantna pozitivna korelacija između starosti bolesnica i procenta ER pozitivnih ćelija, prosečnog intenziteta bojenja jedara, površine preseka jedara i kvantitativnog ER skora ($p < 0,001$). Za ispitivane parametre: procenat pozitivnih ćelija, prosečan intenzitet i kvantitativni ER skor dobijen je statistički značajan porast sa velikm efektom veličine dok je za površinu preseka jedara statistički značajan porast bio sa malim efektom veličine (Tabela 39) (Grafikoni 28 i 29).

Tabela 39. Korelacija između starosti bolesnica i procenta ER pozitivnih ćelija, prosečnog intenziteta bojenja jedara, površine preseka jedara i kvantitativnog ER skora

parametar	r	p	d
procenat pozitivnih ćelija	0,403	<0,001	0,8806
prosečan intenzitet	0,389	<0,001	0,8445
površina preseka jedara (μm^2)	0,116	0,035	0,2335
kvantitativni ER skor	0,406	<0,001	0,8885

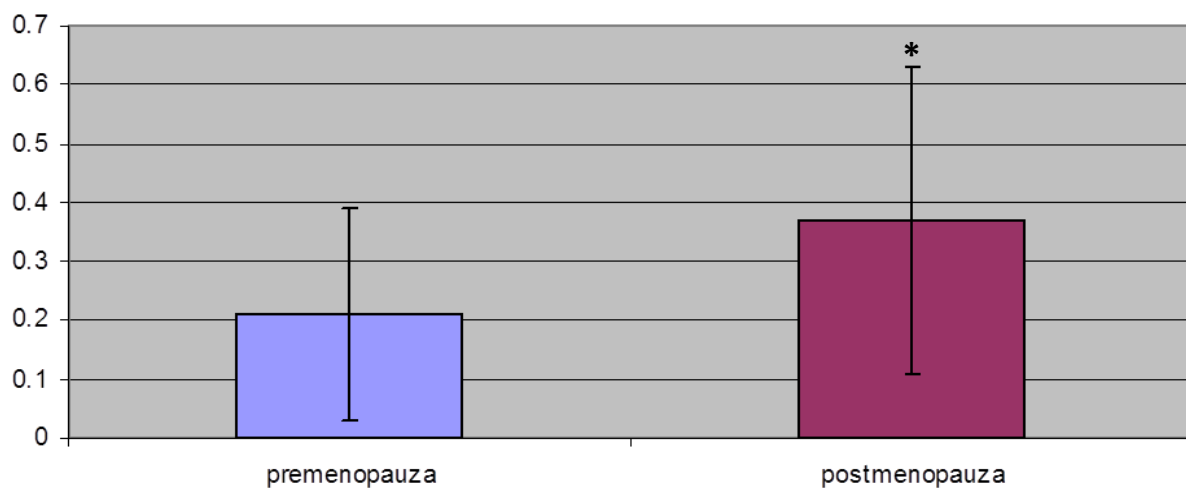


Grafikon 28. Korelacija starosti bolesnica i prosečnog intenziteta bojenja jedara

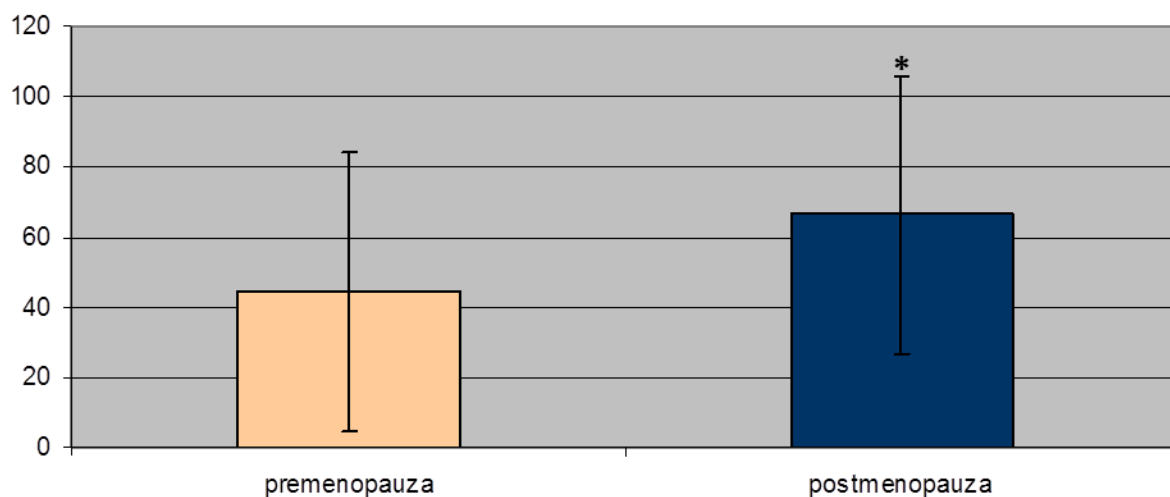


Grafikon 29. Korelacija starosti bolesnica i površine preseka jedara

Postoji signifikantna razlika u prosečnom intenzitetu bojenja jedara i procentu ER pozitivnih ćelija između premenopauzalnih i postmenopauzalnih bolesnica (t test, $p < 0,05$) (Grafikoni 30 i 31).



Grafikon 30. Razlika u prosečnom intenzitetu bojenja jedara bolesnica u premenopauzi i postmenopauzi; postojanje statistički značajne razlike prikazano je (*) za $p < 0,05$



Grafikon 31. Razlika u procentu ER pozitivnih ćelija bolesnica u premenopauzi i postmenopauzi; postojanje statistički značajne razlike prikazano je (*) za $p < 0,05$

Nije nađena statistički signifikantna korelacija između pT stadijuma tumora i ispitivanih parametara prikazanih u tabeli 40, a efekat veličine dobijenih vrednosti je bio mali.

Tabela 40. Korelacija između pT stadijuma tumora i procenta ER pozitivnih ćelija, prosečnog intenziteta bojenja jedara, površine preseka jedara i kvantitativnog ER skora

parametar	r	p	d
procenat pozitivnih ćelija	-0,013	0,832	0,026
prosečan intenzitet	-0,026	0,676	0,052
površina preseka jedara (μm^2)	0,120	0,051	0,024
kvantitativni ER skor	-0,041	0,504	0,082

Takođe je ispitana i razlika u prosečnoj vrednosti procenta ER pozitivnih ćelija, prosečnog intenziteta bojenja jedara, površine preseka jedara i kvantitativnog ER skora u odnosu na multifokalnost/multicentričnost (mf/mc) lobularnog karcinoma. Postoji signifikantna razlika prosečne nuklearne aree u odnosu na mf/mc lobularnog karcinoma (t test, $p < 0,05$). Multifokalni/multicentrični ILC-i imaju značajno veću prosečnu površinu preseka jedara u odnosu na lobularne karcinome bez multicentričnosti/multifokalnosti, ali je razlika sa malim efektom veličine ($d = 0,327$) (Tabela 41).

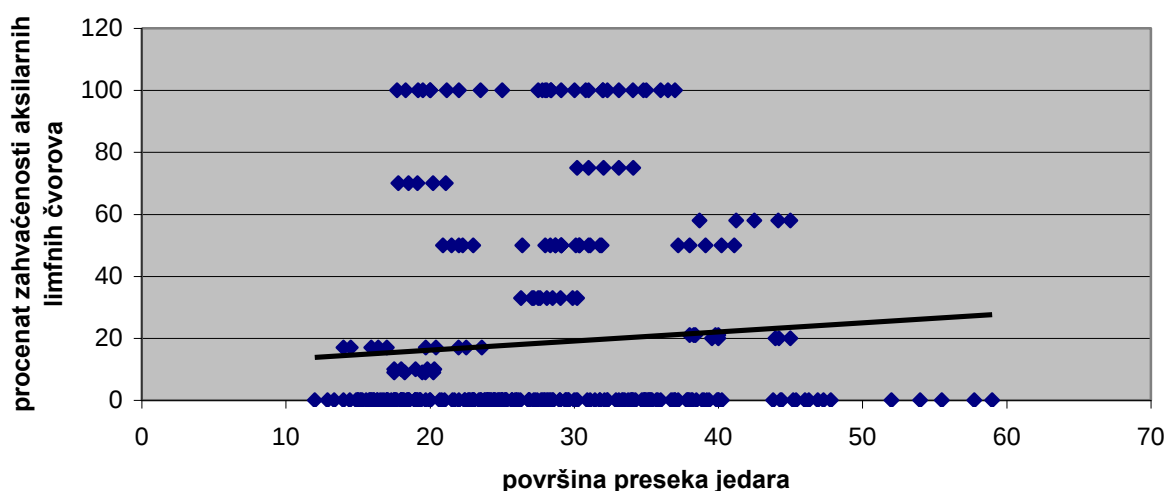
Tabela 41. Razlika u prosečnoj vrednosti procenta ER pozitivnih ćelija, prosečnog intenziteta bojenja jedara, površine preseka jedara i kvantitativnog ER skora u odnosu na multifokalnost/multicentričnost tumora

parametar	$\bar{X} \pm SD$		t	p	d
	mf/mc prisutna	mf/mc odsutna			
procenat pozitivnih ćelija	60,94±36,98	58,88±41,54	0,354	0,724	0,0523
prosečan intenzitet	0,34±0,21	0,32±0,26	0,401	0,689	0,0846
površina preseka jedara (μm^2)	30,19±10,05	27,09±8,87	2,394	0,017	0,327
kvantitativni ER skor	47,41±27,68	45,61±32,47	0,399	0,69	0,0596

Postoji signifikantna pozitivna korelacija između procenta zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova i površine preseka jedara ($p < 0,05$), a statistički značajan porast je sa malim efektom veličine ($d = 0,2601$) (Tabela 42) (Grafikon 32). Procenat ER pozitivnih ćelija, prosečni intenzitet bojenja jedara i kvantitativni ER skor ne pokazuju statistički značajnu korelaciju prema procentu zahvaćenosti aksilarnih limfnih nodusa ($p > 0,05$) (Tabela 42).

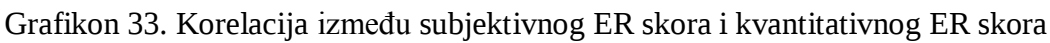
Tabela 42. Korelacija između procenta zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova i procenta ER pozitivnih ćelija, prosečnog intenziteta bojenja jedara, površine preseka jedara i kvantitativnog ER skora

parametar	r	p	d
procenat pozitivnih ćelija	0,039	0,474	0,078
prosečan intenzitet	0,025	0,643	0,05
površina preseka jedara (μm^2)	0,129	0,018	0,2601
kvantitativni ER skor	0,037	0,504	0,074



Grafikon 32. Korelacija između procenta zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova i površine preseka jedara

Urađena je i korelacija između subjektivnog semikvantitativnog ER skora i kvantitativnog ER skora. Postoji signifikantna pozitivna korelacija između subjektivnog semikvantitativnog ER skora i kvantitativnog ER skora ($r=0.886$, $p<0,001$), a statistički značajan porast je sa velikim efektom veličine ($d=3,8215$) (Grafikon 33).



6. DISKUSIJA

Lobularni karcinom "in situ" (LCIS) je opisan kao mikroskopska promena koja ne formira palpabilni tumor.¹⁸ O učestalosti LCIS-a ima malo podataka, *a u ovoj studiji ona je iznosila 2,1%*. Uglavnom se javlja kod žena u perimenopauzi,²¹ u 10-12% slučajeva je nađen kod postmenopauzalnih bolesnica,²² dok neki autori sopštavaju da je taj procenat veći u postmenopauzalnih žena i iznosi 25%.²³ *U ovoj studiji prosečna starost bolesnica sa LCIS-om je bila 45,28±8,62 godina*, što je u skladu sa literaturnim podacima da se LCIS kao izolovana promena retko javlja kod žena mlađih od 35 ili starijih od 75 godina.²⁴

Zahvatanje intralobularnih i ekstralobularnih struktura od strane LCIS-a je uobičajeno kao širenje u acinuse unutar lobula i duž terminalnih duktusa. Ekstralobularno širenje LCIS-a u epitelu duktusa i duktula opisano je kao pedžetoidno širenje, a javlja se u 65-78% bolesnica.^{41,43,44} *U većine analiziranih bolesnica (71,42%) sa LCIS-om je nađeno širenje u ekstralobularne strukture*. Jedina manifestacija LCIS-a kod postmenopauzalnih žena može biti pedžetoidno širenje duž terminalnih duktusa.^{43,45} U literaturi je pokazano da nema razlika u prosečnoj starosti bolesnica sa i bez pedžetoidnog širenja LCIS-a.⁴⁶ Solidna tumorska masa se formira kod izraženog širenja LCIS-a u duktuse, pri čemu popunjava i proširuje lumen duktusa. U takvim slučajevima može da se razvije centralna nekroza i polja kalcifikacije, koji su vidljivi na mamogramu.⁵⁰

Najveći broj slučajeva invazivnog lobularnog karcinoma (ILC) se prikazuje kao neupadljiva masa, dok u nekim slučajevima jedini dokaz neoplazme je nejasna rezistentna masa sa ili bez sitne difuzne noduliranosti. Od makroskopskih karakteristika, u prilog ILC-a, istaknuto je pet mamografskih nalaza: 1) asimetrična gustina bez jasnih margina; 2) gusta nazubljena masa; 3) čvrsta dojka bez očiglednog tumora; 4) mikrokalcifikati i 5) diskretna okrugla masa.⁸⁹

Podaci studije žena sa invazivnim karcinomom dojke dijagnostikovane u periodu od 1987. do 1999. godine, pokazali su da je incidencija invazivnog lobularnog karcinoma porasla tokom ovog perioda.⁷⁰ Lobularni karcinom je bio najučestaliji kod žena starijih od 50 godina.⁷⁰ *Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je prosečna starost bolesnica bila*

57,58±11,8 godina. Neke ranije studije su pokazale da se invazivni lobularni karcinom pretežno javlja kod bolesnica mlađe životne dobi.⁷²

Postoje saopštenja da su bolesnice sa klasičnim invazivnim lobularnim karcinomom mlađe životne dobi nego bolesnice sa drugim podtipovima invazivnog lobularnog karcinoma,^{68,72,76} što je u ovoj studiji pokazano samo za alveolarni podtip (65±11,53) i mešoviti lobularni podtip (61,76±12,12), ali ne i za solidni podtip (44,8±10,26), tubulolobularni podtip (51,4±10,36) i pleomorfni podtip (57,48±13,65).

Pojedini podtipovi ILC-a (alveolarni, solidni i tubulolobularni) su relativno retki u odnosu na celu grupu tumora, što je i pokazala studija 230 bolesnica sa ILC-om, gde je 176 (77%) bolesnica imalo klasični podtip ILC-a, a 54 (23%) bolesnice sve ostale podtipove ILC-a,⁷² dok je procentualna zastupljenost klasičnog ILC-a u ovoj studiji (334 bolesnice) bila nešto manja i iznosila je 73,1%, što uz određenu vremensku distancu (20 godina) govori o blago povećanoj incidenciji podtipova ILC-a. U spomenutoj studiji sa 230 bolesnica nisu nađene kliničke razlike između klasičnog ILC-a i pojedinih podtipova ILC-a,⁷² a u ovoj studiji razlike su bile prisutne, ali ne i statistički značajne. Tako klasični ILC nije makroskopski izgledao kao uobičen tumor u 49 (20,08%) slučajeva, a pleomorfni ILC u 8 (15,09%) slučajeva. Međutim, kod „in situ“ lobularnog karcinoma dojke statistički značajno češće (57,14%) pT stadijum nije mogao da bude makroskopski određen ($p=0,0273$).

Invazivni lobularni karcinomi većinom imaju linearni način rasta duž stromalnih snopova kolagenih vlakana formirajući tzv. „indian files“. Linearni rast se često viđa oko očuvanih struktura, kao što su duktusi dajući sliku vrtloga ili mete ("target"). Ovakav način rasta sa ćelijama relativno malih ujednačenih jedara predstavlja klasični oblik ILC-a.^{69,170} Ćelije invazivnog lobularnog karcinoma dojke nemaju uvek linearni način rasta, a takvi karcinomi se označavaju kao podtipovi invazivnog lobularnog karcinoma dojke. Analizirani ILC-i su u 133 (39,82%) slučajeva pokazali nelinearni način rasta, a bili su histološkog gradusa III. Podtipovi ILC-a mogu da imaju (u potpunosti ili delimično) ćelije koje su veće od ćelija klasičnog ILC-a, sa obilnijom eozinofilnom citoplazmom i hiperhromnim ekscentrično postavljenim jedrima. U literaturi su takve ćelije opisane različito: kao plazmocitolike, mioidne,⁷² histiocitoidne^{179,180} i pleomorfne ćelije invazivnog lobularnog karcinoma.^{181,182} Učestalost nuklearnog gradusa III od 29,64% u

svim analiziranim slučajevima ILC-a, sa zastupljenošću od 15,9% pleomorfnih ILC-a, ukazuje da pleomorfni podtip ILC-a ima često, ali ne uvek, velika jedra. Čelije tada imaju izražene nukleoluse i obilniju citoplazmu (izgled makrofaga), što je u pojedinim radovima opisano kao histiocitoidna forma pleomornog podtipa ILC-a.¹⁸⁵ Veći broj pleomorfnih ILC-a ima linearni način rasta, kao klasični ILC. Sa druge strane njihov način rasta može da bude izrazito mešovito, a pleomorfizam jedara posebno se ističe u delovima tumora koji imaju alveolarni ili solidni način rasta.

Pojedini autori saopštili su da ne postoje statistički značajne razlike u prosečnoj starosti ili u veličini tumora između žena sa klasičnim ILC-om i žena sa solidnim podtipom ILC-a, i da se solidni način rasta zapaža u 41% (9 od 22) ILC-a.¹⁹² Obzirom na vrlo mali broj analiziranih slučajeva ovakvi podaci ne mogu da budu relevantni.

Kada pojedini radovi opisuju nelinearni način rasta, u smislu rasutih tumorskih ćelija u stromi, daju obeležja posebnom disperznom (rasutom) podtipu ILC-a. Kod ovog podtipa postoje slabo ograničena područja neupadljivih ćelija ILC-a, koje se mogu pomešati sa zapaljenjskim ćelijama, koje su takođe rasute u kolagenoj stromi.²⁸ *Izraženi elementi nelinearnog rasta (disolucije tumorske mase) sa većim međusobnim rastojanjem tumorskih ćelija od uobičajenog, uočeni su samo u 16 (4,79%) slučajeva, ali je takav nelinearni način rasta bio prisutan isključivo kod 15 (28,3%) slučajeva pleomornog podtipa ILC-a i samo u jednom slučaju (5,8%) mešovitog lobularnog podtipa ILC-a. Statistički značajna povezanost disolucije tumorske mase i podtipova ILC-a ($p < 0,0000001$), jasno izdvaja pleomorfni podtip ILC-a kao zaseban entitet u pogledu načina rasta.*

Invazivni lobularni karcinomi češće pokazuju duktularno širenje i sklonost ka multicentričnosti, koja se manifestuje: 1) većom učestalošću bilateralnosti, 1) većom veličinom tumora i 3) mikroskopskom multifokalnošću.⁷²

Prevalencija multicentričnih karcinoma dojke predmet je brojnih diskusija, a saopštena učestalost varira od 4 do 65% slučajeva.⁹² Osim toga, saopšteno je da se multifokalni karcinom dojke javlja u približno 60% slučajeva karcinoma dojke, i da 4-5% bolesnica sa karcinomom dojke već imaju bilateralni karcinom dojke u vreme dijagnoze.⁹² Nasuprot zapažanju da bolesnice sa invazivnim lobularnim karcinomom imaju izuzetno veliki rizik od bilateralnog karcinoma dojke u poređenju sa bolesnicama

sa drugim tipovima karcinoma dojke,¹⁰⁴ u ovoj studiji bilateralni lobularni karcinom je bio prisutan samo u 2 (0,6%) slučajeva. Pojedini podaci ukazuju da je učestalost bilateralnosti veća kod bolesnica sa klasičnim invazivnim lobularnim karcinomima u odnosu na bolesnice sa različitim podtipovima ILC-a,¹⁰⁶ što se razlikuje od nalaza ove studije, gde statistički značajna razlika između klasičnog i pleomorfnog podtipa lobularnog karcinoma nije nađena u odnosu na multifokalnost, multicentričnost i bilateralnost ILC-a ($p>0,05$).

Klasifikacija karcinoma dojke kao multicentrični ili multifokalni bazirana je na pretpostavci da se karcinomi koji se razvijaju u jednom kvadrantu dojke vrlo verovatno razvijaju iz istih duktalnih struktura, za razliku od onih koji se razvijaju u anatomski odvojenim oblastima dojke. Istorijska definicija multicentričnog karcinoma dojke označava dva ili više karcinoma koji se razvijaju u različitim kvadrantima dojke. To je tema brojnih polemika, pa Cheattle i saradnici opisuju multicentrični karcinom dojke kao dva ili više karcinoma odvojenih normalnim tkivom dojke,⁹² a koristi se i definicija da su to dva ili više karcinoma razdvojena sa više od 5mm normalnog tkiva dojke.⁹⁵ Nasuprot tome, multifokalni karcinom dojke se odnosi na dva polja karcinoma dojke, koji se razvijaju u istom kvadrantu dojke. Definicije su problematične pošto su "kvadranti" dojke dogovorne spoljašnje oznake, bez ikakve unutrašnje veze. Osim toga, ove definicije mogu da označavaju različite lezije, a da budu klasifikovane različito, samo na osnovu lokalizacije u dojci ili veličine dojke. Na primer, dve lezije udaljene na 2cm na "10h" i "1h" mogu da budu klasifikovane kao multicentrične zato što su smeštene u gornje-spoljnom i gornje-unutrašnjem kvadrantu, dok se dve lezije na "10h" i "3h" mogu da klasifikuju kao multifokalne.⁹²

Da li multicentrični karcinom dojke nastaje kao rezultat širenja jednog karcinoma kroz dojkicu ili je to više različitih karcinoma koji se istovremeno razvijaju, ključno je pitanje mnogih istraživanja. Pokazano je da većina multicentričnih karcinoma dojke vode poreklo od istih ćelija.⁹⁷ I druge studije pokazuju da se većina multicentričnih karcinoma razvija iz istih ćelija, a da termini multicentrični i multifokalni ne ukazuju na dva biološki različita procesa. Generalno gledano, multifokalnost označava promene koje su u većoj blizini, nego one koje su označene kao multicentrične, što nema značaja jer je terapeutsko razmatranje oba pojma identično.⁹²

Multicentrični karcinom je relativno redak klinički nalaz. Koida i saradnici našli su da samo 5% od 1334 bolesnica ima multicentrični karcinom (viđenih u 25-godišnjem periodu).⁹² Morrow je zapazio multicentrični ili multifokalni karcinom kod 39 od 432 (9%) bolesnica u periodu od 1988-1993. U studijama sa korišćenjem standardnih kliničkih tehnika ispitivanja tkiva dojke, nađeno je da se multicentrični karcinomi javljaju u manje od 10% slučajeva,⁴²⁹ što je pokazano i u ovom istraživanju sa učestalošću od 4,5% multicentričnih ILC-a, i 3% multifokalnih ILC-a. Ukupna učestalost multifokalnih, multicentričnih i bilateralnih ILC-a je bila 8,1% (27), što je manje od 10% saopštene sveobuhvatne učestalosti. Međutim, neke studije su saopštile znatno veću učestalost multifokalnih/multicentričnih karcinoma. Qualheim i Gall su ispitivanjem 157 mastektomijskih uzoraka utvrdili da 54% sadrži multipne fokuse karcinoma.⁹² Ovakve rezultate treba pažljivo sagledavati, obzirom da incidencija multicentričnih i multifokalnih karcinoma značajno varira zavisno od definicije koja se koristi, širine patološkog uzorka tkiva dojke, i činjenice da li je "in situ" promena smatrana dokazom multicentričnosti.⁹² U tom kontekstu učestalost multifokalnosti/multicentričnosti lobularnih karcinoma kod analiziranih bolesnica je bila veća i iznosila je 20,35% tj. svaki peti invazivni lobularni karcinom je imao multifokalni ili multicentrični način rasta. Iako postoje publikacije koje govore o globalnoj incidenciji multicentričnosti i multifokalnosti, sa zapaženom nesignifikantno većom incidencijom multicentričnih karcinoma kod premenopauzalnih bolesnica sa karcinomom dojke,⁹⁴⁻⁹⁶ ova studija je pokazala da postoji statistički značajna razlika i u prosečnoj starosti između bolesnica sa multifokalnim, multicentričnim i bilateralnim lobularnim karcinomom ($p < 0,05$). Naknadna ("post hoc") analiza izdvojila je grupu bolesnica sa bilateralnim ILC-om kao statistički značajno mlađe u odnosu na bolesnice sa multifokalnim i multicentričnim lobularnim karcinomima, kao i na ostale bolesnice bez prisutne multifokalnosti/multicentričnosti ($p < 0,0001$). Ukoliko je definicijom multicentričnosti/multifokalnosti ILC-a smatrano i fokalno prisustvo "in situ" promena,⁹² takođe je uočena statistički signifikantna razlika u prosečnoj starosti bolesnica sa i bez prisutne multifokalnosti/multicentričnosti ($p < 0,01$).

Klinički značaj LCIS-a je predmet brojnih diskusija, zbog češćeg sinhronog javljanja sa ILC-om i zbog pojave u mlađih osoba. Retrospektivnom studijom utvrđeno je

da LCIS postoji u 17%, a ILC u 3% kontralateralnih profilaktičkih mastektomija.¹¹⁰ Pojava kontralateralnog invazivnog karcinoma izvesnija je kod bolesnica sa multicentričnim invazivnim karcinomom ipsilateralne dojke.²⁸

Saopštenja o učestalosti LCIS-a sa klasičnim ILC-om znatno variraju. Newman je jedan od prvih autora koji je objavio da se LCIS nalazi u 98% ILC-a (72 od 73).¹⁷ Kasnije je saopšteno da je koegzistirajući LCIS nađen u 10 od 22 (45%) slučajeva.¹⁹² Di Constanzo i saradnici su detektovali LCIS u 65% slučajeva (od 176) klasičnog ILC-a i u 57% (od 54) slučajeva podtipova ILC-a. U nekim manjim serijama klasičnog ILC-a, LCIS komponenta je nađena u 31%⁴⁴, 45%⁴² i 87%³⁰ slučajeva. *U analiziranom materijalu (334 bolesnice) prisustvo fokalnih "in situ" promena je verifikovano kod 41 bolesnice (12,27%) i to LCIS-a kod 19 (5,7%) bolesnica, dok je fokalni DCIS nađen kod 22 (6,6%) bolesnice.* U kasnijim serijama proliferativne lezije opisane kao atipična lobularna hiperplazija i LCIS su grupisane zajedno. Ovi autori takođe su saopštili udruženost LCIS-a u 56% podtipova ILC-a,⁶⁸ *a analizom odnosa između klasičnog i pleomorfog podtipa ILC-a u odnosu na fokalno prisustvo LCIS-a, kao i na fokalno prisustvo DCIS-a, nisu nađene statistički značajne razlike ($p>0,05$)* Studija 38 ILC-a, uključujući i podtipove označene kao tubularne i solidne otkrila je prisustvo LCIS-a u 86% slučajeva.²⁸

Kako je u ovoj studiji uočeno da su bolesnice sa fokalnim LCIS-om statistički značajno mlađe životne dobi, fokalni LCIS bi mogao da se smatra sastavnim delom definicije multifokalnosti/multicentričnosti, u prilog čemu govori i nalaz da su bolesnice sa prisutnom multifokalnošću/multicentričnošću takođe statistički značajno mlađe ($p<0,01$). Međutim, statistički značajne razlike u prosečnoj starosti između bolesnica sa i bez fokalnog DCIS-a nisu uočene ($p>0,05$).

Dezmoplazija se karakteriše prisustvom kolagenih vlakana, miofibroblasta, mezenhimalnih ćelija pomešanih sa glatko mišićnim ćelijama i fibroblastima.¹⁴⁵

Studija dezmoplastičnog odgovora kod invazivnih karcinoma dojke može da bude korisna u razumevanju molekularne biologije pojedinih tipova karcinoma dojke, kao što je invazivni duktalni karcinom dojke karakterističan po izraženoj stromalnoj reakciji, mada je izgled stromalnog odgovora isti i kod invazivnog lobularnog karcinoma dojke.¹⁶⁴ *Dezmoplastična reakcija strome je u ovoj studiji uočena kod 31 (9,28%) bolesnice sa*

ILC-om. Klasični ILC-i su bili dezoplastični u 9,01% slučajeva, pleomorfni ILC-i u 7,54% slučajeva, a mešoviti lobularni podtip ILC-a u 5,88% slučajeva i te razlike su bile statistički značajne ($p < 0,05$).

Ekspresija verzikana i drugih matriksnih proteoglikana, kao što su tenascin, fibronektin i integrini su proučavani u patologiji dojke, a detektovani su u dezoplastičnoj stromi oko invazivnih i preinvazivnih promena u dojci.⁴⁷²⁻⁴⁷⁵ Za verzikan i tenascin koji mogu da se detektuju imunohistohemijski u peritumorskoj stromi dojke, utvrđeno je da imaju prognostički značaj.^{476,477} Imunohistohemijske studije strome ILC-a donele su neka interesantna zapažanja. Fibronektin je nekolageni glikoprotein udružen sa bazalnom membranom kao i intersticijalnim kolagenom. Povećanje fibronektina tipično se nalazi u stromi mnogih malignih tumora.^{478,479} Istovremeno sa smanjenjem drugih činilaca bazalne membrane, kao što je laminin i kolagen tip 4, zapažen je gubitak fibronektina oko tumorskih ćelija.⁴⁷⁹ Fibronektin izrazito opada kod ILC-a, naročito kod tumora sa klasičnim načinom rasta.⁴⁷⁹ Bojenje na fibronektin je očuvano u bazalnim membranama oko LCIS-a udruženog sa ILC-om. Zbog činjenice da fibronektini doprinose ćelijskoj adheziji,⁴⁷⁹ manjak ovog glikoproteina u stromi ILC-a može da uslovi linearni ili disperzni načina rasta, *što može da se dovede u vezu sa rezultatima ove studije, jer je nešto veći broj dezoplastičnih lobularnih karcinoma bio prisutan u grupi ILC-a sa klasičnim načinom rasta (9,01%) u odnosu na pleomorfni podtip ILC-a (7,54%) i mešoviti lobularni podtip ILC-a (5,88%) ($p > 0,05$).*

Za razliku od LCIS-a gde postoji linearna imunohistohemijska distribucija verzikana oko lobularnih struktura, mikroinvazivni fokusi pokazuju naglu promenu u distribuciji verzikana, koja je difuznog karaktera u dezoplastičnoj stromi ILC-a.¹⁵⁶

Mada je indukcija dezoplastičnog odgovora strome još uvek slabo objašnjena sa nekoliko predloženih mehanizama,^{480,481} novije studije su pokazale da i prekomerna ekspresija vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) takođe utiče na pojačanje dezoplastičnog odgovora u primarnim tumorima dojke.⁴⁸² Posebno kod ER pozitivnih karcinoma dojke prekomerna ekspresija VEGF-a pojačava tumorsko-stromalne interakcije i olakšava da se stroma prilagodi i omogući metastaziranje, čak i u slučaju tretmana tamoxifenom.⁴⁸²

U studiji ćelijskih kultura karcinoma dojke se pokazalo da su tumori koji su se razvili uz prisustvo estrogena lišeni tumorske strome. Sa druge strane, u odsustvu estrogena, tumorski rast je bio značajno slabiji u svim ispitivanim ćelijskim kulturama, a u jednoj od njih je uočena značajna tumorska dezmoplazija.¹⁴⁹

Shvatanje dezmoplastičnog odgovora strome kod invazivnih karcinoma dojke u narednim studijama moglo bi pomoći u pronalaženju novih ciljeva u kliničkoj "image" i patohistološkoj dijagnostici, serološkoj dijagnostici i razvoju lekova.

Odavno je saopšteno da invazivni lobularni karcinomi imaju identičnu reakciju strome kao i invazivni duktalni karcinomi,¹⁶⁴ a poznato je da fibroblasti i glatkomišićne ćelije mogu da produkuju elastična vlakana.^{167,168} Elastoza može da bude difuznog tipa ili češće tzv. "kolapsnog" tipa, a predstavlja novoformirana elastična vlakna u interlobularnoj stromi oko duktusa.¹³⁵ Za razliku od normalnih dojki, gde je nekoliko elastičnih vlakana okruženo kolagenim vlaknima, u "kolapsnom" tipu gomilanja elastičnih vlakana glavnu ulogu imaju kolagena vlakna. *Postojanje elastoze "kolapsnog tipa" je uočeno samo u 7 (2,09%) slučajeva analiziranih ILC-a.*

Obzirom da se dojka u potpunosti razvija unutar superficijalne fascije kože, celokupno tkivo dojke i koža koja ga prekriva funkcionalno pripadaju jednoj limfatičnoj jedinici,³ a limfatična drenaža cele dojke, bez obzira na kvadrant dojke, ide zajedničkim limfaticima.²¹⁴

Di Costanzo i saradnici su prikazali studiju 230 bolesnica sa stadijumom I i II ILC-a prethodno mastektomiranih sa aksilarnom disekcijom. Analiza je obuhvatila 176 bolesnica sa klasičnim ILC-om i 54 bolesnice sa različitim podtipovima ILC-a (10 solidnih, 14 alveolarnih i 30 mešovutih). Ovi autori su saopštili da su žene sa klasičnim ILC-om značajnije mlađe u vreme postavljanja dijagnoze (52 godine u odnosu na 57 godina), što proširuje interesovanja za procenu biološke agresivnosti podtipova lobularnog karcinoma dojke. Grupe žena se nisu razlikovale značajno u veličini tumora, statusu limfnih nodusa ili pT stadijumu,⁷² *što je u saglasnosti sa rezultatima ove studije da ne postoji statistički značajna povezanost nijednog podtipa invazivnog lobularnog karcinoma dojke sa pT stadijumom tumora ($p > 0,05$), kao ni povezanost podtipova ILC-a i metastaza ILC-a u aksilarnim limfnim čvorovima ($p > 0,05$).*

Dve studije su se bavile upoređivanjem bolesnica sa čistim lobularnim, mešovitim duktulo-lobularnim i nelobularnim karcinomima. Jedna studija je pokazala da bolesnice sa ILC-om imaju tumore većeg promera, ali istovremeno najnižu učestalost metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima,⁴²⁴ a u ovoj studiji zastupljenost je iznosila 27%, pri čemu nisu nađene statistički signifikantne razlike u prosečnoj starosti između bolesnica sa i bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima ($p>0,05$). Tri grupe se nisu značajno razlikovale u pogledu opšteg preživljavanja, lokoregionalnog širenja ili udaljenih metastaza. Pacijentkinje sa ILC-om imale su značajno nižu učestalost plućnih metastaza, a veću učestalost metastaza u kostima. Komparacija prognoze pacijenatkinja sa ILC-om i IDC-om pokazala je značajno povoljniji konačni ishod u grupi lobularnih karcinoma.⁴⁸³

Najvažnije prognostičke determinante bolesnica sa ILC-om su veličina primarnog tumora i status limfnih čvorova.⁴⁸⁴ Analizom više od 15000 pacijenata u "Kolorado Tumor Registry" pokazano je da veličina tumora predstavlja najznačajniji pokazatelj metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima.⁴⁸⁵ Učestalost aksilarnih metastaza je skoro identična za bolesnice sa IDC-om i ILC-om, kada se uporede sa veličinom tumora. Kod žena sa ILC-om veličine do 2 cm, aksilarni limfni čvorovi su zahvaćeni u 25% slučajeva, a ukoliko je tumor bio 0,5 cm ili manji, učestalost aksilarnih metastaza iznosi 13%.⁴⁸⁵ *Analizirani lobularni karcinomi dojke veličine do 2cm su imali manju učestalost metastaza u limfnim čvorovima aksile od 16,84%, za razliku od lobularnih karcinoma dojke većih od 2cm, gde je učestalost metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima iznosila 34,85%. Razlika je bila statistički značajna ($p<0,01$).*

Frost je prikazao 92 bolesnice sa ILC-om koje su subklasifikovane prema histološkom načinu rasta. Nije postojala statistički značajna veza između arhitekture ILC-a (klasičnog, alveolarnog, solidnog i mešovitog) i prognoze.⁴¹⁷

U ovom istraživanju značajna statistička povezanost multifokalnosti, multicentričnosti i bilateralnosti lobularnog karcinoma u odnosu na prisustvo metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima nije utvrđena primenom Fisher-ovog testa ($p>0,05$), što je u suprotnosti sa malim brojem nalaza da bolesnice sa multifokalnim/multicentričnim karcinomom dojke imaju gori klinički ishod nego bolesnice sa unicentričnim karcinomom dojke, tretiranih na isti način.^{420,421}

Analizom podataka "Rhode Island Tumor Registry" od 1984. do 1994. godine, gde je obuhvaćeno 4886 žena sa IDC-om i ILC-om, dobijeno je da su žene sa ILC-om: statistički starije životne dobi u vreme postavljanja dijagnoze (64,5 godine u odnosu na 61,6 godina), sa većom veličinom tumora (28,6 mm u odnosu na 23,9 mm) i imaju skoro identičnu učestalost metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima (lobularni 33,4% u odnosu na duktalne 33,1%). Nije bilo signifikantnih razlika u incidenciji kontralateralnog karcinoma (lobularni 6,6% prema duktalnim 6,5%).⁴²⁸

Različite studije koje su se bavile prognozom bolesnica sa ILC-om nisu pokazale jasnu razliku u odnosu na bolesnice sa IDC-om tretirane mastektomijom, kada se uzme u obzir stadijum u vreme postavljanja dijagnoze. Mnoge studije ukazuju da bolesnice sa klasičnim ILC-om imaju bolju prognozu nego bolesnice sa nekim od podtipova ILC-a, ali razlike nisu bile statistički značajne. Malobrojne razlike u prognozi su prikazane među bolesnicama sa nepleomornim podtipovima, ali je evidentno da je veći broj slučajeva neophodan da bi se dokumentovale signifikantne razlike, ukoliko one postoje. Klasični ILC ima mnogo povoljniju prognozu od pleomorfne forme,¹⁸² a druge studije pokazuju da nema signifikantne razlike pleomornog podtipa u odnosu na klasični lobularni karcinom u pogledu globalnog preživljavanja.⁴¹⁸

Kako je desetogodišnje preživljavanje veće kod bolesnica sa ILC-om u pT1 i pT2 stadijumu (84%) u odnosu na bolesnice sa IDC-om (69%), od izuzetne je važnosti blagovremena detekcija i odstranjivanje potencijalno malignih i ranih malignih promena, što opravdava "screening" programe. Delimično povoljnija prognoza bolesnica sa lobularnim karcinomom je zapažena, ali razlike nisu statistički značajne, mada analiza nije uzela u obzir podtipove lobularnog karcinoma dojke.⁴⁸⁶

Određivanje biološke agresivnosti ILC-a je još uvek predmet polemika, te su neophodna savremena patohistološka, imunohistohemijska i kvantitativna ispitivanja.

Pojedine studije bolesnica sa različitim podtipovima ILC-a ne pokazuju suštinsku razliku u odnosu na godine života, veličinu tumora, način rasta, status limfnih čvorova i imunohistohemijsku ekspresiju hormonskih receptora.⁴¹⁷

Veza između ekspresije estrogenskih receptora i osetljivosti ćelija na estrogen i antiestrogen opsežno je proučavana u ćelijskim kulturama,⁴⁸⁷ na životinjskim modelima i kod žena⁴⁸⁸, što čini estrogen jednim od najznačajnijih terapijskih meta kod bolesnica sa

karcinomom dojke.^{442,445} Estrogen receptor Alfa (ER alfa) se smatra primarnim receptorom odgovornim za razvoj tumora dojke.

Neke studije saopštile su povećani rizik za razvoj karcinoma dojke kod osoba sa povećanim nivoom endogenog estrogena u krvi.²⁴⁹ U eksperimentima sa životinjama estrogen je dovodio do razvoja tumora dojke, a estrogeni mehanizmi su bili uključeni u svakoj fazi procesa karcinogeneze (inicijacija, promocija i progresija).⁴⁸⁹

Estrogen stimuliše rast i diferencijaciju dukalnog epitela i rast intralobularnog vezivnog tkiva.²⁵⁹ Terminalne duktulolobularne jedinice dojke mladih žena su mnogo osetljivije na estrogen, koji ima efekte na mikrocirkulaciju dojke slične histaminu, *a manja prosečna starost, ali ne i statistički značajna, je bila u ovoj studiji kod bolesnica sa ER negativnim receptorima ($p > 0,05$).*

Više od tri decenije, ER je najznačajniji biomarker određivan zbog tretmana karcinoma dojke, pre svega zbog značajne koristi koju obezbeđuje endokrina terapija za ER-pozitivne, ali ne i za ER-negativne tumore kod žena svih starosnih doba.^{490,491}

Imunohistohemijske analize koje su identifikovale ER receptore kao jedarne proteine i eksperimenti ćelijskih frakcija snažno su potvrdili takvo gledište. Signalizacija mehanizmima koji su opisani ranije označena je kao genomski signalni put.^{456,492} Međutim, poslednje laboratorijske studije koristile su kulture humanih ćelija karcinoma dojke i pokazale su da estrogen može da vrši signalizaciju kroz odvojeni, ne genomski put. U ovom slučaju, nađeno je da je estrogen u vezi sa membranom ćelija karcinoma dojke, a njegovi efekti posredovani su kaskadom tirozin kinaza i fosfataza, konačno aktiviranjem gena i modulacijom jedarnih transkripcionih faktora.⁴⁹³

Nuklearna imunoreaktivnost na hormonske receptore prisutna je u većini LCIS-a,⁵⁸⁻⁶⁰ *što je pokazano i u ovoj studiji u 85,71% slučajeva.* Pozitivnost estrogenskih i progesteronskih receptora je češće prisutna kod klasičnog LCIS-a sa niskim nuklearnim gradusom, a ređe se viđa kod pleomorfog LCIS-a.²⁸

Rezultati istraživanja pokazuju da su ispitivane imunofenotipske karakteristike invazivnih lobularnih karcinoma najbolje determinisane pozitivnošću ER receptora, a u manjoj meri ostalim imunohistohemijskim markerima. U analiziranim uzorcima bolesnica sa ILC-om, 83,12% klasičnih ILC-a je imalo pozitivne ER receptore, dok su kod pleomorfog podtipa oni bili pozitivni u 62,26% slučajeva, i ta razlika je bila

statistički značajna ($p=0,0044$). Svi solidni i tubulolobularni podtipovi ILC-a su imali pozitivne ER receptore, a kod mešovitog lobularnog podtipa procenat ER pozitivnih ILC-a je iznosio 76,47%. U nekim studijama je nađena visoka imunohistohemijska ekspresija estrogenskih receptora i kod alveolarnog podtipa ILC-a, a za taj podtip je karakterističan i visok nivo progesteronskih receptora (PR),^{106,278} što je rezultatima u ovoj studiji potvrđeno samo za ER receptore.

Pozitivnost PR receptora obezbeđuje dodatni prediktivni značaj, nezavisno od vrednosti ER receptora.^{285,287,288} Dok je malo verovatno da je gen koji kodira PR receptor estrogen zavisna, otkrivanje intaktnog estrogen-ER-receptor zavisnog puta,²⁷³ dovelo je do potrebe razmatranja koncepta da mali procenat bolesnica sa ER-/PR+ karcinomima dojke može da ima adekvatan odgovor na endokrinu terapiju.^{274,275} Iako je u brojnim publikacijama poništen prediktivni značaj PR receptora za korist od antiestrogene terapije,²⁷⁰⁻²⁷³ ipak ovi dokazi zajedno sa prognostičkim informacijama, pokazuju dovoljan klinički značaj za rutinsko merenje PR receptora.^{274,275} Ova studija nije pokazala statistički značajnu razliku u prosečnoj starosti bolesnica sa pozitivnim i negativnim PR skorom ($p>0,05$).

Da se imunohistohemijski profil pleomorfnog podtipa ILC-a značajno razlikuje od klasičnog ILC-a, pretežno gubitkom ekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora,^{183,184} potvrđeno je i ovom analizom pozitivnosti PR receptora u 50,94% pleomorfnog ILC-a i 71,25% klasičnog ILC-a, uz statistički značajnu razliku ($p=0,0057$). Mala učestalost imunoreaktivnosti na ER i PR kod pleomorfnih ILC-a pokazana je i drugim studijama¹⁸⁰, uz heterogenu imunohistohemijsku reaktivnost za ER, a opet smanjenu ili odsutnu ekspresiju ER i PR receptora.¹⁸³

Imunohistohemijska analiza ekspresije ER receptora je pokazala da je pozitivan ER skor statistički značajno češće bio prisutan kod bolesnica bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima (82,78%) nego kod bolesnica sa metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima (71,91%) ($p=0,0316$). Međutim, statistički značajna razlika nije dobijena analizom odnosa pozitivnosti PR receptora i metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima ($p>0,05$).

HER-2 receptor je strukturno vrlo sličan receptoru za epidermalni faktor rasta, a član je velike familije membranskih receptora za faktore rasta. HER 2 (HER 2 ili c-erbB

2) je jedan od četiri homologna člana familije receptora za humani epidermalni faktor rasta.^{317,319,320} HER 2 receptori su transmembranski receptori koji su uključeni u ćelijski rast i diferencijaciju.^{324,325} Amplifikacija HER 2 gena se javlja kao početni događaj koji je okidač onkogene aktivnosti HER 2 kod tumora čoveka. HER 2 genska amplifikacija dovodi do povećane transkripcije HER 2 gena i posledično preterane ekspresije HER 2 receptora.

HER 2 je tirozin-kinazni receptor (p185) uključen u signalne procese proliferacije, antiapoptoze, adhezije i angiogeneze. HER 2 genska amplifikacija se sreće u 5-30% svih tumora, a kod tumora dojke u 20-30% slučajeva. Amplifikacija HER 2 gena i/ili prekomerna ekspresija HER 2 receptora je udružena sa onkogenom transformacijom, lošom prognozom i agresivnijim tokom kod karcinoma dojke.³²⁶⁻³²⁸ Aktivacione mutacije su retkost.^{319,328} Familija HER receptora ima četiri člana sa različitim osobinama i važnim ulogama, kako u embrionalnom razviću, tako i u adultnim tkivima. HER 2 je receptor za nepoznati ligand (moguće Heregulin), a u adultnim tkivima ima ulogu u lobuloalveolarnoj diferencijaciji i laktaciji.^{324,325} Za familiju HER receptora je karakteristična kombinovana dimerizacija za ligand zavisnu fiziološku signalizaciju. HER 2 monomer se može dimerizovati i sa drugim članovima familije HER receptora (HER 1, HER 3, HER 4), a obično se smatra heterodimerizacionim "partnerom sa prioritetom". U tim slučajevima može da dođe do: stvaranja sopstvenih deobnih signala ((epi)genetska nestabilnost), rezistencije na inhibitorne signale rasta (p53, Rb, p16), "izbegavanja" apoptoze, proliferacije bez ograničenja (telomerazna aktivnost).²⁴⁸

Ligandi kao što je Heregulin mogu da indukuju HER 2/HER 3 dimerizaciju i autofosforilaciju kod ligand zavisne aktivacije. Međutim, enormno povećanje gustine HER 2 receptora vodi autonomnoj ligand nezavisnoj signalizaciji koja uvodi u proliferaciju, antiapoptozu i neoangiogenezu.²⁴⁸

Rezultati 81 studije koje su obuhvatile 27161 bolesnicu,⁴⁹⁴ pokazali su da je HER 2 prekomerna ekspresija u 90% slučajeva udružena sa nepovoljnim ishodom. Multivarijantnom analizom je pokazano da je u 71% slučajeva HER 2 nezavisan faktor u pogledu ishoda u odnosu na druge varijable. Zato se HER 2 u međunarodnim "konsenzus vodičima" ocenjuje kao nezavisan faktor rizika.³⁶⁹ *Rezultati ove studije nisu pokazali*

statistički značajnu razliku u prosečnoj starosti bolesnica sa pozitivnim i negativnim HER-2 statusom ($p>0,05$).

Većina publikacija ističe prekomernu ekspresiju HER-2 onkoproteina kod pleomorfnog podtipa ILC-a, kao posebnu karakteristiku ovog podtipa u odnosu na klasični ILC.^{183,184} *Analizirani slučajevi pleomorfnog podtipa ILC-a su pokazali prekomernu ekspresiju HER-2 u 18,42% slučajeva, za razliku od klasičnih ILC-a koji su bili HER-2 pozitivni u 15,62% slučajeva, a razlika između njih nije bila statistički značajna ($p>0,05$). Ovakav nalaz može da ukaže na zajedničko histogenetsko poreklo ova dva podtipa ILC-a. Neznatne razlike u ekspresiji HER-2 receptora takođe govori u prilog tesne veze između ova dva podtipa lobularnog karcinoma.*

Različite tehnologije su dostupne da bi se odredio HER 2 status. Kada tumor pokazuje jaku HER 2 prekomernu ekspresiju ili amplifikaciju HER 2 gena, kaže se da ima pozitivan HER 2 status. Nekoliko većih studija je potvrdilo da je HER 2 pozitivan status povezan sa lošim kliničkim ishodom, naročito kod bolesnica sa metastazama u limfnim čvorovima.^{248,495-498} *Kod analiziranih slučajeva ILC-a, 18,52% bolesnica sa pozitivnim HER-2 statusom su imale metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima, a 14,61% bolesnica sa pozitivnim HER-2 statusom je bilo bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima, s tim što razlika nije statistički značajna ($p>0,05$). Značaj određivanja HER 2 statusa kod bolesnica bez metastaza u limfnim čvorovima je slabije definisan. Kontradiktorni rezultati delimično mogu da se objasne različitim metodama koje su korišćene u određivanju HER 2 statusa i retrospektivnom prirodom ovih analiza.*^{497,499,500}

Posebna pažnja se posvećuje ispitivanju genetskih promena koje doprinose razvoju ILC-a, a kao inicijalni događaj u razvoju i sporadičnog i naslednog ILC-a sugerise se aktivacija protoonkogeni ili gubitak funkcije tumor-supresornih gena. Osim tradicionalnih prognostičkih parametara ILC-a kao što su: histološki podtip, pT stadijum, status aksilarnih limfnih čvorova, sve više se koriste u prognozi, kao i u dijagnostici ILC-a, imunohistohemijske analize tumorsupresornih gena.

BRCA 1 je protein koji reguliše aktivaciju transkripcije, popravku DNK, apoptozu, kontrolne tačke ćelijskog ciklusa i remodelovanje hromozoma.³³⁵ Podaci u literaturi pokazuju da je BRCA1 pozitivan kod 27-50% lobularnih karcinoma

dojke.^{349,350,468,469} Urođene BRCA 1 genske mutacije su praktično nedetektabilne kod sporadičnih karcinoma dojke, pa stoga neki autori smatraju da gubitak funkcije BRCA 1 proteina dovodi do smanjene ekspresije ili nepravilne subcelularne lokalizacije ovog proteina, što upravo dokazuje njegovu tumor-supresornu funkciju.³³⁷⁻³⁴¹ BRCA-1 inhibira signalni put ligandom aktivisanog ER-Alfa, posredstvom estrogen-reaktivnih elemenata i tako blokira funkciju AF2 kod ER-Alfa kao aktivatora transkripcije.³⁵⁴

Imunohistohemijskom metodom markira se abnormalni BRCA1 protein koji je pokazatelj i genetskih mutacija i epigenetskih promena BRCA1 gena. U slučaju smanjenja ekspresije BRCA1 gena i smanjene sinteze BRCA1 proteina polemise se da li je to posledica genetskih mutacija ili epigenetskih uticaja.⁴⁶⁰ Kod normalne dojke ekspresija BRCA 1 je nađena samo u jedru. Postoje i podaci da je samo citoplazmatska ekspresija prisutna u 5% slučajeva, dok je jedarna i citoplazmatska ekspresija prisutna u 36% slučajeva.⁴⁶⁰ Kod karcinoma dojke ekspresija može da bude lokalizovana samo u jedru, ali je manja u odnosu na normalno tkivo dojke (duktalni 66%, medularni 77%, lobularni 27%). Citoplazmatska ekspresija je češća u duktalnim i medularnim, a ređa u lobularnim karcinomima dojke. U većine tumora dojke BRCA1 je odsutan ili eksprimiran u manjoj meri, a u 86% razlog je hipermetilacija promotora BRCA1, posebno kod bolesnica starosti preko 55 godina sa duktalnim i/ili invazivnim lobularnim karcinomom, *što može odgovarati dobijenim rezultatima, gde je prosečna starost bolesnica sa pozitivnim BRCA 1 proteinom bila niža ($55,06 \pm 12,61$ godina) od bolesnica sa negativnim BRCA 1 proteinom ($58,94 \pm 11,57$ godina), bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$).* Hipermetilacija promotora BRCA1 je saopštena u 20% sporadičnih karcinoma dojke i poklapa se sa nivoom transkripcije BRCA1.^{468,469}

Citoplazmatska ekspresija posledica je abnormalnog BRCA1 proteina, a sam abnormalni BRCA1 protein verovatno igra ulogu u razvoju sporadičnog (nenaslednog) karcinoma dojke. Promene BRCA1 proteina slične su i kod naslednih i kod sporadičnih karcinoma dojke. Što se tiče same ekspresije BRCA1 gena postoje dva osnovna faktora koji su vezi sa biološkim i patološkim karakteristikama kao i sa kliničkim ishodom a to su: 1) nivo ekspresije BRCA1 i 2) ćelijska lokalizacija BRCA1 proteina. *Uzevši u obzir oba parametra BRCA 1 pozitivnosti, nije se pokazala statistički značajna veza između*

BRCA 1 negativnih i BRCA 1 pozitivnih ILC-a (37,5% prema 29,41%) u odnosu na prisustvo metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima ($p>0,05$).

Još uvek postoji dilema o ćelijskoj lokalizaciji BRCA1 proteina u tumorima dojke i značaju aberantne lokalizacije BRCA1 proteina. Citoplazmatska ekspresija je posledica abnormalnog BRCA1 proteina koji je nastao kroz specifične epigenetske promene,⁵⁰¹⁻⁵⁰⁵ pa bi to moglo da znači da je gomilanje BRCA1 proteina u citoplazmi odraz epigenetskih promena, a smanjena nuklearna ekspresija BRCA1 posledica genskih mutacija.

Zapažanje da su mnogi karcinomi dojke sa BRCA 1 mutacijama negativni na hormonske receptore postavlja dilemu da li hormonski faktori etiološki doprinose BRCA 1 mutacijama kod karcinoma dojke.³⁴⁷ Ipak, funkcija "čuvara" BRCA 1 je opšta i ne objašnjava zašto BRCA 1 mutacije dovode do specifičnog rizika za tumore koji su hormonski zavisni ili u čijem nastanku hormoni igraju važnu ulogu.³⁴⁷ Molekularna veza između BRCA 1 i estrogena ustanovljena je zapažanjem da egzogeni BRCA 1 protein inhibiše transkripcionu aktivnost vezanog ER α preko ERE u kulturi humanih ćelija karcinoma dojke.⁵⁰⁶ Naredne studije su ukazale na dva mehanizma kojima BRCA 1 vrši inhibiciju ER α : 1. direktnom interakcijom BRCA 1 i ER α proteina i 2. nishodnom (down) regulacijom p300, jedarnog receptornog koaktivatora.^{507,508}

Podaci o postojanju histološkog fenotipa karakterističnog za BRCA 1 „nosioc“, u suprotnosti su sa dobijenim rezultatima o povezanosti podtipa ILC-a sa BRCA 1 pozitivnošću ($p>0,05$). Slučajevi prekomerne ekspresije BRCA 1 proteina među analiziranim ILC-ima nisu pokazali statistički značajnu povezanost sa multifokalnim ili multicentričnim načinom rasta ($p>0,05$), kao ni prekomernu ekspresiju BRCA 1 proteina kod dezmoplastičnih ILC-a ($p=0,0812$). Svi BRCA 1 negativni ILC-i su imali dezmoplastičnu reakciju strome u odnosu na BRCA 1 pozitivne ILC-e sa dezmoplazijom (79,41%), što može da bude od značaja za procenu biološkog karaktera dezmoplastičnih ILC-a i sa imunohistohemijskog aspekta. Karcinomi dojke koji su označeni kao BRCA 1 "nosioci", histopatološki se razlikuju od sporadičnih karcinoma dojke. Oni obično imaju negativne steroidne receptore sa saopštenom učestalošću pozitivnih ER slučajeva u različitim studijama od 10 do 36%.^{360,509,510} Nedostatak ekspresije ER α kod ovih tumora može da bude delimično objašnjen hipermetilacijom ER α gena.⁵¹¹ Interesantna su i zapažanja da je ekspresija PR receptora značajno veća u normalnom epitelu dojke koji se

nalazi u susedstvu karcinoma dojke sa BRCA 1 mutacijom u odnosu na sporadične karcinome dojke,⁵¹² a analizirani slučajevi BRCA 1 pozitivnih lobularnih karcinoma dojke su imali pozitivne PR receptore u 82,35% slučajeva, sa statistički značajnom razlikom prema 50% BRCA 1 negativnih ILC-a sa pozitivnim PR receptorima ($p < 0,05$).

Nasledni BRCA 1 karcinomi su karakteristično ER negativni u poređenju sa sporadičnim tumorima.⁵¹³ Ovakva povezanost se može objasniti većim gradusom karcinoma i mlađom životnom dobi bolesnica,³⁴⁸ kao i četiri do osam puta većom verovatnoćom ER negativnosti kod BRCA 1 karcinoma gradusa 3 u odnosu na sporadične karcinome gradusa 3.⁵¹⁴ Osim toga, karcinomi dojke sa BRCA 1 mutacijama su mnogo češće visokog nuklearnog i histološkog gradusa, a imaju i visok Ki-67 indeks,^{360,515} što je suprotno nalazima ove studije, gde je visok Ki-67 indeks je imalo 57,89% BRCA 1 pozitivnih lobularnih karcinoma u odnosu na 81,82% BRCA 1 negativnih ILC-a sa visokim Ki-67 indeksom, ali bez statističke značajnosti ($p > 0,05$).

p53 i BRCA 1 su tumor supresorni geni, a oba su uključena u mnoge ćelijske procese počev od popravke grešaka dvolančane DNK,⁵¹⁶ stopiranja ćelijske deobe,⁵¹⁷ apoptoze⁵¹⁸ do regulacije transkripcije.⁵¹⁹ Direktna funkcionalna veza između p53 i BRCA 1 prvobitno je utvrđena zapažanjem da gubitak p53 delimično može da smanji smrtnost embriona kod BRCA 1 "knockout" miševa.⁵²⁰ Nekoliko studija je pokazalo veću incidenciju p53 imunobojenja kod BRCA 1 karcinoma dojke u odnosu na sporadične slučajeve. p53 prekomerna ekspresija je nađena u 37 do 77% BRCA 1 pozitivnih karcinoma dojke,^{348,359-362,521} a u ovoj studiji ona je bila prisutna u 57,89% BRCA 1 pozitivnih karcinoma, ali bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$). Sa druge strane, mutacije p53 su zabeležene u oko 20% slučajeva sporadičnih kontrola.^{361,362}

Prekomerna ekspresija HER-2 ustanovljena je u oko 20-30% sporadičnih karcinoma dojke, ali postoje i kontradiktorni podaci da ne postoji ekspresija HER-2 onkoproteina ili je ona prisutna u minimalnom broju slučajeva (3,7%) kod BRCA 1 pozitivnih karcinoma dojke.^{348,360} Imunohistohemijske studije novijeg datuma su saopštile da je prekomerna ekspresija HER-2 prisutna kod 18,6% BRCA 1 pozitivnih karcinoma dojke.³⁵⁹ Ovakvi rezultati odgovaraju nalazima ove studije, gde je 16,12% slučajeva sa prekomernom ekspresijom HER-2 bilo BRCA 1 pozitivno prema 12,5%

slučajeva HER-2 pozitivnih ILC-a bez aberantnog BRCA 1 proteina, mada nisu nađene statistički značajne razlike ($p > 0,05$).

Učestala alteracija na 17. hromozomu kod BRCA 1 karcinoma je monozomija, koja je saopštena u 35-61% ovih tumora.^{348,522} Ova hromozomska abnormalnost može da bude značajna, pošto monozomija 17. hromozoma može da doživi drugi inaktivacioni "udar" u određenom procentu BRCA 1 pozitivnih karcinoma. Saopšteno je i da niska incidencija HER-2 amplifikacije kod BRCA 1 karcinoma može da bude zbog fizičke kodelecije jednog HER-2 alela i obližnje sekvence tokom gubitka heterozigotnosti na BRCA 1 lokusu.⁵²²

Karcinomi dojke se rutinski stepenuju po modifikaciji Scarff - Bloom - Richardson-ovog sistema, opisanog od strane Elston-a i Ellis-a, na bazi procene tubularnih formacija, jedarnog pleomorfizma i mitotskog indeksa.¹⁶⁹ BRCA 1 karcinomi dojke su češće loše diferentovani tj. gradusa 3. Učestalost gradusa 3 kod BRCA 1 pozitivnih karcinoma dojke je preko 66%,^{348,358,359,513,523-527} dok učestalost kod sporadičnih BRCA 1 pozitivnih tumora ide od 15 do 55%.^{358,359,528} *U ovoj studiji manji broj BRCA 1 pozitivnih lobularnih karcinoma je imalo visok Ki-67 indeks (57,89%) u odnosu na BRCA 1 negativne lobularne karcinome sa visokim Ki-67 indeksom (81,82%), ali bez statističke značajnosti ($p > 0,05$), što je ponovo kontradiktorno u odnosu na pojedine komponente koje ulaze u sastav gradusa BRCA 1 pozitivnih karcinoma dojke (visok jedarni pleomorfizam i visok mitotski indeks, a najmanje značajno formiranje tubularnih formacija).*^{348,523,528}

Na bazi molekularnih analiza, karcinomi dojke sa BRCA 1 mutacijama pokazuju povećanu incidenciju p53 mutacija,^{360,529,530} a smanjenu incidenciju HER-2/neu amplifikacije/prekomerne ekspresije.^{360,525,529,531,532}

Osim što karcinomi dojke sa BRCA 1 mutacijama pokazuju smanjenu ekspresiju ER α i PR receptora u odnosu na sporadične karcinome dojke, takođe pokazuju i smanjenu ekspresiju AR receptora.⁵³³

DNK "microarray" i imunohistohemijske studije pokazuju da karcinomi dojke "nosioci" BRCA 1 mutacija pokazuju bazaloidni fenotip.^{521,534} Bazaloidni fenotip, koji se javlja u oko 15% karcinoma dojke karakteriše se ER α i HER-2/neu negativnošću, zajedno

sa visokim nivoima citokeratina koji se normalno nalaze u bazalnim epitelnim ćelijama.³⁴⁷

Pojedine studije ukazuju da je BRCA 1 protein odsutan ili redukovan u značajnijoj meri u 30 do 40% sporadičnih karcinoma dojke.^{341,535-537} Smanjena BRCA 1 ekspresija može da bude posledica hipermetilacije BRCA 1 promotora i/ili gubitka jednog od BRCA 1 alela.⁵³⁸⁻⁵⁴⁰ Još uvek nije sasvim jasno da li sporadični BRCA 1 karcinomi dojke predstavljaju posebnu fenotipsku grupu. Pošto su mnogi sporadični karcinomi dojke ERa pozitivni, *a nalazima ove studije je pokazano da 85,29% BRCA 1 pozitivnih lobularnih karcinoma ima pozitivan ER skor ($p < 0,05$), može da se govori o hormonskoj interakciji kod razvoja sporadičnih lobularnih karcinoma dojke.*

Tamoxifen smanjuje rizik od pojave karcinoma dojke kod zdravih žena sa različitim predisponirajućim faktorima, kao što su pozitivna porodična anamneza, godine života, lobularni karcinom "in situ" i atipična lobularna hiperplazija.⁵⁴¹ Tamoxifen smanjuje rizik od pojave ER pozitivnih tumora u 69% slučajeva, a nema značajnijeg uticaja na pojavu ER negativnih karcinoma dojke. Iako nije odlučeno da li je upotreba Tamoxifena efektivna za nosioce BRCA 1 mutacija, *nalazi ove studije da je 85,29% BRCA 1 pozitivnih lobularnih karcinoma ER pozitivno u odnosu na 56,25% BRCA 1 negativnih ILC-a sa pozitivnim ER skorom, uz statističku značajnost ($p < 0,05$), svedoče da se i BRCA 1 status može uzeti u obzir prilikom donošenja odluke o primeni antiestrogene terapije kod tih bolesnica.*

BRCA 1 mutacijama se može objasniti samo 25 do 30% familijarnih karcinoma dojke, mada procenat varira zavisno od pojedinačnih studija.⁵⁴²⁻⁵⁴⁸ Stoga je značajno naći dodatne kliničke ili patološke pokazatelje koji mogu da ukažu na prisustvo ili da potvrde odsustvo BRCA 1 mutacija.

Nekoliko studija je pokazalo veliku učestalost p53 imunobojenja i p53 mutacija u BRCA 1 pozitivnim karcinomima u odnosu na sporadične slučajeve. Tako su te alteracije zapažene u 37-77% BRCA 1-udruženih tumora, dok su samo one bile prisutne u oko 20% sporadičnih kontrola.^{348,358-362} Osim toga, nekoliko zapažanja sugerišu da BRCA 1 mutacije utiču na tip i distribuciju p53 mutacija viđenih kod karcinoma dojke. Komparacijom spektra p53 mutacija kod BRCA 1 pozitivnih bolesnica sa onim u sporadičnim tumorima, dobija se značajna razlika u distribuciji i izmenama baznih

parova. Mutacije A-T baznih parova su češće kod tumora povezanih sa prekomernom ekspresijom BRCA 1 proteina. Većina tih mutacija ranije nije saopštena kod karcinoma, dok su se druge dešavale veoma retko. Promene su bile učestale na p53 kodonima koji nisu bili mutaciona "opasna mesta", a mutirani su van p53 DNK-vezujućeg mesta.³⁶³ Prisustvo tih izmenjenih amino kiselina na ne-DNK-vezujućim mestima p53 molekula, mogu da predstavljaju jednu interakcionu površinu za drugi, nepoznati protein.

Prekomerna ekspresija p53 prisutna je u 11 do 55 % tumora. Nivo TP53 u neneoplastičnim ćelijama je nizak i može da se detektuje osetljivim imunohistohemijskim metodama. Akumulacija TP53 se obično tumači kao marker za "missense" mutaciju gena, što je najčešći mehanizam inaktivacije p53 gena u tumoru dojke. Ovaj protein je faktor regulacije progresije ćelija u ćelijskom ciklusu i apoptozi u odgovoru na delovanje faktora okoline, kao što su oštećenje DNK i hipoksija.⁴⁷⁰ Imunohistohemijski može da se detektuje heterogenost ekspresije p53.⁴⁷⁰ U slabo diferentovanim područjima zapaža se jaka prebojenost, a u bolje diferentovanim područjima tumora ćelije se ne boje. Imunohistohemijski profil pleomornog podtipa ILC-a se značajno razlikuje od klasičnog ILC-a, pre svega po prekomernoj ekspresiji HER2 receptora, po izrazitoj p53 ekspresiji i u nekim slučajevima po gubitku ekspresije hormonskih receptora.^{183,184} *Ova studija je pokazala gotovo identičnu učestalost p53 pozitivnosti kod klasičnog i pleomornog podtipa (42,26% u odnosu na 42,10%), a nešto veći procenat p53 pozitivnih slučajeva je imao mešoviti lobularni podtip (50%) ($p>0,05$).*

U nekim studijama je zapaženo da su klasični ILC-i češće multifokalni ili multicentrični u odnosu na pleomorfne ILC-e.¹⁰⁶ *Rezultati ove studije ne pokazuju statistički značajnu povezanost multifokalnosti/multicentričnosti i podtipova ILC-a. Pozitivnost p53 je nađena u skoro identičnom procentu kod klasičnog ILC-a (42,26%), koji je češće multicentrični/multifokalni¹⁰⁶, i kod pleomornog ILC-a (42,1%). Multifokalni i multicentrični ILC-i u ovoj studiji su u statistički značajno manjem procentu bili p53 pozitivni (14,28%) u odnosu na 45,04% p53 pozitivnih ILC-a koji nisu bili multicentrični/multifokalni ($p<0,05$), dok statistička značajnost nije utvrđena za ILC-e sa fokalnim LCIS-om ili DCIS-om koji su bili p53 pozitivni ($p>0,05$). Ekspresija p53 je bitna za nastanak tumora, a nije značajna za histološki tip, diferencijaciju i pojavu metastaza,⁴⁷⁰ što je potvrđeno i ovom analizom, a statistički značajna povezanost p53*

pozitivnosti nije utvrđena prema prosečnoj starosti bolesnica, podtipu, metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima, kao ni prema pozitivnosti ER, PR i HER-2 receptora ($p>0,05$).

Kod lobularnih karcinoma dojke nije nadjena inaktivacija Rb gena, koji ima značajnu ulogu u interakciji drugih tumor-supresornih gena.^{384,385} Stoga je retka pojava da su više od dva gena regulatora ćelijskog ciklusa poremećena istovremeno (Rb, p53, cyclin D1). Postoji korelacija između broja abnormalno eksprimiranih gena i mitotske aktivnosti tumora. Postavljena je i hipoteza da tumori sa poremećajem dva ili više mehanizama ćelijskog ciklusa imaju agresivniji fenotip.⁴⁷⁰

Odsustvo p53 ekspresije kod LCIS-a, pokazano u ovoj studiji, takođe potvrđuje gledište da se prekomerna ekspresija p53 imunohistohemijski ne detektuje kod klasičnog LCIS-a (82). Takođe klasični ILC-i su tipično negativni na p53 protein,³⁶⁴ a u mnogim slučajevima imunoreaktivnost p53 se detektuje kod pleomorfnog podtipa ILC-a¹⁸³, dok je u ovoj studiji učestalost p53 pozitivnosti klasičnog i pleomorfnog podtipa ILC-a bila gotovo identična.

Abnormalno eksprimirani geni (p53) su u korelaciji sa proliferativnom aktivnošću (Ki67) i gradusom tumora, ali ne i sa metastatskim potencijalom, što objašnjava njihovu ulogu u najranijoj fazi razvoja karcinoma dojke,⁵⁴⁹ a u analiziranom materijalu 85,71% tumora sa visokim Ki-67 indeksom je bilo p53 pozitivno u odnosu na 59,46% p53 negativnih lobularnih karcinoma sa visokim Ki-67 indeksom, a relacija je bila statistički značajna ($p<0,05$).

Većina publikacija govori da je Ki-67 indeks nizak kod klasičnog LCIS-a,⁵⁸ a da se pleomorfni podtip LCIS-a karakteriše Ki-67 indeksom većim od 10%.⁶³ Nizak Ki-67 indeks je bio prisutan u svim analiziranim slučajevima LCIS-a ove studije, što statistički značajno razlikuje LCIS od svih podtipova ILC-a ($p=0,033$). Podaci da pleomorfni invazivni lobularni karcinom ima veći Ki-67 indeks u poređenju sa klasičnim ILC-om,^{418,419} suprotni su od dobijenih rezultata o povezanosti Ki-67 indeksa i pojedinih podtipova ILC-a. Nalazi ove studije ukazuju da klasični ILC-i imaju visok Ki-67 indeks u većem broju slučajeva (72,97%), u odnosu na pleomorfni podtip (64,28%), ali bez statistički značajne razlike ($p>0,05$). Međutim, kontradiktorni su podaci i u odnosu na ostale podtipove ILC-a. Studije su pokazale da su pojedini ILC-i heterogeni u svojoj

diferentovanosti, odnosno građeni od neoplastičnih ćelija različitih imunohistohemijskih karakteristika, verovatno kao odraz multipotentnog kapaciteta "stem" ćelija. *Imunohistohemijski nalazi ove studije pokazuju visok Ki-67 indeks kod svih slučajeva (100%) mešovitog lobularnog podtipa ILC-a ($p>0,05$).*

Postoji obrnuta korelacija između pozitivnosti ER, PR i ćelijske proliferacije (Ki-67) u normalnom tkivu dojke. Medjutim, kod LCISa sa povećanjem Ki-67 indeksa raste i ekspresija ER.⁵¹²

U odnosu na druge histološke tipove karcinoma dojke, najnovije studije su pokazale da medijana Ki-67 indeksa za lobularne karcinome dojke iznosi 14%, što je po preporukama "St.Gallen konsenzus konferencije" nizak Ki-67 indeks.^{369,370}

Visoki Ki-67 indeks je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa veličinom primarnog karcinoma dojke, mlađim životnim dobom bolesnica, pozitivnim limfnim čvorovima, visokim jedarnim gradusom, negativnim hormonskim receptorima, p53 prekomernom ekspresijom i pozitivnim HER-2 skorom,³⁷⁰ *a u ovom istraživanju nije postojala značajna povezanost visokog Ki-67 indeksa sa metastatski izmenjenim limfnim čvorovima aksile ($p>0,05$).* Bolesnice preko 65 godina starosti imaju karcinome sa niskim Ki-67 indeksom, ali nema signifikantne razlike u Ki-67 indeksu tumora između bolesnica koje su mlađe od 50 godina i onih koje su starije od 50 godina.³⁷⁰ *Analizirane bolesnice sa ILC-om nisu pokazale statistički značajne razlike u prosečnoj starosti prema Ki-67 indeksu ($p>0,05$). Statistički značajna povezanost se nije pokazala ni u odnosu na hormonske receptore, kao ni HER-2 receptore, a ER receptori su bili negativni u 60% slučajeva sa visokim Ki-67 indeksom, PR receptori negativni u 69,56% slučajeva sa visokim Ki-67 indeksom, dok je HER-2 pozitivnost uočena kod 66,67% slučajeva sa visokim Ki-67 indeksom ($p>0,05$).*

Bolesnice sa visokim Ki-67 indeksom imaju značajno kraći period bez bolesti i globalno preživljavanje u odnosu na bolesnice sa niskim Ki-67 indeksom. Osim toga, bolesnice sa Ki-67 indeksom većim od 50% imaju ponovno javljanje karcinoma dojke unutar 2 godine od operacije. S druge strane, bolesnice koje imaju Ki-67 indeks manji od 20% imaju ponovno javljanje karcinoma tek nakon 10 godina od operacije.³⁷⁰

U odnosu na Ki-67 indeks i kliničko-patološke faktore, visoki Ki-67 indeks ($>$ ili $=20\%$) značajno korelira sa visokim gradusima maligniteta, kao što su negativni ER i PR

receptori, visoki HG i NG, p53 prekomerna ekspresija i pozitivni HER-2 receptori.⁵⁵⁰ Ovakvi podaci ukazuju da bolesnice sa visokim Ki-67 indeksom imaju goru prognozu. Mnoge studije su ispitivale prognostički značaj Ki-67 indeksa, a u većine njih je postavljena granična vrednost od 20%.⁵⁵⁰⁻⁵⁵²

Uzimajući Ki-67 kao prediktivni faktor terapijskog odgovora, u većem broju studija je naglašen značaj Ki-67 u predviđanju kliničkog i/ili patološkog odgovora kod ranog ili lokalno uznapredovalog karcinoma dojke. Nađeno je da je visok Ki-67 indeks povezan sa mnogo povoljnijim odgovorom na hemoterapiju,^{367,368,550} *što može da ima veze sa dobijenim rezultatima da klasični ILC-i imaju veći Ki-67 indeks u odnosu na pleomorfni podtip ILC-a (72,97% u odnosu na 64,28%), ali bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$).* Drugi autori su pokazali da nema adekvatnog odgovora u slučajevima gde je Ki-67 indeks bio niži od 25%.⁵⁵³ Sa druge strane, pojedine studije nisu saopštile značajniju vezu između Ki-67 indeksa i odgovora na neoadjuvantnu endokrinu terapiju.^{554,555} Međutim, novija istraživanja su ukazala da određivanje Ki-67 indeksa posle kratkotrajne endokrine terapije može da poboljša predviđanje preživljavanja (bez ponovnog javljanja bolesti).⁵⁵⁶ Ovakvi nalazi sugerišu da je Ki-67 značajan marker, ne samo kod primarne dijagnoze već i kroz terapijske protokole. Stoga je značajno uzeti u obzir Ki-67 indeks kod tretmana i praćenja bolesnica sa karcinomom dojke.

Invazivni lobularni karcinomi dojke koji su E-cadherin negativni u 90% slučajeva imaju metilaciju promotora. Epigenetska modifikacija E-cadherina je prisutna u okolnom normalnom epitelu oko tumora sa normalnom ekspresijom E-cadherina, ali te promene nisu prisutne u epitelu kod žena bez tumora. E-cadherin ima ulogu u inicijaciji lobularnog karcinoma dojke.⁵⁵⁷ Svi invazivni (100%) i "in situ" lobularni karcinomi dojke pokazuju kompletnu odsutnost E-cadherin membranske ekspresije.⁵⁵⁸

Mutacija p53 gena i nakupljanje abnormalnog TP53 je povezano sa smanjenom ekspresijom E-cadherina, što je i logično, jer normalni produkt p53 gena ispravlja oštećenja DNK, između ostalih i za E-cadherin, *a odsustvo statistički značajne razlike između p53 pozitivnosti i prisustva E-cadherina kod analiziranih slučajeva jasno ukazuje na aberantnu ekspresiju E-cadherina ($p > 0,05$).* Postoje drugi mehanizmi za inaktivaciju E-cadherina, verovatno epigenetski.⁵⁵⁹ Kod bolesnica mlađih od 40 godina češći je duktalni karcinom, veći je prečnik tumora, mitotski indeks, HG, NG i p53, dok je

smanjena ekspresija estrogenskih receptora, a mutacija BRCA1 je loš prognostički znak. Čelije klasičnog LCIS-a generalno se ne boje na E-cadherin, ali ispoljavaju perinuklearnu reaktivnost za HMW citokeratine.⁵⁶⁰

Kada je promena u celini sastavljena od pleomorfni LCIS-ćelija, razlika između LCIS-a i intralobularnog širenja intraduktalnog karcinoma može da bude teško prepoznatljiva. Imunohistohemijsko bojenje na E-cadherin u takvoj situaciji je vrlo korisno, jer gubitak reaktivnosti je siguran znak LCIS-a.^{50,64,561}

Postoje veoma retki slučajevi kada "in situ" promena, morfološki identična sa LCIS-om, pokazuje jaku membransku E-cadherin pozitivnost zajedno sa okolnim fokusima LCIS-a koji su E-cadherin negativni. Ovakav slučaj E-cadherin pozitivnog LCIS-a označava se aberantnom E-cadherin reaktivnošću. To zahteva da se aberantna E-cadherin reaktivnost uključi u posebnu klasifikaciju ovih lezija.²⁸

Skoro sve neoplastične lobularne lezije se karakterišu odsustvom E-cadherin reaktivnosti. E-cadherin ekspresija je odsutna u kancerskim ćelijama, kada LCIS zahvata duktule. Preostale duktalne i mioepitelne ćelije, koje mogu da budu u većem broju kada se LCIS padžetoidno širi, su E-cadherin pozitivne. U manjem broju slučajeva, lobularne neoplastične ćelije pokazuju fragmentiranu i diskontinualnu E-cadherin reaktivnost, koja je slabija od reaktivnosti duktalnih epitelni ćelija.^{64,65}

Neznatne razlike između klasičnih i pleomorfni ILC-a u odsustvu E-cadherin imunoreaktivnosti (90% u odnosu na 80%), zapažene su u pojedinim analizama. Saopšteno je da se odsustvo E-cadherin reaktivnosti kod karcinoma, koji histološki liče na duktalne, mnogo češće viđa kod loše diferentovanih tumora,^{33,374} ali je zapaženo i kod dobro diferentovanih karcinoma.³⁷⁵ Iz razloga što je E-cadherinsko bojenje u izrazitoj vezi sa histološkim tipom tumora, promene koje odstupaju od očekivane E-cadherinske reaktivnosti, opisane su kao promene sa aberantnim E-cadherinskim obrascem bojenja.³⁷⁵ Slučajevi aberantnog E-cadherinskog bojenja mogu da se jave zbog neuobičajenih molekulskih promena, koje uzrokuju da E-cadherin protein bude prezentovan ili kao nefunkcionalan kod lobularni karcinoma,⁵⁶¹ ili odsutan kod duktalnih karcinoma. Uzroci su delecije gena ili defekti u transkripciji.⁵⁶² Mutacije E-cadherin gena opisane su kod klasičnog^{376,563,564} i pleomorfni ILC-a.³⁷⁷ Jedna trećina pleomorfni ILC-a može nastati iz duktalnih karcinoma visokih gradusa sa retkim ER - pozitivnim/E-Cadherin

negativnim fenotipom.⁴⁷¹ U jednoj studiji molekularna abnormalnost je otkrivena u 2 od 20 (10%) slučajeva ILC-a. Zato što je ispitivano 5 od 8 eksona, autori nisu mogli da isključe mogućnost različitih tačkastih mutacija u drugim slučajevima.⁵⁶³ Takođe su pronašli "okrnjeni" protein mutiranog E-cadherin eksona u 21 od 32 (66%) ILC-a sa gubitkom E-cadherinske imunoreaktivnosti.⁵⁶⁴ Gubitak heterozigotnosti na 16q22.1, mesta koje je kodirano kao E-cadherin gen, nađen je sa većom učestalošću u ILC-u nego u IDC-u.³⁷⁶ *Analizirani slučajevi smanjene ili odsutne ekspresije E-cadherina nisu pokazali statistički značajnu vezu prema statusu ER, PR i HER-2 receptora ($p > 0,05$).*

Kontradiktorni podaci o aberantnoj ekspresiji E-cadherina mogu da se tumače pogrešnim klasifikovanjem pojedinih histoloških podtipova lobularnog karcinoma dojke ili imunohistohemijskim artefaktima. *Bez obzira da li se radi o smanjenoj ili aberantnoj ekspresiji E-cadherina, u ovoj studiji nije nađena statistički značajna povezanost podtipa lobularnog karcinoma u odnosu na smanjenu ekspresiju ili gubitak ekspresije E-cadherina ($p > 0,05$). S druge strane, rezultati ove imunohistohemijske analize, gde je 22,22% ILC-a sa smanjenom ekspresijom E-cadherina imalo metastaze, a 36,84% sa potpunim gubitkom E-cadherina takođe imalo metastaze, ukazuju na razliku u malignom potencijalu, ali bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$).*

Standardizacija imunohistohemijskih procedura je do sada bila predmet mnogih debata, uspostavljanja konkretnih postupaka i sistema za svakodnevnu upotrebu. Međutim, pored problema koji se javlja na nivou laboratorijske izrade kvalitetnih imunohistohemijskih preparata, pitanje njihove interpretacije je postalo faktor koji može da ima izuzetan značaj po ishod bolesti.

Imunohistohemijski preparati, izrađeni na standardizovani rutinski način, a za potrebe dijagnostičke procene, specifično obeleženi monoklonskim antitelom imaju u hromatskom smislu dvokolorni karakter. Svaki od preparata pokazuje polja unutar kojih su se specifično vezala monoklonska antitela obojena hromogenom (braon prebojenost) i pozadinsko bojenje (background) načinjeno hematoksilinom, koje daje plavičastu prebojenost nespecifičnim delovima tkivnog uzorka, uključujući i specifično prebojene delove uzorka (jedro, citoplazma, ćelijska membrana).

Pojedini karcinomi dojke tipično pokazuju relativno homogenu ekspresiju ER receptora, ali u nekim slučajevima se može uočiti heterogenost u ekspresiji ER

receptora.⁵⁶⁵ *Kod analiziranih ILC-a je kvantitativno merena ekspresija ER receptora, a zbog heterogenosti njihove ekspresije od polja do polja, biran je invazivni front tumora.* Brojni istraživači su opisali mnogo intenzivniju imunoreaktivnost na periferiji tumora u poređenju sa centralnim delovima tumorske mase, jer je poznato da invazivni front tumora ima drugačiju morfologiju i sa većom sigurnošću eksprimira određene proteine u odnosu na centralne delove tumora.^{564,566} Precizno merenje statusa hormonskih receptora može da bude od dijagnostičkog, istraživačkog, kao i terapijskog značaja, zbog toga što hormonska terapija smanjuje relativni rizik od ponovnog javljanja bolesti u više od 50% bolesnica sa hormon zavisnim karcinomom dojke.^{274,566,567} Allred-ov scoring sistem se zasniva na semikvantitativnoj proceni procenta pozitivnih ćelija kao i intenziteta bojenja, gde se granicom pozitivnosti ekspresije receptora uzima ili 10% slabo obojenih jedara ili 1% srednje prebojenih jedara.⁴⁶³ Različite studije su ustanovile granične vrednosti između pozitivnih i negativnih slučajeva imunohistohemijskog bojenja.^{457,459}

Značajniji napredak u konfokalnoj fluorescentnoj mikroskopiji, sistemu kamera sa pratećim softverima su obezbedili novi metod i mogućnost kvantifikacije promena u ljudskim tkivima. Ekspresija ER receptora je relativno ujednačena u susednim ćelijama, dok se ekspresija PR receptora razlikuje između susednih ćelija.³¹³

Osim preciznije kvantifikacije ER receptora, slučajevi graničnih pozitivnosti ER receptora mogu da se reše primenom odgovarajućih dekonvolucionih metoda, što je od izuzetne važnosti u proceni efekata antihormonske terapije. Kvantifikacija nižih i graničnih vrednosti pozitivnosti ER receptora, sa aspekta sadržaja ER receptora u jedrima tumorskih ćelija, od posebne je važnosti, ne samo zbog rešavanja dijagnostičkih dilema, već i zbog određivanja koristi od antiestrogene terapije i metastatske proširenosti bolesti.^{311,313}

Obrada slika u patohistologiji ima dugu istoriju.^{568,569} Kvantifikacija jedarne pozitivnosti na steroidne hormonske receptore je vrlo korisna u predikciji ishoda bolesti.^{293,570} Nivo ekspresije receptora subjektivno se procenjuje korišćenjem sistema skorovanja od 0 do 3+ pozitivnosti i/ili prostom procenom broja pozitivnih jedara u odnosu na celokupnu populaciju tumorskih ćelija.²⁹¹

Ono što je od izuzetnog značaja je da postoje programi koji mogu da se koriste za istraživanje međusobnih molekulskih veza kod pojedinačnih ćelija, sa rezultatima koji se mogu kvantifikovati, a to su preduslovi početka "molekularne morfologije".²⁹¹

Kvantitativna imunohistohemija zahteva pažljivu kontrolu standardizovanih uslova obrade tkiva, a u samom delu obrade slike sprovođenje mera kvantitativnih standarda.^{291,571} Korišćenje kvantitativne imunohistohemije u cilju prikazivanja molekularnih događaja na bazi pojedinih piksela ćelija ili tkivnih struktura je otežano u kliničkoj praksi zbog različitog uzorkovanja materijala, pripreme i interpretacije. Ovi postupci treba da budu integrisani, standardizovani, a u najboljem slučaju i automatizovani.⁵⁷¹⁻⁵⁷⁴

Iako je određivanjem pozitivnosti ER skora kod različitih podtipova ILC-a u ovoj studiji utvrđena statistički značajna povezanost ER skora sa prisustvom metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima ($p < 0,05$), narednom kvantitativnom analizom nije utvrđena statistički značajna korelacija prosečnog intenziteta bojenja jedara na ER receptore, procenta ER pozitivnih ćelija i kvantitativnog ER skora prema procentu metastatski izmenjenih aksilarnih limfnih čvorova ($p > 0,05$). Dobijeni su kontradiktorni podaci u odnosu na razliku u prosečnoj starosti bolesnica sa pozitivnim i negativnim semikvantitativnim ER skorom, gde statistička značajnost nije utvrđena primenom t testa, ($p > 0,05$), a pozitivna korelacija je dobijena između starosti bolesnica i prosečnog intenziteta bojenja jedara na ER receptore, procenta ER pozitivnih ćelija, kvantitativnog ER skora, sa velikim efektom velične ispitivanih morfometrijskih parametara ($d > 0,5$) ($p < 0,001$).

Osim toga signifikantna razlika u prosečnom intenzitetu i procentu ER pozitivnih ćelija lobularnog karcinoma između premenopauzalnih i postmenopauzalnih bolesnica, gde su premenopauzalne bolesnice imale niži prosečan intenzitet ($0,21 \pm 0,18$ prema $0,37 \pm 0,26$) i procenat pozitivnih ćelija ($44,33 \pm 39,94$ prema $66,28 \pm 39,66$) u odnosu na postmenopauzalne bolesnice (t test, $p < 0,05$), može da se dovede u vezu sa nalazima da je kod postmenopauzalnih žena sa karcinomom dojke, tumorska koncentracija estradiola visoka zbog "in situ" aromatizacije, a niske serumske koncentracije estradiola.²⁶⁰

Konačni cilj kvantitativne procene u slučaju imunohistohemijskih bojenja je da se poveća senzitivnost (detekcija specifičnih antitela) i specifičnost (intenzitet specifičnog bojenja), poboljšanjem preciznosti procene pozitivnih/negativnih mesta bojenja u ćeliji. Posle toga se sa većom tačnošću može da odredi prognoza i preživljavanje kod tih bolesnika.⁵⁶⁵ Postojanje jednostavnog, besplatnog sistema za analizu slike u svakodnevnoj patohistološkoj dijagnostici karcinoma dojke omogućuje formiranje šire baze podataka za dalje prospektivne studije uticaja ekspresije hormonskih receptora na prognozu i/ili odgovora na terapiju.

Poslednjih godina je mnogo učinjeno da se promene konvencionalne procene imunohistohemijskog dokazivanja proteina u jedrima tumorskih ćelija. Pokušaji su se bazirali na razdvajanju i fotometrijskoj analizi specifične boje imunohistohemijskog hromogena, posebno diaminobenzidina (DAB).^{302,575} Problem koji se sreće u kvantitativnoj imunohistohemiji je tačno odvajanje hromogene boje od boje koja pripada pozadinskom prebojavanju hematoksilinom. Napredak na tom polju načinili su Ruifrok i Johnston, koji su predložili algoritam dekonvolucije boja, kojim se mogu razdvajati boje koje pripadaju imuno bojenju odnosno pozadinskom bojenju, čak i u slučaju preklapanja apsorpcionih spektara kao i zajedničke lokalizacije boja.⁴⁶² Glavna prepreka u proceni imunoreaktivnosti je determinisanje onoga što je pozitivno na tkivnom uzorku, a sa druge strane koji nivo vidljivog hromogena je pogodan da bi se određena struktura smatrala pozitivnom ili ne.³¹⁶

Pojedini autori su intenzitet imunohistohemijske ekspresije ER receptora određivali kao razliku između intenziteta jedarnog bojenja i bojenja pozadine i tako određivali imunohistohemijski indeks bojenja.³⁰² Međutim, takvim pristupom ne mogu da se naprave jasne razlike između tamno plavih i svetlo braon prebojenih jedara, što je u ovoj studiji izbegnuto, jer su dekonvolucijom odvojeni signali koji pripadaju hromogenom (DAB) bojenju od hematoksilinskih signala.

Uprkos upotrebljenoj dekonvolucionoj metodi određivanja ekspresije receptora, kvantitativni ER skor nije korelirao sa pT stadijumom niti sa multifokalnošću /multicentričnošću ispitivanih ILC-a ($p > 0,05$).

Iako imunohistohemija ima brojne prednosti, dugo nije bilo konsenzusa oko scoring sistema i tumačenja imunohistohemijskih rezultata.³¹⁴ Mada imunohistohemijska

procedura lako može da se standardizuje, tumečenje imunohistohemijske ekspresije se jedino bazira na vizuelnoj subjektivnoj proceni.³⁰² Mnogi patolozi prave razliku između pozitivnih i negativnih imunohistohemijskih rezultata prema subjektivnoj kvalifikaciji pozitivnosti i procentualne zastupljenosti pozitivnih jedara, gde su procentualne granice dogovorom definisane i kreću se između 5 i 45%.^{315,576-578} *Rezultati dobijeni u ovoj studiji, gde je utvrđena statistički značajna pozitivna korelacija starosti bolesnica sa procentom ER pozitivnih ćelija ILC-a ($p < 0,001$), sa velikim efektom velične ispitivanih morfolometrijskih parametara ($d > 0,5$), mogu da ukažu da i procenat pozitivnih ćelija može da ima dijagnostični značaj.* Drugi autori su primenjivali semikvantitativne skorove u proceni intenziteta jedarnog bojenja, kao pokazatelja broja receptora po ćeliji.^{308,579,580} Međutim, mnogi od ovih scoring sistema su glomazni za izvođenje, a i dalje je prisutan visok nivo subjektivnosti i interobserverskih razlika.³⁰² Da bi se obezbedili mnogo standardizovaniji podaci za kvantifikaciju imunohistohemijskih rezultata, upotrebljavani su različiti kompjuterski sistemi za analizu slike, a nađeno je da su u pozitivnoj korelaciji sa semikvantitativnim histološkim scoring sistemima ili sa biohemijskim podacima.⁵⁸¹⁻⁵⁸⁵ Međutim, visoka cena koštanja i kompleksnost ovih sistema za analizu slika, ozbiljno ograničavaju njihovu praktičnu primenu u laboratorijama gde se radi rutinska dijagnostika.

Analizom imunohistohemijskih slika u programu Image J dobijeni su kvantitativni podaci o ekspresiji ER receptora, koji su u jakoj pozitivnoj korelaciji sa semikvantitativnim ER skorom, ali i sa starošću bolesnica ($p < 0.001$), sa velikim efektom velične ispitivanih morfolometrijskih parametara pokazuju visok stepen podudarnosti semikvantitativnog i kvantitativnog ER skora ($d > 0,5$).

Semikvantitativne procedure u principu prouzrokuju inter- i intraobserverske varijacije.⁵⁸⁶ Uprkos ovim ograničenjima, studije su pokazale da su rezultati semikvantitativnih procena biopsijskih uzoraka još uvek upotrebljivi i klinički značajni.²⁹⁸ Međutim, preciznost im je ograničena kod graničnih slučajeva pozitivnosti. Stoga je od značaja i poboljšanje preciznosti semikvantitativnih šema za procenu pozitivnosti steroidnih receptora.²⁹⁸ Činjenica o postojanju optičkih varki, pre svega u proceni optičke gustine, objašnjava razlike u patohistološkoj proceni koje mogu da budu prevaziđene upotrebom programa za analizu slike.⁵⁸⁷ Jedan od bitnijih nalaza ove studije

je i primena jednostavnog, besplatnog i dostupnog programa Image J, u kvantifikaciji ekspresije hormonskih receptora. Konačno, od toga bi izuzetnu korist imale bolesnice sa karcinomom dojke, zato što postoje mnogi faktori koji se koriste kao prognostički indeksi, a bazirani su na imunohistohemijskim metodama.²⁹⁸ Mada nema opšte prihvaćenih standarda za morfometrijsku i fotometrijsku analizu,⁵⁸⁷ *rezultati ovakve studije mogu da se koriste kao standardi i da služe za poređenje određenih histoloških podtipova karcinoma dojke.*

Imunohistohemijska semikvantitativna procena ekspresije hormonskih receptora u cilju tretmana karcinoma dojke je preporučena od strane ASCO (American Society of Clinical Oncology).⁵⁸⁸ Ipak, interlaboratorijske razlike u proceni ekspresije hormonskih receptora su relativno velike u kliničkoj praksi. Rhodes i saradnici su pokazali da je 80% laboratorija prikazalo kao ER pozitivne karcinome dojke sa srednjom do jakom ekspresijom ER receptora, a samo 37% kao ER pozitivne karcinome dojke sa slabom ekspresijom ER receptora.⁵⁸⁹ Upoređivanje i ispitivanje semikvantitativnih scoring sistema (npr. Allred-ov scoring sistem) je neophodno za standardizaciju kvantitativne procene ekspresije ER receptora. Ovakav dekonvolucioni metod može da pravi razlike kod različitih podtipova ILC-a, da smanji intralaboratorijske varijacije i subjektivnost procene pojedinih slučajeva pozitivnosti ER receptora.

Iako se subjektivnost u izboru jedara tumorskih ćelija ne može sasvim isključiti, u analiziranom materijalu je takav faktor ograničen upotrebom planimetrijske test mrežice. Postoji visok stepen podudarnosti između semikvantitativnog i kvantitativnog imunohistohemijskog skora za ER receptore, a jaka pozitivna korelacija između semikvantitativnog i kvantitativnog ER skora ($p < 0,001$), sugerise da je pristup izbora 10 vidnih polja sa invazivnog fronta ILC-a reprezentativni uzorak za procenu ekspresije hormonskih receptora.

U literaturi ima malo podataka o značaju morfometrije u diferencijalnoj dijagnozi promena u dojci.²⁰⁹⁻²¹¹ Ipak se pokazalo da morfometrijske karakteristike mogu da budu od pomoći u razlikovanju benignih od malignih promena, kao i u razlikovanju duktalnih karcinoma gradusa I od viših gradusa. Sa druge strane, morfometrijski parametri imaju malu statističku značajnost kada je u pitanju razlikovanje duktalnih karcinoma jedarnog gradusa II od duktalnih karcinoma jedarnog gradusa III. Studije su pokazale da se od

različitih jedarnih parametara, površina preseka jedara (jedarni areal) konstantno ispoljava kao najkorisniji parametar prognoze kod bolesnica sa karcinomom dojke.⁵⁹⁰ U dostupnoj literaturi nema podataka o razlikama u površini preseka jedara između pojedinih jedarnih gradusa lobularnih karcinoma dojke, *a u ovoj studiji su se jasno izdvojili klasični ILC-i koji su bili uglavnom jedarnog gradusa II od pleomorfni ILC-a sa dominantnim jedarnim gradusom III.*

Pojedina istraživanja su saopštila da je površina preseka jedara značajan prognostički faktor kod bolesnica sa metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima i kod postmenopauzalnih bolesnica, ali ne i kod bolesnica bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima i kod premenopauzalnih bolesnica.⁵⁹⁰ Sa druge strane, studije koje su rađene u evropskim zemljama su pokazale da je prosečna površina preseka jedara koristan prognostički faktor kod premenopauzalnih bolesnica sa karcinomom dojke.^{591,592} *Nalazi ove studije ukazuju na postojanje statistički značajne pozitivne korelacije između starosti bolesnica i prosečne površine preseka jedara ($p < 0,05$), gde mali efekat velične ispitivanih morfometrijskih parametara ukazuje da starost bolesnica nije jedini faktor koji utiče na povećanje površine preseka jedara ($d > 0,5$). Promene u aktivnosti više gena: amplifikacije MYC, MDM 2, HER-2 i ZNF 217 zajedno sa p53 imunoreaktivnošću su mnogo tipičnije za IDC visokog jedarnog gradusa nego za ILC.^{184,593-595} Pleomorfni ILC se prema tome razvija u pozadini LCIS-a ili klasičnog ILC-a, ali stiče svoja fenotipska obeležja visokog jedarnog gradusa zbog nakupljanja dodatnih somatskih mutacija.⁴⁷¹ Ovim se može delimično objasniti pojava velikih jedara kod starijih bolesnica sa ILC-om.*

U okviru nigerijske studije koja je obuhvatila 10 bolesnica sa ILC-om saopštena je prosečna površina jedara od $17,2 \pm 9,3 \mu\text{m}^2$.⁵⁹⁰ *Analizirani slučajevi su pokazali veću prosečnu površinu preseka jedara ($27,64 \pm 9,16 \mu\text{m}^2$), što je verovatno posledica razmatranja većeg broja slučajeva ILC-a i uključivanja pleomorfnog i drugih podtipova ILC-a. Objašnjenje za pojavu veće prosečne površine preseka jedara kod analiziranih slučajeva ILC-a u odnosu na bolesnice iz Nigerije je da su i drugi tipovi karcinoma dojke većih prosečnih površina preseka jedara u bolesnica evropskih zemalja,^{213,592,596,597} a do sada razlike u prosečnoj površini preseka jedara lobularnih karcinoma dojke nisu saopštene. Alternativno objašnjenje za razlike u površini jedara je i saopštenje da se*

primenom različitih metoda fiksacije mogu da jave razlike u jedarnoj površini i obimu za oko 5 - 10%.⁵⁹⁸

Van der Linden i saradnici su saopštili da je najizrazitiji pleomorfizam jedara prisutan kod karcinoma dojke koji će kasnije metastazirati,⁵⁹⁹ a utvrđivanje statistički značajne pozitivne korelacije prosečne površine preseka jedara kod analiziranih ILC-a prema procentu zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova ($p < 0,05$), svedoči da je gubitak diferencijacije praćen većim procentom metastatski izmenjenih aksilarnih limfnih čvorova. Dobijeni rezultati pokazuju da kariometrijska analiza može da se koristi za preciznije određivanje metastatskog potencijala ILC-a, a mali efekat velične ispitivanog morfometrijskog parametara ($d = 0,2601$) ukazuje da na veći procenat metastatski izmenjenih aksilarnih limfnih nodusa utiču i drugi (ko)faktori.

Povećanje stepena dediferencijacije ILC-a ima veze sa multifokalnošću/multicentričnošću ILC-a, što potvrđuje i prisustvo statistički značajne povezanosti između veće prosečne površine preseka jedara i uočene multifokalnosti/multicentričnosti ILC-a ($p < 0,05$), ali zbog malog efekta velične ispitivanog morfometrijskog parametara ($d < 0,5$) neophodan je multifaktorijalni pristup. Multifokalni/multicentrični (mf/mc) ILC-i u proseku su imali veću površinu preseka jedara sa većom standardnom devijacijom u odnosu na ILC-e bez mf/mc ($30,19 \pm 10,05 \mu\text{m}^2$ u odnosu na $27,09 \pm 8,87 \mu\text{m}^2$). Mada su mf/mc ILC-i imali veći prosečan intenzitet ER bojenja jedara ($0,34 \pm 0,21$ u odnosu na $0,32 \pm 0,26$) i veći procenat ER pozitivnih ćelija ($60,94 \pm 36,98\%$ u odnosu na $58,88 \pm 41,54\%$) u odnosu na ILC-e bez uočene mf/mc, razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$).

Veća prosečna površina preseka jedara u analiziranim slučajevima ILC-a može da odražava stvarne biološke razlike između klasičnog i pleomornog tipa ILC-a. Nekoliko ranijih studija su pokazale da postoji povezanost između nuklearnog gradusa, ćelijske proliferacije i morfometrijskih parametara.^{213,596,597} Ladekarl i Sorensen su saopštili da su prosečna površina preseka jedara i mitotski indeks statistički značajnije veći kod duktalnih nego kod lobularnih karcinoma,²¹³ a takođe je i Yu sa saradnicima zapazio iste jedarne karakteristike korisne u diferencijaciji dva najčešća histološka tipa karcinoma dojke.²¹² Prema tome, veća prosečna površina preseka jedara analiziranih pleomornih

ILC-a, može da predstavlja odraz povišenog proliferativnog indeksa kod bolesnica sa ovim podtipom ILC-a.

Značajno različite populacije tumorskih ćelija, klonova, sa različitom biološkom agresivnošću postoje kao uznapredovali karcinomi dojke visokog proliferativnog indeksa. Ovi različiti klonovi mogu da imaju različiti p53 status, DNK-ploidnost, nivo proliferativnosti i jedarnu morfologiju.⁶⁰⁰ Merenja svih analiziranih slučajeva su obavljena u najcelularnijim delovima invazivnog fronta ILC-a sa jakim proliferativnim indeksom, jer je poznato da invazivni front tumora ima drugačiju morfologiju i sa većom sigurnošću eksprimira određene proteine u odnosu na centralne delove.^{564,590}

Morfološke i imunofenotipske karakteristike pleomorfnog ILC-a preklapaju se i sa klasičnim ILC-om i sa IDC-om visokog jedarnog gradusa.⁴⁷¹ Tako se dovodi u pitanje njihovo razvojno poreklo i klasifikacija. Nove studije ističu blisku molekularnu povezanost klasičnog i pleomorfnog podtipa ILC-a.⁴⁷¹ Analizom FNA materijala 555 bolesnica sa lobularnim karcinomom dojke, utvrđeno je da je pleomorfni podtip češće bio prepoznat po izraženijoj atipiji, višem mitotskom indeksu i većem jedarnom gradusu.¹⁹⁴ Lobularni karcinomi sa visokim jedarnim gradusom uglavnom predstavljaju neke od podtipova lobularnog karcinoma, a posebno pleomorfni podtip.¹⁹³ Pokazalo se da je više od 65% pleomorfni lobularni karcinoma bilo gradusa 2 po Elston-ovoj i Ellis-ovoj modifikaciji Scarf-Bloom-Richardson-ovog sistema stepenovanja,¹⁹⁴ što se u ovoj studiji pokazalo, jer su pleomorfni ILC-i imali malo veću prosečnu površinu preseka jedara ($28,58 \pm 12,05 \mu m^2$) u odnosu na klasične ILC-e ($25,27 \pm 8,12 \mu m^2$) uz statistički značajnu razliku ($p < 0,05$). Efekat veličine ispitivanog morfometrijskog parametara je mali, te površina preseka jedara ILC-a nije jedina značajna karakteristika pojedinih podtipova ILC-a.

Postoje jaki dokazi da je pleomorfni ILC evolutivno povezan sa klasičnim ILC-om tokom ranijih etapa ER- pozitivnog puta neoplastičnog razvoja.^{505,601-605} Međutim, jedna trećina (5/15) pleomorfni ILC-a pokazuje samo promene manjeg broja kopija na 16q, a takvi nalazi mogu da ukažu da se neki pleomorfni ILC-i razvijaju iz duktalnih karcinoma visokih gradusa sa retkim ER - pozitivnim/E-Cadherin negativnim fenotipom.⁴⁷¹

Morfološke i molekularne karakteristike pleomorfni ILC-a se poklapaju sa karakteristikama klasičnog ILC-a (ER/PR pozitivni, E-Cadherin negativni), sugerišući da mnogi pleomorfni ILC-i nisu samo IDC-i koji imaju inaktivaciju E-Cadherina, već predstavljaju varijantu ILC-a. Pleomorfni ILC se verovatno razvija sličnim molekularnim mehanizmima kao i klasični ILC, čak iako zadobije fenotip visokog jedarnog gradusa karakterističnog za IDC (p53 i HER-2 prekomerna ekspresija, gubitak 13q i amplifikacija 8q24 (MYC), 12q14 (MDM 2), 17q12 (HER-2/TOP 2A) i 20q13 (ZNF 217)). Ovakve karakteristike su odgovorne za lošiju prognozu pleomorfnog ILC-a.⁴⁷¹

Mada su histopatološke razlike između pojedinih podtipova ILC-a obično dovoljne da patolozi postave definitivnu dijagnozu, razlike između podtipova ILC-a sa različitim nuklearnim gradusima ostaju predmet diskusije.⁶⁰⁶ U tom smislu je ova studija kvantifikovala mikromorfološke razlike u veličini jedara klasičnih i pleomorfni ILC-a, kao i razlike u kvantitativnoj ekspresiji ER receptora kod ova dva podtipa ILC-a. *Analizom 277 bolesnica sa klasičnim i pleomorfni ILC-om je nađeno da postoje statistički značajne razlike u prosečnoj površini preseka jedara i prosečnom intenzitetu bojenja jedara na ER receptore, i kvantitativnom ER skoru ($p < 0,05$), ali ne i procentu ER pozitivnih ćelija ($p > 0,05$), sa malim do srednjim efektom veličine ispitivanih morfometrijskih parametara. Dobijeni rezultati pokazuju da se kariometrijska i fotometrijska analiza mogu koristiti za uspešnije razlikovanje i razdvajanje klasičnog od pleomorfni podtipa ILC-a.*

Ukupni prosečni intenzitet bojenja jedara na ER receptore svih ILC-a je $0,32 \pm 0,25$, a ukupne prosečne vrednosti bojenja jedara su pokazale statistički značajne razlike između klasičnog ($0,32 \pm 0,23$) i pleomorfni ($0,44 \pm 0,31$) podtipa ILC-a ($p < 0,01$), i u okviru kvantitativnog skora pokazuje statističku značajnost ($p < 0,05$), ali ne i između procenata ER pozitivnih ćelija klasičnog ($60,06 \pm 39,59\%$) i pleomorfni ($72,44 \pm 42,69\%$) podtipa ILC-a ($p > 0,05$). Ovi nalazi ukazuju na značajne biološke razlike između dva najzastupljenija podtipa ILC-a.

7. ZAKLJUČAK

Studijom mikromorfoloških, imunohistohemijskih i kvantitativnih karakteristika lobularnih karcinoma dojke kod 334 bolesnice izvedeni su sledeći zaključci:

1. Bilateralni lobularni karcinom dojke se najčešće javlja kod najmlađih bolesnica sa invazivnim lobularnim karcinomom, dok se multicentrični i multifokalni lobularni karcinomi javljaju kod starijih bolesnica sa invazivnim lobularnim karcinomom.
2. Fokalne LCIS promene su najčešće udružene sa invazivnim lobularnim karcinomom kod mlađih bolesnica.
3. Kod jedne petine lobularnih karcinoma dojke nije bilo moguće odrediti pT stadijum, a značajno češće kod „in situ“ lobularnih karcinoma dojke.
4. Lobularni karcinom „in situ“ ima značajno niži Ki-67 proliferativni indeks u odnosu na sve podtipove invazivnih lobularnih karcinoma.
5. Na češću pojavu metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima ne utiče starost bolesnica, multifokalnost, multicentričnost i bilateralnost invazivnih lobularnih karcinoma, kao i PR skor, HER-2 skor, ekspresija BRCA 1, ekspresija p53, Ki-67 indeks i smanjena ekspresija ili gubitak E-cadherin-a.
6. Lobularni karcinomi dojke veći od 2cm i lobularni karcinomi dojke sa negativnim ER skorom češće daju metastaze u aksilarne limfne čvorove.
7. Osnovne imunohistohemijske i mikromorfološke razlike klasičnog u odnosu na pleomorfni podtip invazivnih lobularnih karcinoma su: odsustvo disolucije tumorskih ćelija, češće pozitivan ER skor, češće pozitivan PR skor i manja prosečna površina preseka jedara.
8. Nasuprot razlikama, sličnosti klasičnog i pleomorfnog podtipa invazivnog lobularnog karcinoma su brojne i odnose se na: odsustvo njihove povezanosti sa određenim pT stadijumom, elastozom, dezmoplazijom, HER-2 skorom, ekspresijom BRCA 1, ekspresijom p53, smanjenom ekspresijom ili gubitkom E-cadherin-a, kao i sa metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima.
9. Prekomerna imunohistohemijska ekspresija BRCA 1 nije povezana sa podtipom i multifokalnim/multicentričnim invazivnim lobularnim karcinomom, ali se češće

- viđa kod lobularnih karcinoma sa pozitivnim ER skorom, i kod lobularnih karcinoma sa pozitivnim PR skorom.
10. Značajna prekomerna ekspresija p53 je prisutna kod invazivnih lobularnih karcinoma a sa visokim proliferativnim Ki-67 indeksom, dok je u značajno manjem procentu prisutna kod multifokalnih i multicentričnih lobularnih karcinoma dojke.
 11. Sa gubitkom ćelijske diferencijacije invazivnih lobularnih karcinoma dojke javlja se pozitivna korelacija između prosečne površine preseka jedara i starosti bolesnica, multifokalnosti/multicentričnosti invazivnih lobularnih karcinoma i većeg procenta metastatski izmenjenih aksilarnih limfnih čvorova.
 12. Starije bolesnice, naročito posle menopauze, imaju veći procenat pozitivnih ER ćelija i veći prosečni intenzitet bojenja jedara na ER receptore.
 13. Kvantitativna mikromorfološka analiza je od značaja za diferencijalnu dijagnostiku između klasičnog i pleomorfnog podtipa lobularnog karcinoma dojke, kao i procenu biološke agresivnosti lobularnih karcinoma dojke.

8. LITERATURA

1. Ferlay, Bray, Pisani, P, Parkin, MD GLOBOCAN (2000) Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC press, Lyon.
2. Russo J, Russo IH. In: Neville MC, Daniel CW (Eds). The mammary gland. New York, NY: Plenum Publishing Corporation; 1987:67-93.
3. Russo J, Russo IH. Development of the human breast. *Maturitas* 2004; 49:2-15.
4. Russo J, Tay LK, Russo IH. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1982; 2:5-73.
5. Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, Van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 1991; 62:1-32.
6. Russo J, Hu Y-F, Silva IDCG, Russo IH. Cancer risk related to mammary gland structure and development. *Microscopy Res Technique* 2001; 52:204-223.
7. Russo J, Rivera R, Russo IH. Influence of age and parity on the development of the human breast. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 23:211-218.
8. Russo J, Balogh G, Mailo D, Russo PA, Heulings R, Russo IH. The genomic signature of breast cancer prevention. *Recent Res Cancer Res* 2007; 174:131-50.
9. Russo J, Russo IH. Role of differentiation in the pathogenesis and prevention of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 1997; 4:1-15.
10. Russo J, Gusterson BA, Rogers AE et al. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 1990; 62:244-278.
11. Haugenau F. Le cancer mammaire de la souris et de la femme étude comparative au microscope électronique. *Path et Biol* 1959; 7:989-1015.
12. Waugh D, van der Hoeven E. Fine structure of the human adult female breast. *Lab Invest* 1962; 11:220-228.
13. Barton A. An electron microscope study of human breast cells in fibroadenosis and carcinoma. *Brit J Cancer* 1964; 18:682-685.
14. Toker C. Observations on the ultrastructure of a mammary ductule. *J ultrastruct Res* 1967; 21:9-25.
15. Schäfer A, Bässler R. Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen am Drüsenepithel und am sog. lobulären Carcinom der Mamma. *Virchows Arch.Abt.A Path.Anat.* 1969; 346:269-286.
16. Muir R. The evolution of carcinoma of the mamma. *J Pathol Bacteriol* 1941; 52:155-172.
17. Foote FW Jr, Stewart FW. Lobular carcinoma in situ: a rare form of mammary cancer. *Am J Pathol* 1941; 17:491-496.
18. Rosen PP. The pathological classification of human mammary carcinoma: Past, present and future. *Ann Clin Lab Sci* 1979; 9:144-156.
19. Mackarem G, Yacoub LK, Lee AKC, et al. Effects of screening on detection of lobular carcinoma in situ of the breast: Nonspecificity of mammography and physical examination. *Breast Dis* 1994; 7:339-345.
20. Morris DM, Walker AP, Cocker DC. Lack of efficacy of xeromammography in preoperatively detecting lobular carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 1982; 1:365-368.

21. Haagensen CD. Lobular carcinoma of the breast. A precancerous lesion? *Clin Obstet Gynecol* 1962; 5:1093–1101.
22. Haagensen CD, Lane N, Lattes R, et al. Lobular neoplasia (so-called lobular carcinoma in situ) of the breast. *Cancer* 1978; 42:737–769.
23. Rosen PP, Senie R, Ashikari R, et al. Age, menstrual status, and exogenous hormone usage in patients with lobular carcinoma in situ (LCIS). *Surgery* 1979; 85:219–224.
24. Ackerman BL, Otis C, Stueber K. Lobular carcinoma in situ in a 15-year-old girl: A case report and review of the literature. *Plast Reconst Surg* 1994; 94:714–718.
25. Urban JA. Biopsy of the “normal” breast in treating breast cancer. *Surg Clin North Am* 1969; 49:291–301.
26. Lewison EF, Finney GG Jr. Lobular carcinoma in situ of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 1968; 126:1280–1286.
27. Shah JP, Rosen PP, Robbins GF. Pitfalls of local excision in the treatment of carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 1973; 136:721–725.
28. Rosen’s breast pathology. 3rd edition. Philadelphia-New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
29. Hutter RVP, Foote FW Jr, Farrow JH. In situ lobular carcinoma of the female breast, 1939–1968. In: *Breast cancer, early and late*. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1970:201–236.
30. Rosen PP, Lieberman PH, Braun DW Jr, et al. Lobular carcinoma in situ of the breast. Detailed analysis of 99 patients with average follow-up of 24 years. *Am J Surg Pathol* 1978; 2:225–251.
31. Rosen PP. Lobular carcinoma in situ and intraductal carcinoma of the breast. In: McDivitt RW, Oberman HA, Ozzello L, Kaufman N, eds. *The breast*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984:59–105.
32. Vos CB, Cleton-Jones AM, Berx G, et al. E-Cadherin in-activation in lobular carcinoma in situ of the breast: An early event in tumor genesis. *Br J Cancer* 1997; 76:1131–1133.
33. Moll R, Mitze M, Frixen UH, et al. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular carcinomas. *Am J Pathol* 1993;143:1737–1742.
34. 53. Etzell JE, DeVries S, Chew K, et al. Loss of chromosome 16q in lobular carcinoma in situ. *Hum Pathol* 2001; 32:292–296.
35. Rahman N, Stone JG, Coleman G, et al. Lobular carcinoma in situ of the breast is not caused by constitutional mutations in the E-cadherin gene. *Br J Cancer* 2000; 82:568–570.
36. Salahshor S, Haixin L, Huo H, et al. Low frequency of E-cadherin alterations in familial breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3:199–207.
37. Zippel HH, Hematsch HJ, Kunze WP. Morphometric and cytophotometric investigations of lobular neoplasia of the breast with ductal involvement. *J Cancer Res Clin Oncol* 1979; 93:265–274.
38. Andersen JA, Vendelhoe ML. Cytoplasmic mucous globules in lobular carcinoma in situ. Diagnosis and prognosis. *Am J Surg Pathol* 1981; 5:251–255.
39. Eusebi V, Pich A, Macchiorlatti E, et al. Morphofunctional differentiation in lobular carcinoma of the breast. *Histopathology* 1977; 1:301–314.

40. Barwick K, Kashgarian M, Rosen PP. "Clear cell" change within duct and lobular epithelium of the human breast *Pathol Annu* 1982; 17(1):319–328.
41. Eusebi V, Betts C, Haagensen DE, et al. Apocrine differentiation in lobular carcinoma of the breast: A morphologic, immunologic and ultrastructural study. *Hum Pathol* 1984; 15:134–140.
42. Chen Y, Fitzgibbons P, Jacobs T, et al. Pleomorphic apocrine lobular carcinoma in situ (PALCIS): Phenotypic and genetic study of a distinct variant of lobular carcinoma in situ (LCIS). *Mod Pathol* 2005; 18(Suppl. 1):29A.
43. Haagensen CD. Lobular neoplasia (Lobular carcinoma in situ) In: *Diseases of the breast*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1986:192–781.
44. Andersen JA. Lobular carcinoma in situ of the breast with ductal involvement. Frequency and possible influence on prognosis. *Acta Pathol Microbiol Scand (A)* 1974; 82:655–662.
45. Haagensen CD, Lane N, Lattes R. Neoplastic proliferation of the epithelium of the mammary lobules: Adenosis, lobular neoplasia and small cell carcinoma. *Surg Clin North Am* 1972; 52:497–524.
46. Page DL, Dupont WD, Rogers LW. Ductal involvement by cells of atypical lobular hyperplasia in the breast: A long-term follow-up study of cancer risk. *Hum Pathol* 1988; 19:201–207.
47. Rosen PP, Tench W. Lobules in the nipple. Frequency and significance for breast cancer treatment. *Pathol Annu* 1985; 20(2):317–322.
48. Sahoo S, Green I, Rosen PP. Bilateral Paget disease of the nipple associated with lobular carcinoma in situ. Application of immunohistochemistry to a rare finding. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126:90–92.
49. Sgroi D, Koerner FC. Involvement of collagenous spherulosis by lobular carcinoma in situ. Potential confusion with cribriform ductal carcinoma in situ. *Am J Surg Pathol* 1995; 19:1366–1370.
50. Acs G, Lawton TJ, Rebbeck TR, et al. Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast and its biological and diagnostic implications. *Am J Clin Pathol* 2001; 115:85–89.
51. Oberman HA, Markey BA. Noninvasive carcinoma of the breast presenting in adenosis. *Mod Pathol* 1991; 4:31–35.
52. Millis RR, Hanby AM, Girling AC. The breast. In: Mills SE, editor. *Sternberg's diagnostic surgical pathology*. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
53. NHSBSP Publication Number 58. Pathology reporting of breast disease. Sheffield: NHS Cancer Screening Programmes and The Royal College of Pathologists, 2005.
54. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. 4th edition. European Communities, 2006:276–277.
55. Helvie MA, Hessler C, Frank TS, et al. Atypical hyperplasia of the breast: Mammographic appearance and histologic correlation. *Radiology* 1991; 179:759–764.
56. Mastracci TL, Tjan S, Ban AL, et al. E-Cadherin alterations in atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ of the breast. *Mod Pathol* 2005; 18:741–751.

57. Ioffe O, Silverberg SG, Simsir A. Lobular lesions of the breast: Immunohistochemical profile and comparison with ductal proliferations. *Mod Pathol* 2000; 13:23A.
58. Rudas M, Neumayer R, Gnant MF, et al. p53 protein expression, cell proliferation and steroid hormone receptors in ductal and lobular in situ carcinomas of the breast. *Eur J Cancer* 1997; 33:39–44.
59. Bur ME, Zimarowski MJ, Schnitt SJ, et al. Estrogen receptor immunohistochemistry in carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 1992; 69:174–1181.
60. Pallis L, Wilking N, Cedermark B, et al. Receptors for estrogen and progesterone in breast carcinoma in situ. *Anticancer Res* 1992; 12:2113–2115.
61. Ramachandra S, Machin L, Ashley S, et al. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in in situ breast carcinoma—A detailed morphological analysis. *J Pathol* 1990; 161:7–14.
62. Somerville JE, Clarke LA, Biggart JD. c-erbB-2 overexpression and histological type of in situ and invasive breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1992; 45:16–20.
63. Osborne MP, Borgen PI. Atypical ductal and lobular hyperplasia and breast cancer risk. *Surg Oncol Clin N Am* 1993; 2:1–11.
64. Goldstein NS, Bassi D, Watts JC, et al. E-Cadherin reactivity of 95 noninvasive ductal and lobular lesions of the breast. Implications for the interpretation of problematic lesions. *Am J Clin Pathol* 2001; 115:534–542.
65. Goldstein NS, Kestin LL, Vicini FA. Clinicopathologic implications of E-cadherin reactivity in patients with lobular carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 2001; 92:738–747.
66. Prasad ML, Hyjek E, Giri DD, et al. Double immunolabeling with cytokeratin and smooth-muscle actin in confirming early invasive carcinoma of breast. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:176–181.
67. Newman W. Lobular carcinoma of the female breast. Report of 73 cases. *Ann Surg* 1966; 164:305–314.
68. Dixon JM, Anderson TJ, Page DL, et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Histopathology* 1982; 6:149–161.
69. Martinez V, Azzopardi JG. Invasive lobular carcinoma of the breast: Incidence and variants. *Histopathology* 1979; 3:467–488.
70. Li CL, Anderson BO, Daling JR, et al. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *JAMA* 2003; 289:1421–1424.
71. Richter GO, Dockerty MB, Clagett OT. Diffuse infiltrating scirrhous carcinoma of the breast. Special consideration of the single filing phenomenon. *Cancer* 1967; 20:363–370.
72. DiCostanzo D, Rosen PP, Gareen I, et al. Prognosis in infiltrating lobular carcinoma: An analysis of “classical” and variant tumors. *Am J Surg Pathol* 1990; 14:12–23.
73. Fechner RE. Infiltrating lobular carcinoma without lobular carcinoma in situ. *Cancer* 1972; 29:1539–1545.
74. Fechner RE. Histologic variants of infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Hum Pathol* 1975; 6:373–378.

75. Rosen PP, Lesser ML, Kinne DW. Breast carcinoma at the extremes of age: A comparison of patients younger than 35 years and older than 75 years. *J Surg Oncol* 1985; 28:90–96.
76. Fu L, Tsuchiya S, Matsuyama I, et al. Clinicopathologic features and incidence of invasive lobular carcinoma in Japanese women. *Pathol Int* 1998; 48:348–354.
77. Helvie MA, Paramagul C, Oberman HA, et al. Invasive lobular carcinoma imaging features and clinical detection. *Invest Radiol* 1993; 28: 202–207.
78. Krecke KN, Gisvold JJ. Invasive lobular carcinoma of the breast: Mammographic findings and extent of disease at diagnosis in 184 patients. *AJR Am J Roentgenol* 1993; 161:957–960.
79. Le Gal M, Ollivier L, Asselain B, et al. Mammographic features of 455 invasive lobular carcinomas. *Radiology* 1992; 185:705–708.
80. Rodenko GN, Harms SE, Pruneda JM, et al. MR imaging in the management before surgery of lobular carcinoma of the breast: Correlation with pathology. *AJR Am J Roentgenol* 1996; 167:1415–1419.
81. Yeh ED, Slanetz PJ, Edmister WB, et al. Invasive lobular carcinoma: Spectrum of enhancement and morphology on magnetic resonance imaging. *Breast J* 2003; 9:13–18.
82. Harvey JA, Fechner RE, Moore MM. Apparent ipsilateral decrease in breast size at mammography: A sign of infiltrating lobular carcinoma. *Radiology* 2000; 214:883–889.
83. Butler RS, Venta LA, Wiley EL, et al. Sonographic evaluation of infiltrating lobular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 172:325–330.
84. Berg WA, Gilbreath PL. Multicentric and multifocal cancer: Whole-breast US in preoperative evaluation. *Radiology* 2000; 214:59–66.
85. Selinko VL, Middleton LP, Dempsey PJ. Role of sonography in diagnosing and staging invasive lobular carcinoma. *J Clin Ultrasound* 2004; 32:323–332.
86. Mitnick JS, Gianutsos R, Pollack AH, et al. Comparative value of mammography, fine-needle aspiration biopsy, and core biopsy in the diagnosis of invasive lobular carcinoma. *Breast J* 1998; 4:75–83.
87. White JR, Gustafson GS, Wimbish K, et al. Conservative surgery and radiation therapy for infiltrating lobular carcinoma of the breast. The role of preoperative mammograms in guiding treatment. *Cancer* 1994; 74:640–647.
88. Evans WP, Burhenne LJW, Laurie L, et al. Invasive lobular carcinoma of the breast: Mammographic characteristics and computer-aided detection. *Radiology* 2002; 225:182–189.
89. Mendelson EB, Harris KM, Doshi N, et al. Infiltrating lobular carcinoma: Mammographic patterns with pathologic correlation. *Am J Radiol* 1989; 153:265–271.
90. Peeters PHM, Verbeek ALM, Hendriks JHCL, et al. The occurrence of interval cancers in the Nijmegen screening programme. *Br J Cancer* 1989; 59:929–932.
91. Kepple J, Layeeque R, Klimberg VS, et al. Correlation of magnetic resonance imaging and pathologic size of infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Am J Surg* 2005; 190:623–627.

92. Kell RM, Morrow M. Multifocal, multicentric and bilateral breast cancer. In: Winchester JD, Hudis AC, Norton L (Eds). Breast cancer. 2nd edition. PMPH-USA, 2006.
93. Cheatele GL, Cutler M. Tumours of the breast, their pathology, symptoms, diagnosis and treatment. London: E Arnold & Co, 1931:483.
94. Fisher ER, Gregorio R, Redmond C, et al. Pathologic finding from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no.4). 1. Observations concerning the multicentricity of mammary cancer. *Cancer* 1975; 35:247-254.
95. Lagios MD, Westdahl PR, Rose MR. The concept and implications of multicentricity in breast carcinoma. *Pathol Annu* 1981; 16:83-102
96. Skowronek J, Piotrowski T. Bilateral breast cancer. *Neoplasma* 2002; 49:49-54.
97. Noguchi S, Motomura K, Inaji H, et al. Clonal analysis of predominantly intraductal carcinoma and precancerous lesions of the breast by means of polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1994; 54:1849-1853.
98. Middleton LP, Vlastos G, Mirza NQ, et al. Multicentric mammary carcinoma: evidence of monoclonal proliferation. *Cancer* 2002; 94:1910-1916.
99. Morrow M, Strom EA, Bassett LW, et al. Standard for breast conservation therapy in the management of invasive breast carcinoma. *CA Cancer J Clin* 2002; 52:277-300.
100. Chaudary MA, Millis RR, Hoskins EO, et al. Bilateral primary breast cancer: a prospective study of disease incidence. *Br J Surg* 1984; 71:711-714.
101. Teixeira MR, Ribeiro FR, Torres L, et al. Assessment of clonal relationships in ipsilateral and bilateral multiple breast carcinomas by comparative genomic hybridisation and hierarchical clustering analysis. *Br J Cancer* 2004; 91:775-782.
102. Agelopoulos K, Tidow N, Korsching E, et al. Molecular cytogenetic investigations of synchronous bilateral breast cancer. *J Clin Pathol* 2003; 56:660-665.
103. Imyanitov EN, Suspitsin EN, Grigoriev MY, et al. Concordance of allelic imbalance profiles in synchronous and metachronous bilateral breast carcinomas. *Int J Cancer* 2002; 100:557-564.
104. Broët P, de la Rochefordière A, Scholl SM, et al. Contralateral breast cancer: Annual incidence and risk parameters. *J Clin Oncol* 1995; 13:1578-1583.
105. Lee JS, Grant CS, Donohue JH, et al. Arguments against routine contralateral mastectomy or undirected biopsy for invasive lobular breast cancer. *Surgery* 1995; 118:640-647.
106. du Toit RS, Locker AP, Ellis IO, et al. Invasive lobular carcinomas of the breast—The prognosis of histopathological subtypes. *Br J Cancer* 1989; 60:605-609.
107. Bouvet M, Ollila DW, Hunt KK, et al. Role of conservation therapy for invasive lobular carcinoma of the breast. *Ann Surg Oncol* 1997; 4:650-654.
108. Lesser ML, Rosen PP, Kinne DW. Multicentricity and bilaterality in invasive breast carcinoma. *Surgery* 1982; 1:234-240.
109. Hislop TG, Ng V, McBride ML, et al. Incidence and risk factors for second breast primaries in women with lobular breast carcinoma. *Breast Dis* 1990; 3:95-105.
110. Babiera GV, Lowy AM, Davidson BS, et al. The role of contralateral prophylactic mastectomy in invasive lobular carcinoma. *Breast J* 1997; 3:2-6.

111. Cody HS. Routine contralateral breast biopsy: Helpful or irrelevant? Experience in 871 patients, 1979–1993. *Ann Surg* 1997; 225:370–376.
112. Foote FW Jr, Stewart FW. A histologic classification of carcinoma of the breast. *Surgery* 1946; 19:74–99.
113. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *nat Rev Cancer* 2001; 1:46–54.
114. Kunz-Schughart LA, Kneuchel R. Tumor-associated fibroblasts (part 1); active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol* 2002; 17:599–621.
115. Kunz-Schughart LA, Kneuchel R. Tumor-associated fibroblasts (part II): functional impact on tumor tissue. *Histol Histopathol* 2002; 17:623–637.
116. Silzle T, Randolph GJ, Kreutz M, Kunz-Schughart LA. The fibroblast sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *Int J Cancer* 2004; 108:173–180.
117. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes-bipolar effects of the tumor stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:839–849.
118. Li G, Sathyaamoorthy K, Meier F, Berking C, Bogenrieder T, Heriyn M. Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil. *Oncogene* 2003; 22:3162–3167.
119. Mueller MM, Fusenig NE. Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation* 2002; 70:466–497.
120. Cukierman E. A visual-quantitative analysis of fibroblastic stromagenesis in breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9:311–324.
121. Bauer G. Elimination of transformed cells by normal cells a novel concept for the control of carcinogenesis. *Histol Histopathol* 1996; 11:237–255.
122. Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L. et al. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:4966–4971.
123. Maffini MV, Soto AM, Calabro JM, Ucci AA, Sonnenschein C. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci* 2004; 117:1495–1502.
124. Abelev GI. Differentiation antigens: dependence on carcinogenesis mechanisms and tumor progression (a hypothesis). *Mol Biol* 2003; 37:2–8.
125. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* 2000; 6:324–329.
126. Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 2001; 264: 169–84
127. Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 2003; 83:337–376.
128. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; 59:5002–5011.
129. Quaranta V, Gianelli G. Cancer invasion: watch your neighbourhood! *Tumori* 2003; 89:343–348.
130. Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Auer H, Martin JrEW, de la Chapelle A, Frankel WL. Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 2004; 23:7366–7377.

131. Noel A, Kebers F, Maquoui E, Foidart JM. Cell-cell and cell-matrix interactions during breast cancer progression. *Curr Top Pathol* 1999; 93:183-193.
132. Tuxthorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 2001; 166:2472-2483.
133. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 2004; 48:509-17.
134. Bondeson L, Lindholm K. Prediction of invasiveness by aspiration cytology applied to nonpalpable breast carcinoma and tested in 300 cases. *Diagn Cytopathol* 1997; 17:315-20.
135. Amatangelo MD, Bassi DE, Klein-Szanto AJP, Cukierman E. Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *Am J Pathol* 2005; 167:475-488.
136. Barsky SH, Rao CN, Grotendorst GR, Liotta LA. Increased content of type V collagen in desmoplasia of human breast carcinoma. *Am J Pathol* 1982; 108:276-283.
137. Lagacé R, Grimaud J-A, Schürch D, Seemayer TA. Myofibroblastic stromal reaction in carcinoma of the breast: variations of collagenous matrix and structural glycoproteins. *Virchows Arch* 1985; 408:49-59.
138. Dvorak HF. Tumours; wounds that do not heal. Similarities between tumour stroma generation and healing. *N Engl J Med* 1986; 315:1650-59.
139. Peres R, Bestholtz C, Westermarck B, Heldin C-H. Frequent expression of growth factors for mesenchymal cells in human mammary carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1987; 47:3425-3429.
140. Ethier SP. Growth factor synthesis and human breast cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:964-973.
141. Horgan K, Jones DL, Mansel RE. Mitogenicity of human fibroblasts in vivo for human breast cancer cells. *Br J Surg* 1987; 74:227-229.
142. Ronnov-Jessin L, Petersen OW. Induction of α -smooth muscle actin by transforming growth factor- β 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. *Lab Invest* 1993; 68:696-707.
143. Ellis MJC, Singer C, Hornby A, Rasmussen A, Cullen KJ. Insulin-like growth factor mediated stromal-epithelial interactions in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 31:249-261.
144. Bronzert DA, Pantazis P, Antoniades HN, Kasid A, Davidson N, Dickson RB, Lippman ME. Synthesis and secretion of platelet derived growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:5763-5767.
145. Cavalcanti de Araújo V, Furuse C, Ramos Cury P, Altemani A, et al. Desmoplasia in different degrees of invasion of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Head and Neck Pathol* 2007; 1:112-117.
146. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* 1999; 5:662-668.
147. Sakko AJ, Ricciardelli C, Mayne K, et al. Versican accumulation in human prostatic fibroblast cultures is enhanced by prostate cancer cell-derived transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* 2001; 61:926-930.

148. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta/Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 2001; 276:17058-17062.
149. Shao Z-M, Nguyen M, Barsky SH. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene* 2000; 19:4337-4345.
150. Walker RA, Dearing SJ. Transforming growth factor β_1 expression in in-situ and invasive breast cancers. *Eur J Cancer* 1992; 28:641-644.
151. Ronnov-Jenson L, Petersen OW, Bissel M. Cellular changes involved in the conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* 1996; 76:69-125.
152. Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 1999; 189:161-168.
153. De Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JPA. Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II. Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol* 1998; 184:53-57.
154. Walker RA. The complexities of breast cancer desmoplasia. *Breast Cancer Res* 2001; 3:143-145.
155. de Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003; 200:429-447.
156. Canavese G, Candelaresi G, Castellano I, Mano MP. Expression of proteoglycan versican in in situ breast lesions: relations between stromal changes, histotype, and invasion. *Pathol Res Pract* 2010; doi: 10.1016/j.prp.2010.10.009
157. Wight TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14:617-623.
158. Bode-Lesniewska B, Dours-Zimmermann MT, Odermatt BF, Briner J, Heitz PU, Zimmermann DR. Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *J Histochem Cytochem* 1996; 44:303-312.
159. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G. et al. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 2000; 289:1197-1202.
160. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature (Lond.)* 2000; 406:747-752.
161. Perou CM, Jeffrey SS, Van de Rijn M, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:9212-9217.
162. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science (Wash. DC)* 1999; 283:83-87.
163. Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, Hempen PM, Jones J, Kern SE. The desmoplastic response to infiltrating breast carcinoma: gene expression at the site of primary invasion and implications for comparisons between tumor types. *Cancer Res* 2002; 62:5351-5357.
164. Martinez-Hernandez A, Francis DJ, Silverberg SG. Elastosis and other stromal reactions in benign and malignant breast tissue - an ultrastructure study. *Cancer* 1977; 40:700-706.
165. Douglas JG, Shivas AA. The origins of elastica in breast carcinoma. *J R Coll Surg Edinb* 1974; 19:89-93.

166. Shivas AA, Mackenzie A. The origins of stromal reaction in breast carcinoma. *J R Coll Surg Edinb* 1974; 19:345-350.
167. Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 1971; 50:172-186.
168. Ross R, Klebanoff JJ. The smooth muscle cell. I. In vivo synthesis of connective tissue proteins. *J Cell Biol* 1971; 50:159-171.
169. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer: II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1992; 20:479-489.
170. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B, Redmond C, Vellios F, Sommers SC. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no.4). *Cancer* 1975; 36:1-85.
171. Underwood JCE, Parsons MA, Harris SC, et al. Frozen section appearances simulating invasive lobular carcinoma in breast tissue adjacent to inflammatory lesions and biopsy sites. *Histopathology* 1988; 13:232-234.
172. Chetty R, Butler AE. Lymphocytic mastopathy associated with infiltrating lobular breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1993; 46:376-377.
173. Cristina S, Boldorini R, Brustia F, et al. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the breast. An unusual pattern of infiltrating lobular carcinoma. *Virchows Arch* 2000; 437:98-202.
174. Cserni G. Reproducibility of a diagnosis of invasive lobular carcinoma. *J Surg Oncol* 1999; 70:217-221.
175. Kiaer H, Andersen JA, Rank F, et al. Quality control of patho-anatomical diagnosis of carcinoma of the breast. *Acta Oncol* 1988; 27:745-747.
176. Frost AR, Terahata S, Yeh I-T, et al. The significance of signet ring cells in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119:64-68.
177. Battifora H. Intracytoplasmic lumina in breast carcinoma. *Arch Pathol* 1975; 99:614-617.
178. Erlandson RA, Carstens PHB. Ultrastructure of tubular carcinoma of the breast. *Cancer* 1972; 29:987-995.
179. Allenby PL, Chowdhury LN. Histiocytic appearance of metastatic lobular breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110:759-760.
180. Shimizu S, Kitamura H, Ito T, et al. Histiocytoid breast carcinoma: Histological, immunohistochemical, ultrastructural, cytological and clinicopathological studies. *Pathol Int* 1998; 48:549-556.
181. Eusebi V, Magalhaes F, Azzopardi JG. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: An aggressive tumor showing apocrine differentiation. *Hum Pathol* 1992; 23:655-662.
182. Weidner N, Semple JP. Pleomorphic variant of invasive lobular carcinoma of the breast. *Hum Pathol* 1992; 23:1167-1171.
183. Radhi JM. Immunohistochemical analysis of pleomorphic lobular carcinoma: higher expression of p53 and chromogranin and lower expression of ER and PgR. *Histopathology* 2000; 36:156-160.

184. Middleton LP, Palacios DM, Bryant BR, Krebs P, Otis CN, Merino MJ. pleomorphic lobular carcinoma: morphology, immunohistochemistry, and molecular analysis. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:1650-1656.
185. Walford N, Ten Velden J. Histiocytoid breast carcinoma: an apocrine variant of lobular carcinoma. *Histopathology* 1989; 14:515-522.
186. Bentz JS, Yassa N, Clayton F. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: Clinicopathologic features of 12 cases. *Mod Pathol* 1998; 11:814-822.
187. Cameselle-Teijeiro J, Alfonsin-Barreiro N, Allegue F, et al. Apocrine carcinoma with signet ring cells and histiocytoid features. *Pathol Res Prac* 1997; 193:713-720.
188. Augros M, Buenerd A, Decouassoux-Shisheboran M, et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast with histiocytoid features. *Ann Pathol* 2004; 24:259-263.
189. Hanby AM, Hughes TA. In situ and invasive lobular neoplasia of the breast. *Histopathology* 2008; 52:58-66.
190. Fisher ER, Gregorio RM, Redmond C, Fisher B. Tubulolobular invasive breast cancer: a variant of lobular invasive cancer. *Hum Pathol* 1977; 8:679-683.
191. Marchio C, Sapino A, Arisio R, Bussolati G. A new vision of tubular and tubulolobular carcinomas of the breast, as revealed by 3-D modelling. *Histopathology* 2006; 48:556-562.
192. Van Bogaert L-J, Maldaque P. Infiltrating lobular carcinoma of the female breast. Deviations from the usual histopathologic appearance. *Cancer* 1980; 45:979-984.
193. Hwang S, Ioffe O, Lee I, Weisman J, Cangiarella J, Simisir A. Cytologic diagnosis of invasive lobular carcinoma: factors associated with negative and equivocal diagnose. *Diagn Cytopathol* 2004; 31:87-93.
194. Menet E, Becette V, Briffod M. Cytologic Diagnosis of lobular carcinoma of the breast. *Cancer (Cancer Cytopathology)* 2008; 114:111-117.
195. Moatamed NA, Apple SK. Extensive sampling changes T-staging of infiltrating lobular carcinoma of breast: A comparative study of gross versus microscopic tumor sizes. *Breast J* 2006; 12:511-517.
196. Tavassoli FA, Devilee P, (Eds). *World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetic of Tumours of The Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press, 2003.
197. Breast In: Green FL, Page DL, Fleming ID, et al. editors. *AJCC Staging Manual*. New York: Springer-Verlag; 2002:223-240.
198. Andea AA, Wallis T, Newman LA, et al. Pathologic analysis of tumor size and lymph node status in multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer* 2002; 94:1383-1390.
199. Morphopoulos G, Pearson M, Ryder WDJ, et al. Tumour angiogenesis as a prognostic marker in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *J Pathol* 1996; 180:44-49.
200. Melamed M. Artificial intelligence and pathology. *Lab Invest* 1996; 75:291-293.
201. Mihailović D, Krstić B, Živković V, Stefanović D, Pavićević S. Mogućnosti primene morfometrijskih i stereoloških metoda u medicini. *Naučni podmladak* 1983; 15(1-2):117-174.
202. Bartels PH. The diagnostic pattern in histopathology. *Am J Clin Pathol* 1989; 91(Suppl 1):S7-S13.

203. Bartels PH. Quantitation in histopathology. In: Marchevsky AM, and Bartels PH, eds., *Image analysis-a primer for pathologist*. New York: Raven Press, 1994:1-28.
204. Kurt B, Karlsioglu Y, Celik E, Cermik H, Onguru O, Ozcan A, Deveci S. Nuclear planimetry on the samples from cytologically overlapping proliferative breast lesions. *Pathol Res Pract* 2009; 205:325-329.
205. Bogers J, Jacobs W, Segers K, Van Daele A, Weyler J, Van Mark E. Stereological evaluation of malignant mesothelioma versus benign pleural hyperplasia. *Path Res Pract* 1996; 192:10-14.
206. Nienhaus H. Morphometry of precancerous conditions of the breast (proceedings). *Arch Gynecol* 1977; 224:519-520.
207. Baak JP. The relative prognostic significance of nucleolar morphometry in invasive ductal breast cancer. *Histopathology* 1985; 9:437-444.
208. Baak JP, Kurver PH, de Graaf S, Boon ME. Morphometry for prognosis prediction in breast cancer. *Lancet* 1981; 8:315-318.
209. Dey P, Ghoshal S, Pattari SK. Nuclear image morphometry and cytologic grade of breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22:483-485.
210. Nijhawan R, Rajwanshi A. Cytomorphologic and morphometric limitations of the assesment of atypia in fibroadenoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2005; 27:273-276.
211. Rajesh L, Dey P, Joshi K. Automated image morphometry of lobular breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2002; 24:81-84.
212. Yu GH, Sneige N, Kidd LD, Johnston and Katz RL. Image analysis derived morphometric differences in fine needle aspirates of ductal and lobular breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1995; 17:88-92.
213. Ladekarl M, Sorensen FB. Quantitative histopathological variables in in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *APMIS* 1993; 101:895-903.
214. Jin Kim H, Heerdt AS, Cody HS, Van Zee KJ. Sentinel lymph node drainage in multicentric breast cancers. *Breast* 2002; 8:356-361.
215. Raju UR, Ma CK, Shaw A. Signet ring variant of lobular carcinoma of the breast: A clinicopathologic and immunohistochemical study. *Mod Pathol* 1993; 6:516-520.
216. Frost AR, Shek YH, Lack EE. "Signet ring" sinus histiocytosis mimicking metastatic adenocarcinoma: Report of two cases with immunohistochemical and ultrastructural study. *Mod Pathol* 1992; 5:497-500.
217. Trojani M, de Mascarel I, Bonichon F, et al. Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *Br J Cancer* 1987; 55:303-306.
218. Wells CA, Heryet A, Brochier HJ, et al. The immunocytochemical detection of axillary micrometastases in breast cancer. *Br J Cancer* 1984; 50:193-197.
219. Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B, et al. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Lancet* 1999; 354:896-900.
220. Cserni G, Bianchi S, Vezzosi V, et al. The value of cytokeratin immunohistochemistry in the evaluation of axillary sentinel lymph nodes in patients with lobular breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2006; 59:518-522.
221. Weinstein GW, Goldman JN. Metastatic adenocarcinoma of the breast masquerading as chalazion. *Am J Ophthalmol* 1970; 69:259-264.

222. Bitter MA, Fiorito D, Corkell ME, et al. Bone marrow involvement by lobular carcinoma of the breast cannot be identified reliably by routine histological examination alone. *Hum Pathol* 1994; 25:781–788.
223. Lamovec J, Bracko M. Metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma of the breast: An autopsy study. *J Surg Oncol* 1991; 48:28–31.
224. Borst MJ, Ingold JA. Metastatic patterns of invasive lobular versus invasive ductal carcinoma of the breast. *Surgery* 1993; 114:637–642.
225. Oyama T, Kashiwabara K, Yoshimoto K, et al. Frequent overexpression of the cyclin D1 oncogene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Cancer Res* 1998; 58:2876–2880.
226. Nayar R, Zhuang Z, Merino MJ, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 11q13 in lobular lesions of the breast using tissue microdissection and polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 1997; 28:277–282.
227. Dixon AR, Ellis IO, Elston CW, et al. A comparison of the clinical metastatic patterns of invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. *Br J Cancer* 1991; 63:634–635.
228. Olsen ME, Chernik NL, Posner JB. Infiltration of the leptomeninges by systemic cancer. A clinical and pathologic study. *Arch Neurol* 1974; 30:122–137.
229. Smith DB, Howell A, Harris M, et al. Carcinomatous meningitis associated with infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Eur J Surg Oncol* 1985; 11:33–36.
230. Heimann A, Merino MJ. Carcinomatous meningitis as the initial manifestation of breast cancer. *Acta Cytol* 1986; 30:25–28.
231. Jayson GC, Howell A, Harris M, et al. Carcinomatous meningitis in patients with breast cancer. An aggressive disease variant. *Cancer* 1994; 74:3135–3141.
232. Feun L, Drelichman A, Singhakowinta A, et al. Ureteral obstruction secondary to metastatic breast carcinoma. *Cancer* 1979; 44:1164–1171.
233. Gagnon Y, Tetu B. Ovarian metastases of breast carcinoma. A clinicopathologic study of 59 cases. *Cancer* 1989; 64:892–898.
234. Kidney DD, Cohen AJ, Butler J. Abdominal metastases of infiltrating lobular breast carcinoma: CT and fluoroscopic imaging findings. *Abdom Imaging* 1997; 22:156–159.
235. Kumar NB, Hart WR. Metastases to the uterine corpus from extragenital cancers. A clinicopathologic study of 63 cases. *Cancer* 1982; 50:2163–2169.
236. Mallow DW, Humphrey PA, Soper JT, et al. Metastatic lobular carcinoma of the breast diagnosed in cervicovaginal samples. A case report. *Acta Cytol* 1997; 41:549–555.
237. Liebmann RD, Jones KD, Hamid R, et al. Fortuitous diagnosis in a uterine leiomyoma of metastatic lobular carcinoma of the breast [letter]. *Histopathology* 1998; 32:577–578.
238. Houghton JP, Ioffe OB, Silverberg SG, et al. Metastatic breast lobular carcinoma involving tamoxifen-associated endometrial polyps: Report of two cases and review of tamoxifen-associated polypoid uterine lesions. *Mod Pathol* 2003; 16:395–398.
239. Cormier WJ, Gaffey TA, Welch JM, et al. Linitis plastica caused by metastatic carcinoma of the breast. *Mayo Clin Proc* 1980; 55:747–753.

240. Kobayashi T, Shibata K, Matsuda Y, et al. A case of invasive lobular carcinoma of the breast first manifesting with duodenal obstruction. *Breast Cancer* 2004; 11:306–308.
241. Matsui M, Kokima O, Uehara Y, et al. Characterization of estrogen receptor in human gastric cancer. *Cancer* 1991; 68:305–308.
242. Tokunaga A, Nishi K, Matsukura N, et al. Estrogen and progesterone receptors in gastric cancer. *Cancer* 1986; 57:1376–1379.
243. Harrison JD, Morris DL, Ellis IO, et al. The effect of tamoxifen and estrogen receptor status on survival in gastric carcinoma. *Cancer* 1989; 64:1007–1010.
244. Yokozaki H, Takemura N, Takanashi A, et al. Estrogen receptors in gastric adenocarcinoma: A retrospective immunohistochemical analysis. *Virchows Arch [A]* 1988; 413:297–302.
245. Chaubert P, Bouzourene H, Saraga E. Estrogen and progesterone receptors and pS2 and ERD5 antigens in gastric carcinomas from the European population. *Mod Pathol* 1996; 9:189–193.
246. Keller G, Vogelsang H, Becker I, et al. Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol* 1999; 155:337–342.
247. Voravud N, El-Naggar AK, Balch CM, et al. Metastatic lobular breast carcinoma simulating primary colon cancer. *Am J Clin Oncol* 1992; 15:365–369.
248. HER2 Testing - the CISH methodology: a comprehensive guide for CISH; F.Hoffman-La Roche Ltd 2005.
249. Mark Clemons MB, Goss P. Estrogen and risk of breast cancer (A review). *N Engl J Med* 2001; 344:276-285.
250. Scallen TJ, Noland BJ, Gavey KL. Sterol carrier protein 2 and fatty acid binding protein: separate and physiological function. *J Biol Chem* 1985; 260:4733-4739.
251. Kallen CB, Billheimer JT, Summers SA, Stayrook SE, Lewis M, Strauss JF. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. *J Biol Chem* 1998; 273:26285-26288.
252. Heimen CA, Hankinson SE, Spiegelman D. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone level and breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59:1015-1020.
253. Osewa Y, Higashiyama T, Shirizu Y, Yarborough C. Multiple functions of aromatase and the active site structure; aromatase is the placental estrogen 2-hydroxylase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 44:469-80.
254. Grubber DM, Huber JG. Tissue specificity: the clinical importance of steroid metabolites in hormone replacement therapy. *Maturitas* 2001; 37:151-157.
255. Tang M, Abplanalp W, Subbiab MT. Association of estrogens with human plasma lipoproteins: studies using estradiol 17 beta and its hydrophobic derivatives. *J Lab Clin Med* 1997; 129:447-452.
256. Shwaery GT, Vita JA, Keaney JF. Antioxidant protesfer of LDL by physiological concentration of 17 β estradiol: requirements for estradiol modification. *Circulation* 1997; 95:1378-1386.
257. Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW Jr. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:517-523.

258. Schmidt JB, Binder M, Demschik G, Bieglmayer C, Reiner A. Treatment of skin aging with topical estrogens. *Int J Dermatol* 1996; 35:669-674.
259. Porter JC. Hormonal regulation of breast development and activity. *J Invest Dermatol* 1974; 63:85-92.
260. McDonnell DP, Chang CY, Norris JD. Capitalizing on the complexities of estrogen receptor pharmacology in the quest for the perfect SERM. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 949:16-35.
261. Levin ER. Cellular function of plasma membrane estrogen receptor. *Steroids* 2002; 67:471-476.
262. Means AR, Comstock JP, Rosenfeld GC, O'Malley BW. Ovalbumin messenger RNA of chick oviduct: partial characterisation, estrogen dependent, and translation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69(5):1146-1111.
263. Donald P, McDonnell DP, John D Norris. Connection and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 2002; 296:1642-1644.
264. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K. Human estrogen receptor β gene structure chromosomal localisation and expression patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:4258-4265.
265. Pettersson K, Gustafsson JA. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiology* 2001; 63:165-192.
266. Levin ER. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinol* 2003; 17:309-317.
267. Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. The estradiol pharmacophore ligand structure estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 1997; 62:268-303.
268. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor β isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogen and antiestrogens. *Endocrinology* 1999; 140:5566-5578.
269. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DJ, Hagerty KL, Badve S, et al. American society of clinical oncology/ college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134:E1-E25.
270. Clark GM, McGuire WL, Hubay CA et al. Progesterone receptors as a prognostic factor in stage II breast cancer. *N Eng J Med* 1983; 309:1343-1347.
271. Osborne CK, Mc Guire WL. Therapy of cancer of the breast: current status of steroid hormone receptors. *West J Med* 1979; 130:401-407.
272. Ravdin PM, Green S, Dorr TM et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992; 10:1284-1291.
273. Hayes DF. Markers of endocrine sensitivity. *Breast Cancer Res* 2008; 10(suppl 4):518.
274. McGuire W, Carbone PP, Sears ME, et al. Estrogen receptors in human breast cancer, in McGuire WL, Carbone PP, Vollmer EP (eds): *Estrogen receptors in human breast cancer*, New York, NY, Raven Press, 1975:1-7.

275. Dowsett M, Allred C, Knox J, et al. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, alone or in combination trial. *J Clin Oncol* 2008; 26:1059-1065.
276. Rosen PP, Menendez-Botet CJ, Senie RT, et al. Estrogen receptor protein (ERP) and the histopathology of human mammary carcinoma. In: *Hormones, receptors and breast Cancer*. W.L. McGuire, ed. New York: Raven Press, 1978:71–83.
277. Lesser ML, Rosen PP, Senie RT, et al. Estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma: Correlations with epidemiology and pathology. *Cancer* 1981; 48:299–309.
278. Shousha S, Backhous CM, Alaghband-Zadeh J, et al. Alveolar variant of invasive lobular carcinoma of the breast. *Am J Clin Pathol* 1986; 85:1–5.
279. Riva C, Dainese E, Caprara C, et al. Immunohistochemical study of androgen receptors in breast carcinoma. Evidence of their frequent expression in lobular carcinoma. *Virchows Arch* 2005; 447:695–700.
280. Ellis LM, Wittliff L, Bryant MS. Correlation of estrogen, progesterone and androgen receptors in breast cancer. *Am J Surg* 1989; 157:557–581.
281. Kuenen-Boumeester V, Vanderkwast TH, VanPutten WLJ, et al. Immunohistochemical determination of androgen receptors in relation to oestrogen and progesterone receptors in female breast cancer. *Int J Cancer* 1992; 52:581–584.
282. Cameron MA. Commission of inquiry on hormone receptor testing. St John's, Newfoundland, Canada, Government of Newfoundland and Labrador, 2009.
283. Barnes DM, Harris WH, Smith P, et al. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assesmen of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. *Br J Canc* 1996; 74:1445-1451.
284. Viale G, Regan MM, Malorano E, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewd expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1- 98. *J Clin Oncol* 2007; 25:3846-3852.
285. Jalava P, Kuopio T, Huovinen R, et al. Immunohistochemical staining of estrogen and progesterone receptors: aspects for evaluating positivity and defining the cutpoints. *Anticancer Res* 2005; 25:2535-2542.
286. Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Mod Pathol* 2004; 17:1545-1554.
287. Yamashita H, Yando Y, Nishio M, et al. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer* 2006; 13:74-83.
288. Ogawa Y, Moriya T, Kato Y, et al. Immunohistochemical assessment for estrogen receptor and progesterone receptor status in breast cancer: analysis for a cut-off point as the predictor for endocrine therapy. *Breast Cancer* 2004; 11:267-275.
289. Regan MM, Viale G, Mastropasqua MG, et al. Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1571-1581.

290. Stendahl M, Ryden L, Nordenskjold B, et al. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4614-4618.
291. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 2006; 49:411-424.
292. Grube D. Constants and variables in immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol* 2004; 67:115-134.
293. Diaz LK, Sneige N. Estrogen receptor analysis for breast cancer: current issues and keys to increasing testing accuracy. *Adv Anat Pathol* 2005; 12:10-19.
294. Siedal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:1204-1207.
295. Umemura S, Itoh H, Serizawa A, et al. Immunohistochemical evaluation of hormone receptors in breast cancer: which scoring system is suitable for highly sensitive procedures. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12:8-13.
296. Umemura S, Osamura RY. Utility of immunohistochemistry in breast cancer practice. *Breast Cancer* 2004; 11:334-338.
297. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, et al. Immunohistochemical demonstration of oestrogen and progesterone receptors: correlation of standards achieved on in house tumours with that achieved on external quality assessment material in over 150 laboratories from 26 countries. *J Clin Pathol* 2000; 53:292-301.
298. Schnorrenberg F, Pattichis CS, Kyriacou K, Schizas ChN. Computer-aided detection of breast cancer nuclei. *IEEE Trans Inf Technol Biomed* 1997; 1(2):128-140.
299. Pertschuk LP, Tobin EH, Brigatti DJ, Kim DS, Bloom ND, Gaetjens E, et al. immunofluorescent detection of estrogen receptor in breast cancer: comparison with dextran-coated charcoal and sucrose gradient assays. *Cancer (Phila.)* 1978; 41:907-912.
300. Sternberger LA. *Immunohistochemistry*, Wiley, New York, 1979.
301. True LD. Quantitative immunohistochemistry: a new tool for surgical pathology? *Am J Clin Pathol* 1988; 90:324-325.
302. Lehr H-A, Mankoff DA, Corwin D, Santeusano G, Gown AM. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:1559-1565.
303. Campbell FC, Elston CW, Blamey RW, et al. Quantitative oestradiol receptor values in primary breast cancer and response of metastases to endocrine therapy. *Lancet* 1981; 2:1317-1319.
304. McClelland RA, Berger U, Miller LS, Powles TJ, Jensen EV, Coombes RC. immunohistochemical assay for estrogen receptor: relationship to outcome of therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* 1986; 46:4241s-4243s.
305. Scottish Cancer Trial Office. Adjuvant tamoxifen in the management of operable breast cancer: the Scottish trial. *Lancet* 1987; 1:171-175.
306. Kamby C, Rasmussen BB, Kristensen B. Oestrogen receptor status of primary breast carcinomas and their metastases. Relation to pattern and spread and survival after recurrence. *Br J Cancer* 1989; 60:252-257.

307. De Sombre ER, Thorpe SM, Rose C, et al. Prognostic usefulness of estrogen receptor immunohistochemical assays for human breast cancer. *Cancer Res* 1986; 46:4256s-4264s.
308. Reiner A, Neumeister B, Spona J, Reiner G, Schemper M, Jakesz R. Immunohistochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50:7057-7061.
309. Esteban JM, Ahn C, Mehta P, Battifora H. Biologic significance of quantitative estrogen receptor immunohistochemical assay by image analysis in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1994b; 102:158-162.
310. Esteban JM, Ahn C, Battifora H, Felder B. Predictive value of estrogen receptors evaluated by quantitative immunohistochemical analysis in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1994a; 102:S9-12.
311. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, et al. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988; 6:1076-1087.
312. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 351:1451-1467.
313. Szeszel MK, Crisman CL, Crow L, et al. Quantifying estrogen and progesterone receptor expression in breast cancer by digital imaging. *J Histochem Cytochem* 2005; 53:753-762.
314. Allred DC. Should immunohistochemical examination replace biochemical hormone receptor assays in breast cancer? *Am J Clin Pathol* 1993; 99:1-3.
315. Battifora H, Mehta P, Ahn C, Esteban JM. Estrogen receptor immunohistochemical assay in parafin-embedded tissue. A better gold standard? *Appl Immunohistochem* 1993; 1:39-45.
316. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry - issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology* 2006; 49(4):406-10.
317. Caussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230:1132-1139.
318. Popescu NC, King MH. Localisation of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics* 1989; 4:362-366.
319. Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198:165-184.
320. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984; 312:513-516.
321. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, et al. The product of the c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; 232:1644-1646.
322. Borgmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986; 319:226-230.
323. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10:251-337.

324. Alray I, Yarden Y. The ErbB signalling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997; 410:83-86.
325. Scott GK, Dodson JM, Montgomery PA, et al. p185HER2 signal transduction in breast cancer cells. *J Biol Chem* 1991; 266:14300-14305
326. Benz CC, Scott GK, Sarup JC, et al. Oestrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumourigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 24:85-95.
327. Hudziak RM, Schlessinger J, Ullrich A. Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumourigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7159-7163.
328. Penault-Llorca F, Balaton A, Sabourin JC, et al. Immunohistochemical evaluation of HER2 status in infiltrating breast cancers: development of technical protocol and reading of results - recommendations. *Ann Pathol* 2002; 22:150-157.
329. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:118-145.
330. Porter PL, Garcia R, Moe R, et al. C-erbB-2 oncogene protein in in situ and invasive lobular breast neoplasia. *Cancer* 1991; 68:331-334.
331. Reis-Filho JS, Simpson PT, Jones C, et al. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: Role of comprehensive molecular pathology in characterization of an entity. *J Pathol* 2005; 207:1-13.
332. Barnes DM. Expression and function of BRCA 1 and BRCA 2 in familial and sporadic breast cancer. *Histopathology* 1999; 34:170-174.
333. Hall JM, Lee MK, Newmann B, Morow JE, Anderson LA, Huey B. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250:1684-1689.
334. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA 1. *Science* 1994; 266:66-71.
335. Somasundaram K. Breast cancer gene 1 (BRCA 1): role in cell cycle regulation and DNA repair-perhaps through transcription. *J Cell Biochem* 2003; 88:1084-91.
336. Cornelis RS, Neuhausen SL, Johansson O, et al. High allele loss rates at 17q12-q21 in breast and ovarian tumors from BRCA 1-linked families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 13:203-210.
337. Wilson CA, Ramos L, Villasenor MR, et al. Localisation of human BRCA 1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nat Genet* 1999; 21:236-240.
338. Lee WY, Jin YT, Chang TW, et al. Immunolocalisation of BRCA 1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. *Histopathology* 1999; 34:106-12.
339. Yoshikawa K, Honda K, Inamoto T, et al. Reduction of BRCA 1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA 1-associated cases. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1249-1261.
340. Yang Q, Sakurai T, Mori I, et al. Prognostic significance of BRCA 1 expression in Japanese sporadic breast carcinomas. *Cancer* 2001; 92:54-60.

341. Taylor J, Lymboura M, Pace PE, et al. An important role for BRCA 1 in breast cancer progression is induced by its loss in a large proportion of non-familial breast cancers. *Int J Cancer* 1998; 79:334-42.
342. Magdinier F, Ribieras S, Lenoir GM, et al. Down-regulation of BRCA 1 in human sporadic breast cancer; analysis of DNA methylation patterns of the putative promoter region. *Oncogene* 1998; 17:3169-3176.
343. Bianco T, Chenevix-Trench G, Walsh DC, et al. Tumor-specific distribution of BRCA 1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21:147-151.
344. Chen Y, Chen CF, Riley DJ, et al. Aberrant subcellular localization of BRCA 1 in breast cancer. *Science* 1995; 270:789-791.
345. Coene E, Van Oostveldt P, Willems K, et al. BRCA 1 is localized in cytoplasmic tube-like invaginations in the nucleus. *Nat Genet* 1997; 16:122-4.
346. de Bock GH, Tollenaar RA, Papelard H, et al. Clinical and pathological features of BRCA 1 associated carcinomas in a hospital-based sample of Dutch breast cancer patients. *Br J Cancer* 2001; 85:1347-50.
347. Rosen EM, Fan S, Isaacs C. BRCA 1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocrine-Related Cancer* 2005; 12:533-548.
348. Palacios J, Robles-Frias MJ, Castilla MA, Lopez-Garcia MA, Benitez J. The molecular pathology of hereditary breast cancer. *Pathobiology* 2008; 75:85-94.
349. Roldan G, Delgado L, Muse IM. Tumoral expression of BRCA 1, estrogen receptor alpha and ID4 protein in patients with sporadic breast cancer. *Cancer Biol Therapy* 2006; 5:505-510.
350. Noguchi Sh, Kasugai T, Miki Y, Fukugtomi T, Emi M, Nomizu T. Clinicopathological analysis of BRCA 1- or BRCA 2-associated hereditary breast carcinoma in Japanese women. *Cancer* 1999; 85:2200-2205.
351. Rodriguez JA, Henderson BR. Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA 1. *J Biol Chem* 2000; 275:38585-38596.
352. Rajan JV, Wang M, Marquis ST, Chodosh LA. Brca 2 is coordinately regulated with Brca 1 during proliferation and differentiation in mammalian epithelial cells. *PNAS* 1996; 93:3078-3083.
353. Thomas JE, Smith M, Tonkinson JL, Rubinfeld B, Polakis P. Induction of phosphorylation of BRCA 1 during the cell cycle and after DNA damage. *Cell Growth Differentiation* 1997; 8:801-809.
354. Fan JA, Yuan R, Ma Y, Mena Q, Erosos MR, et al. BRCA 1 inhibitor of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science* 1999; 284:1354-1356.
355. Andersen TI, Holm R, Nesland JM, Heimdal KR, Ottestad L, Borresen AL. Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma. *Br J Cancer* 1993; 68:540-548.
356. Smith ML, Fornace AJ Jr. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells (review). *Curr Opin Oncol* 1995; 7:69-75.
357. Siziopikou KP, Prioleau JE, Harris J, Schnitt SJ. bcl-2 expression in the spectrum of preinvasive breast lesions. *Cancer* 1996; 77:499-506.
358. Lynch BJ, Holden JA, Buys SS, Neuhausen SL, Gaffney DK. Pathobiological characteristics of hereditary breast cancer. *Hum Pathol* 1998; 29:1140-1144.

359. Eerola H, Heikkilä P, Tamminen A, et al. Histopathologic features of breast tumours in BRCA 1, BRCA 2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res* 2005; 7:R93-R100.
360. Lakhani SR, van De Vijver MJ, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2 and p53 in patients with mutations in BRCA 1 and BRCA 2. *J Clin Oncol* 2002; 20:2310-2318.
361. Crook T, Brooks LA, Crossland S, et al. p53 mutation with frequent novel codons but not a mutator phenotype in BRCA 1 and BRCA 2 associated breast tumours. *Oncogene* 1998; 17:1681-1689.
362. Phillips KA, Nichol K, Ozelik H, et al. Frequency of p53 mutations in breast carcinomas from Ashkenazi Jewish carriers of BRCA 1 mutations. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:469-473.
363. Greenblatt MS, Chappuis PO, Bond JP, Hamel N, Foulkes WD. TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA 1 or BRCA 2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. *Cancer Res* 2001; 61:4092-4097.
364. Domagala W, Markiewski M, Kubiak R, et al. Immunohistochemical profile of invasive lobular carcinoma of the breast: Predominantly vimentin and p53 protein negative cathepsin D and oestrogen receptor positive. *Virchows Arch [A]* 1993; 423:497-502.
365. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31:13 - 20.
366. De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007; 96:1504-1513.
367. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010; 11:174-183.
368. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:7212-7220.
369. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B and Senn HJ; panel members: Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009; 20:1319-1329.
370. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, et al. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2010; 1:747-754.
371. De Leeuw WJ, Berx G, Vos CB, et al. Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *J Pathol* 1997; 183:404-411.
372. Acs G, Lawton TJ, Livolsi VA, et al. Differential expression of E-cadherin in ductal and lobular carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 2000; 13:17A.
373. Wahed A, Connelly J, Reese T. E-cadherin expression in pleomorphic lobular carcinoma: An aid to differentiation from ductal carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2002; 6:349-351.

374. Qureshi HS, Linden MD, Divine G, et al. E-cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters. *Am J Clin Pathol* 2006; 125:377–385.
375. Harigopal M, Shin SJ, Murray MP, et al. Aberrant E-cadherin staining patterns in invasive mammary carcinoma. *World J Surg Oncol* 2005; 3:73–83.
376. Huiping C, Sigurgeirsdottir JR, Jonasson JG, et al. Chromosome alterations and E-cadherin gene mutations in human lobular breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 81:1103–1110.
377. Palacios J, Sarrio D, Garcia-Macias MC, et al. Frequent E-cadherin gene inactivation by loss of heterozygosity in pleomorphic lobular carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 2003; 16:674–678.
378. Nyante SJ, Derries S, Chen YY, et al. Array-based comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ and synchronous invasive lobular cancer. *Hum Pathol* 2004; 35:759–763.
379. Hwang ES, Nyante SJ, Chen YY, et al. Clonality of lobular carcinoma in situ and synchronous invasive lobular carcinoma. *Cancer* 2004; 100:2562–2572.
380. Dabbs DJ, Kaplai M, Chivukula M, et al. The spectrum of morphomolecular abnormalities of the E-cadherin/catenin complex in pleomorphic lobular carcinoma of the breast. *Applied immunohistochemistry and molecular morphology* 2007; 15:260–266.
381. Dabbs DJ, Bhargava R, Chivukula M. Lobular versus ductal breast neoplasms: the diagnostic utility of P120 catenin. *Amer J Surg Pathol* 2007; 31:427–437.
382. Brandt S, Chen YB, Chadwick P, Shin SJ. Is P120 as effective a E-cadherin (Ecad) in distinguishing lobular (L) from ductal (D) carcinomas of the breast? *Mod Pathol* 2008; 21(suppl 1):24A.
383. Naidu R, Wahab NA, Yadav MM, et al. Expression and amplification of cyclin D1 in primary breast carcinomas: Relationship with histopathological types and clinicopathological parameters. *Oncol Rep* 2002; 9:409–416.
384. Geradts J, Hruban R, Schutte M, Kern S, Maynard R. Immunohistochemical p16^{INK4a} analysis of archival tumors with deletion, hypermethylation, or mutation of the CDKN2/MTS1 gene: a comparison of four commercial antibodies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000; 8:71-9.
385. Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln CE. Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16^{ink4A} in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. *Cancer Res* 1995; 55:6006-6011.
386. Martinazzi M, Crivelli F, Zampatti C, et al. Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry in different histological types of infiltrating breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1993; 46:1009–1110.
387. Charpin C, Devictor B, Bonnier P, et al. Epidermal growth factor receptor in breast cancer: Correlation of quantitative immunocytochemical assays to prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 25:203–210.
388. Laakso M, Loman N, Borg A, Isola J. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Mod Pathol* 2005; 18:1321-1328.

389. Mazoujian G, Pincus GS, Davis S, et al. Immunohistochemistry of a breast gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15): A marker of apocrine epithelium and breast carcinomas with apocrine features. *Am J Pathol* 1983; 110:105–111.
390. Mazoujian G, Bodian C, Haagensen DE Jr, et al. Expression of GCDFP-15 in breast carcinomas. Relationship to pathologic and clinical factors. *Cancer* 1989; 63:2156–2161.
391. Nesland JM, Holm R, Johannessen JV. Ultrastructural and immunohistochemical features of lobular carcinoma of the breast. *J Pathol* 1985; 145:39–52.
392. Lee AK, Rosen PP, DeLellis RA, et al. Tumor marker expression in breast carcinomas and relationship to prognosis. An immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 1985; 84:687–696.
393. Kuhajda FP, Offutt LE, Mendelsohn G. The distribution of carcinoembryonic antigen in breast carcinoma. Diagnostic and prognostic implications. *Cancer* 1983; 52:1257–1264.
394. Lee AK, DeLellis RA, Rosen PP, et al. Alphalactalbumin as an immunohistochemical marker for metastatic breast carcinomas. *Am J Surg Pathol* 1984; 8:93–100.
395. Gould VE, Chejfec G. Lobular carcinoma of the breast with secretory features. *Ultrastruct Pathol* 1980; 1:151–156.
396. Jundt G, Schulz A, Heitz PU, et al. Small cell neuroendocrine (oat cell) carcinoma of the male breast. *Virchows Arch [A]* 1984; 404:213–221.
397. Kline TS, Kannan V, Kline IK. Appraisal and cytomorphologic analysis of common carcinomas of the breast. *Diagn Cytopathol* 1985; 1:188–193.
398. Oertel YC. Fine needle aspiration of the breast. Stoneham: M.A. Butterworth, 1987:145–149.
399. Lerma E, Furmanal V, Carreras A, et al. Undetected invasive lobular breast cancer: Review of false negative smears. *Mod Pathol* 2000; 13:37A.
400. Sadler GP, McGee S, Dallimore NS, et al. Role of fine-needle aspiration cytology and needle-core biopsy in the diagnosis of lobular carcinoma of the breast. *Br J Surg* 1994; 81:1315–1317.
401. Skaane P, Skjorten F. Ultrasonographic evaluation of invasive lobular carcinoma. *Acta Radiol* 1999; 40:369–375.
402. Jayaram G, Swain M, Chew MT, et al. Cytologic appearances in invasive lobular carcinoma of the breast. A study of 21 cases. *Acta Cytol* 2000; 44:169–174.
403. Robinson IA, McKee G, Jackson PA, et al. Lobular carcinoma of the breast: Cytological features supporting the diagnosis of lobular cancer. *Diagn Cytopathol* 1995; 13:196–201.
404. Auger M, Huttner I. Fine-needle aspiration cytology of pleomorphic lobular carcinoma of the breast. Comparison with the classic type. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 1997; 81:29–32.
405. Greeley CF, Frost AR. Cytologic features of ductal and lobular carcinoma in fine needle aspirates of the breast. *Acta Cytologica* 1997; 41:333–340.
406. Ozzello L. Ultrastructure of intra-epithelial carcinomas of the breast. *Cancer* 1971; 28:1508–1515.

407. Andersen JA. The basement membrane and lobular carcinoma in situ of the breast. A light microscopical study. *Acta Pathol Microbiol Scand (A)* 1975; 83:245–250.
408. Shousha S, Bull TB, Burn I. Alveolar variant of invasive lobular carcinoma of the breast. *Ultrastruct Pathol* 1986; 10:311–319.
409. Nesland JM, Holm R, Lunde S, et al. Diagnostic problems in breast pathology: The benefit of ultrastructural and immunocytochemical analysis. *Ultrastruct Pathol* 1987; 11:293–311.
410. Pandis N, Idvall I, Bardi G, et al. Correlation between karyotypic pattern and clinicopathologic features in 125 breast cancer cases. *Int J Cancer* 1996; 66:191–196.
411. Frost AR, Karcher DS, Terahata S, et al. DNA analysis and S-phase fraction determination by flow cytometric analysis of infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 1996; 9:930–937.
412. Bodian CA, Perzin KH, Lattes R, et al. Prognostic significance of benign proliferative breast disease. *Cancer* 1993; 71:3896–3907.
413. Collins L, Baer H, Tamimi R, et al. Magnitude and laterality of breast cancer risk in women with atypical hyperplasia of ductal and lobular types. *Mod Pathol* 2006; 19(Suppl.1):24A.
414. Page DL, Schuyler PA, Dupont WD, et al. Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: A retrospective cohort study. *Lancet* 2003; 361:125–129.
415. McLaren BK, Schuyler PA, Sanders ME, et al. Excellent survival, cancer type and Nottingham grade after atypical lobular hyperplasia in initial breast biopsy. *Cancer* 2006; 107:1227–1233.
416. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1371–1388.
417. Frost AR, Terahata S, Siegel RS, et al. An analysis of prognostic features in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 1995; 8:830–836.
418. Cha I, Weidner N. Correlation of prognostic factors and survival with classical and pleomorphic variants of invasive lobular carcinoma. *Breast J* 1996; 2:385–393.
419. Weidner N, Bennington J. Correlation of DNA ploidy, DNA S-phase and nuclear diameter with classical and pleomorphic variants of invasive lobular carcinoma. *Lab Invest* 1994; 70:24A.
420. Fowble B, Yeh IT, Schultz DJ, et al. The role of mastectomy in patients with stage I-II breast cancer presenting with gross multifocal or multicentric disease or diffuse microcalcifications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 27:567–573.
421. Vlastos G, Rubio IT, Mirza NQ, et al. Impact of multicentricity on clinical outcome in patients with T1-2, N0-1, M0 breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2000; 7:581–587.
422. Yeatman TJ, Cantor AB, Smith TJ, et al. Tumor biology of infiltrating lobular carcinoma. Implications for management. *Ann Surg* 1995; 222:549–561.
423. Singletary SE, Patel-Parekh L, Bland K. Treatment trends in early-stage invasive lobular carcinoma: A report from the National Cancer Data Base. *Ann Surg* 2005; 242:281–289.

424. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer* 1996; 77:113–120.
425. Poen JC, Tran L, Juillard G, et al. Conservation therapy for invasive lobular carcinoma of the breast. *Cancer* 1992; 69:2789–2795.
426. Haffty BG, Perrotta PL, Ward B, et al. Conservatively treated breast cancer: Outcome by histologic subtype. *Breast J* 1997; 3:7–14.
427. Francis M, Cakir B, Bilous M, et al. Conservative surgery and radiation therapy for invasive lobular carcinoma of the breast. *Aust N Z J Surg* 1999; 69:450–454.
428. Chung MA, Cole B, Wanebo HJ, et al. Optimal surgical treatment of invasive lobular carcinoma of the breast. *Ann Surg Oncol* 1997; 4:545–550.
429. Morrow M, Keeney K, Scholtens D, et al. Selecting patients for breast-conserving therapy. The importance of lobular histology. *Cancer* 2006; 106:2563–2568.
430. Warneke J, Berger R, Johnson C, et al. Lumpectomy and radiation treatment for invasive lobular carcinoma of the breast. *Am J Surg* 1996; 172:496–500.
431. Santiago RJ, Harris EER, Quin L, et al. Similar long-term results of breast-conservation treatment for stage I and II invasive lobular carcinoma compared with invasive duct carcinoma of the breast. The University of Pennsylvania experience. *Cancer* 2006; 103:2447–2454.
432. Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, et al. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J Clin Oncol* 2005; 23:41–48.
433. Yeatman TJ, Lyman GH, Smith SK, et al. Bilaterality and recurrence rates for lobular breast cancer: Considerations for treatment. *Ann Surg Oncol* 1997; 4:198–202.
434. Lacroix M, Leclercq G. About GATA3, HNF #A and XBP, three genes co-expressed with estrogen alpha gene (ESR1) in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 219:1-7.
435. Stoll BA. Hormonal management in breast cancer. Lippincot, Philadelphia 1969:3-5.
436. Wolmark N, Dunn K. The role of tamoxifen in breast cancer prevention: issues sparked by the NSABP breast cancer prevention trial (P-1). *Ann NY Acad Sci* 2001; 949:99-108.
437. Beatson CT. On treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* 1896; 2:104-111.
438. Allen E, Doisy EA. An ovarian hormone: preliminary report on its localisation, extraction, and partial purification, and action in test animals. *JAMA* 1923; 81:819-821.
439. Jordan VC. Third annual William L McGuire memorial lecture: studies on the estrogen receptor in breast cancer - 20 years as a target for the treatment and prevention of cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36:267-285.
440. Horwitz KB, Jackson TA, Bain DC, Richer JK, Jakimoto GS, Tung L. Nucleus receptor coactivations and corepressors. *Mol Endocrinol* 1996; 10:1167-1177.
441. Buckley MM-T, Goa KL. Tamoxifen: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use. *Drugs* 1989; 37:451-490.

442. Sunderlend MA, Osborne CK. Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer. A review. *J Clin Oncol* 1991; 9:1283-1297.
443. Langan Fahey SM, Jordan VC, Fritz NF, Robinson SP, Waters D, Torney DC. Clinical Pharmacology and endocrinology of long term tamoxifen treatment of breast cancer. *Madison University of Wisconsin* 1994:27-56.
444. Lien EA, Solheim E, Ueled PM. Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady.state treatment. *Cancer Res* 1991; 51:4837-4844.
445. Osborne CK, Elledge RM, Fuqua SAW. Estrogen receptors in breast cancer therapy *Science Med* 1996; 3:32-41.
446. Ellis PA, Sacconi-Jotti G, Clarke R. Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1997; 72:608-613.
447. Buzdar AU, Marcus C, Holmes F. Phase II evaluation of Ly 156758 in metastatic breast cancer. *Oncology* 1998; 45:344-349.
448. Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 2003; 348:618-629.
449. Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, et al. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2006; 355:125-137.
450. Evans CT, Ledesma DB, Schulz TZ, Simpson ER, Mendelson CR. Isolation and characterisation of a complementary DNA specific for human aromatase-system cytochrome P-450 mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 3:6387-6391.
451. Miller WR, Hawkins RA, Forrest AP. Significance of aromatase activity in human breast cancer. *Cancer Res* 1982; 42:3365-3368.
452. Longcope C, Baker R, Johnston CC Jr. Androgen and estrogen metabolism: relationship to obesity. *Metabolism* 1986; 35:235-242.
453. Miller WR, Dixon JM. Local endocrine effects of aromatase inhibitors within the breast. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 79:93-102.
454. Howell A. Preliminary experience with pure antiestrogens. *Clin Cancer Res* 2001; 7:4369-4375s; discussion 4411s-4412s.
455. Howell A, DeFriend D, Robertson J, Blamey R, Walton P. Response to a specific antioestrogen (ICI 182780) in tamoxifen resistant breast cancer. *Lancet* 1995; 7, 345:29-30.
456. Kumar KS, Kumar MMJ. Antiestrogen therapy for breast cancer: an overview. *Cancer Therapy* 2008; 6:655-664.
457. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO et al. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridisation (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 2003; 199:418-423.
458. Ilić I, Randelović P, Ilić R, Katić V, Milentijević M, Veličković Lj, et al. An approach to malignant mammary phyllodes tumors detection. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66(4):277-82.
459. Allred DC, Clark GM, Elledge R, et al. Association of p53 protein expression with tumour cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:200-206.

460. Rakha EA, El-Sheikh SA, Kandil MA, El-Sayed MA, Green AR, Ellis IO. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Human Pathol* 2008; 39:857-865.
461. Živković V, Petrović A, Đorđević B, Katić V, Gligorijević J, Pavlović V, Krstić M. Computer-assisted quantitative analysis of Ki-67 antigen in dysplasia-associated lesions or masses in ulcerative colitis. *Vojnosanit Pregl* 2007; 64(11):753-758.
462. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining for color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001; 23(4):291-299.
463. Badve SS, Baehner FI, Gray RP, et al. Estrogen- and progesterone-receptor status in ECOG 2197: comparison of immunohistochemistry by local and central laboratories and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction by central laboratory. *J Clin Oncol* 2008; 26:2473-2481.
464. Mihailović D. Komparativna morfometrijska i histohemijska studija displazija sluzokože želuca. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu, 1990.
465. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligandbinding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(5):1474–1481.
466. Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Julian Hill J, et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a southwest oncology study. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 2000; 89:111–117.
467. Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Modern Pathology* 2008, 21:S8–S15.
468. Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, Miron A, Iglehart JD, Richardson AL. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 91(2):179-186.
469. Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1997; 57(16):3347-3350.
470. Geradts J, Ingram ChD. Abnormal expression of cell cycle regulatory proteins in ductal and lobular carcinomas of the breast. *Mod Pathol* 2000; 13(9):945-953.
471. Simpson PT, Reis-Filho JS, Lambros MBK, Jones C, Steele D, Mackay A, et al. Molecular profiling pleomorphic lobular carcinomas of the breast: evidence for a common molecular genetic pathway with classic lobular carcinomas. *J Pathol* 2008; 215:231-244.
472. Howedy AA, Virtanen I, Laitinen L, Gould NS, Koukoulis GK, Gould VE. Differential distribution of tenascin in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. *Lab Invest* 1990; 63:798-806.
473. Koukoulis GK, Howedy AA, Korhonen M, Virtanen I, Gould VE. Distribution of tenascin, cellular fibronectins and integrins in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1993; 25:285-295.
474. Adams M, Jones JL, Walker RA, Pringle JH, Bell SC. Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res* 2002; 62:3289-3297.

475. Nara Y, Kato Y, Torii Y, Tsuju Y, Nakagaki S, Goto S, et al. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human breast tumours with special reference to PG-M/versican. *Histochem J* 1997; 29:21-30.
476. Ricciardelli C, Brooks JH, Suwivat S, et al. Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1054-1060.
477. Suwivat S, Ricciardelli C, Tammi R, et al. Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2491-2498.
478. d'Ardenne AJ, Burns J, Sykes BC, et al. Fibronectin and type III collagen in epithelial neoplasms of gastrointestinal tract and salivary gland. *J Clin Pathol* 1983; 36:756-763.
479. d'Ardenne AJ, Barnard NJ. Paucity of fibronectin in invasive lobular carcinoma of breast. *J Pathol* 1989; 157:219-224.
480. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 2006; 5:1597-1601.
481. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121:335-348.
482. Qu Zh, Van Ginkel S, Roy AM, et al. Vascular endothelial growth factor reduces tamoxifen efficacy and promotes metastatic colonisation and desmoplasia in breast tumors. *Cancer Res* 2008; 68(15):6232-6240.
483. Silverstein MJ, Lewinsky BS, Waisman JR, et al. Infiltrating lobular carcinoma. Is it different from infiltrating duct carcinoma? *Cancer* 1994; 73:1673-1677.
484. Moreno-Elola A, Aguilar A, Roman JM, et al. Prognostic factors in invasive lobular carcinoma of the breast: A multivariate analysis. A multicentre study after seventeen years of follow-up. *Ann Chir Gynaecol* 1999; 88:252-258.
485. Leonard CE, Philpott P, Shapiro H, et al. Clinical observations of axillary involvement for tubular, lobular, and ductal carcinomas of the breast. *J Surg Oncol* 1999; 70:13-20.
486. Jayasinghe UW, Bilous AM, Boyages J. Is survival from infiltrating lobular carcinoma different from that of infiltrating ductal carcinoma? *Breast J* 2007; 13:479-485.
487. Katzenellenbogen BY, Kendra I, Norman J, Berthois Y. Proliferation, hormone responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cells grow in the short term and long term absence of estrogens. *Cancer Res* 1987; 47:4355-4360.
488. Rose C. Therapeutic effect of tamoxifen related to estrogen receptor level. *Recent Results Cancer Res* 1980; 71:134-141.
489. Kumar MJ, Ponvijau KS, Nandhini R, et al. A mouse model for luminal epithelial like ER positive subtype of human breast cancer. *BMC Cancer* 2007; 7:180.
490. Fisher B, Redmond C, Brown A, et al. Treatment of primary breast cancer with chemotherapy and tamoxifen. *N Engl J Med* 1981; 305:1-6.

491. Fisher B, Redmond C, Brown A, et al. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1983; 1:227-241.
492. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005; 19:833-842.
493. Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, et al. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res* 2008; 68:826-833.
494. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, et al. Targeted therapy in breast cancer: the HER2 gene and protein. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3:379-398.
495. Hanna W, Gelmon KA. Review of the literature on HER2 testing and the role of HER2 as a prognostic and predictive factor in breast cancer - update December 2000 to July 2001. *Current Oncology* 2002; 9(suppl 1):S2-17.
496. Menard S, Fortis S, Castiglioni F, et al. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology* 2001; 61(suppl 2):67-72.
497. Ross JS, Fletcher JA. The HER2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 1998; 16:413-428.
498. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, et al. Prognostic value of c-erbB2 expression in breast cancer. *J Surg Oncol* 2002; 79:216-223.
499. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg* 2002; 235:10-26.
500. Yamauchi H, Sterns V, Hayes DF. When is a tumour marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:2334-2356.
501. Fraser JA, Reeves JR, Stanton PD, et al. A role for BRCA1 in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88:1263-1270.
502. Chambon M, Nirde P, Gleizes M, et al. Localization of BRCA1 protein in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79:107-119.
503. Glait C, Ravid D, Lee SW, et al. Caveolin-1 controls BRCA1 gene expression and cellular localization in human breast cancer cells. *FEBS Lett* 2006; 580:5268-5274.
504. Wilson CA, Payton MN, Elliott GS, et al. Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of BRCA1 and the splice variant BRCA1-delta11b. *Oncogene* 1997; 14:1-16.
505. Roylance R, Gorman P, Harris W, et al. Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59:1433-1436.
506. Fan S, Yuan R, Ma Y. et al. BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells *Science* 1999; 284:1354-1356.
507. Fan S, Ma Y, Wang C, et al. p300 Modulates the BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Cancer Res* 2002; 62:141-151.
508. Kawai H, Li H, Chun P, Avraham S, Avraham HK. Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21:7730-7739.

509. Verhoog LC, Brekelmans CT, Seynaeve C, et al. Survival and tumor characteristics of breast-cancer patients with germline mutations of BRCA1. *Lancet* 1998; 351:316-321.
510. Robson ME, Chappius PO, Satagopan J, et al. A combined analyses of outcome following breast cancer differences in survival based on BRCA1/BRCA2 mutation status and administration of adjuvant treatment. *Breast Cancer Res* 2004; 6:R8-R17.
511. Archey WB, McEachern KA, Robson M, et al. Increased CpG methylation of the estrogen receptor gene in BRCA1-linked estrogen receptor-negative breast cancers. *Oncogene* 2002; 21:7034-7041.
512. King TA, Gemignani ML, Li W, et al. Increased progesterone receptor expression in benign epithelium of BRCA1-related breast cancers. *Cancer Res* 2004; 64:5051-5053.
513. Karp SE, Tonin PN, Begin LR, et al. Influence of BRCA1 mutations on nuclear grade and estrogen receptor status of breast carcinoma in Ashkenazi Jewish women. *Cancer* 1997; 80:435-441.
514. Foulkes WD, Metcalfe K, Sun P, et al. Estrogen receptor status in BRCA1- and BRCA2-related breast cancer: the influence of age, grade, and histological type. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2029-2034.
515. Marcus JN, Watson P, Page DL, et al. Hereditary breast cancer pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer* 1996; 77:697-709.
516. Mac Lachlan TK, Dash BC, Dicker DT, El-Deiry WS. Repression of BRCA1 through a feedback loop involving p53. *J Biol Chem* 2000; 275:31869-31875.
517. Xu B, Kastan MB. Involvement of BRCA1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 2001; 21:3445-3450.
518. Harkin DP, Bean JM, Miklos D, et al. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell* 1999; 97:575-586.
519. Pao GM, Janknecht R, Ruffner H, Hunter T, Verma IM. CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 97:1020-1025.
520. Brodie SG, Deng CX. BRCA1-associated tumorigenesis: what have we learned from knockout mice? *Trends Genet* 2001; 17:S18-22.
521. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1482-1485.
522. Grushko TA, Blackwood MA, Schumm PL, et al. Molecular-cytogenetic analysis of HER-2/neu gene in BRCA1-associated breast cancers. *Cancer Res* 2002; 62:1481-1488.
523. Lakhani SR, Easton DF, Stratton MR. Consortium tBCL. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. *Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet* 1997; 349:1505-1510.
524. Armes JE, Egan AJ, Southey MC, et al. The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before age 40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations: a population-based study. *Cancer* 1998; 83:2335-2345.

525. Johansson OT, Idvall I, Anderson C, et al. Tumour biological features of BRCA1-induced breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33:362-371.
526. Eisinger F, Nogues C, Guinebretiere JM, et al. Novel indications for BRCA1 screening using individual clinical and morphological features. *Int J Cancer* 1999; 84:263-267.
527. Chappuis PO, Nethercot V, Foulke WD. Clinico-pathological characteristics of BRCA1- and BRCA2-related breast cancer. *Semin Surg Oncol* 2000; 18:287-295.
528. Lakhani SR, Gusterson BA, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. *Clin Cancer Res* 2000; 6:782-789.
529. Armes JE, Trute L, White D, et al. Distinct molecular pathogenesis of early-onset breast cancers in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a population-based study. *Cancer Res* 1999; 59:2011-2017.
530. Phillips KA, Andrulis IL, Goodwin PJ. Breast carcinomas arising in carriers of mutations in BRCA1 or BRCA2 are they prognostically different? *J Clin Oncol* 1999; 17:3653-3663.
531. Quenneville LA, Phillips KA, Ozcelik H, et al. HER-2/neu status and tumor morphology of invasive breast carcinomas in Ashkenazi women with know BRCA1 mutation status in the Ontario familial breast cancer registry. *Cancer* 2002; 95:2068-2075.
532. Adem C, Soderberg CL, Hafner K, et al. ERBB2, TBX2, RPS6KB1 and MYC alterations in breast tissues of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Gene Chromosomes and Cancer* 2004; 41:1-11.
533. Berns EM, Dirkwager-Kiel MJ, Kuenen-Boumeester V, et al. Androgen pathway dysregulation in BRCA1-mutated breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79:121-127.
534. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS* 2003; 100:8418-8423.
535. Ozcelik H, To MD, Couture J, Bull SB, Andrulis IL. Preferential allelic expression can lead to reduced expression of BRCA1 in sporadic breast cancers. *International J Cancer* 1998; 77:1-6.
536. Rio PG, Maurizis JC, Peffault de Latour M, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. Quantification of BRCA1 protein in sporadic breast carcinoma with or without loss of heterozygosity of the BRCA1 gene. *International J Cancer* 1999; 80:823-826.
537. Wilson CA, Ramos L, Villasenor MR, et al. Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nature Genetics* 1999; 21:236-240.
538. Rice JC, Massey-Brown KS, Futscher BW. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene* 1998; 17:1807-1812.
539. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:564-569.
540. Staff S, Isola J, Tanner M. Haplo-insufficiency of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63:4978-4983.

541. Fisher B, Constantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1371-1388.
542. Shih HA, Couch FJ, Nathanson KL, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation frequency in women evaluated in a breast cancer risk evaluation clinic. *J Clin Oncol* 2002; 20:994-999.
543. Hakansson S, Johannsson O, Johansson U, et al. Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 1997; 60:1068-1078.
544. Serova OM, Mazoyer S, Puget N, et al. Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: are there more breast cancer-susceptibility genes? *Am J Hum Genet* 1997; 60:486-495.
545. Meindl A. Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. *Int J Cancer* 2002; 97:472-480.
546. van Beers EH, van Welsem T, Wessels LF, et al. Comparative genomic hybridization profiles in human BRCA1 and BRCA2 breast tumors highlight differential sets of genomic aberrations. *Cancer Res* 2005; 65:822-827.
547. Osorio A, Barroso A, Martinez B, et al. Molecular analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in 32 breast and/or ovarian cancer Spanish families. *Br J Cancer* 2000; 82:1266-1270.
548. Diez O, Osorio A, Duran M, et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat* 2003; 22:301-312.
549. Querzoli P, Albonico G, di Iasio M.G, Ferretti S, Rinaldi R, Cariello A, et al. Biophenotypes and survival of BRCA1 and TP53 deleted breast cancer in young women. *Breast Canc Res & Treatment* 2001; 66:135-142
550. Wiesner FG, Magener A, Fasching PA, et al. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. *Breast* 2009; 18:135-141.
551. Penault-Liorca F, Andre F, Sagan C, et al. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:2809-2815.
552. Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, et al. The utility of mitotic index, estrogen receptor and Ki-67 measurements in the creation of novel prognostic indices for node-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 1999; 25:356-363.
553. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Arima N. Clinical significance of Ki-67 in neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer as a predictor for chemosensitivity and for prognosis. *Breast Cancer* 2009; 4: e-pub ahead of print.
554. Chang J, Powles TJ, Allred DC, et al. Prediction of clinical outcome from primary tamoxifen by expression of biologic markers in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6:616-621.
555. Makris A, Powles TJ, Allred DC, et al. Changes in hormone receptors and proliferation markers in tamoxifen treated breast cancer patients and the relationship with response. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 48:11-20.

556. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, et al. IMPACT Trialists Group: prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:167-170.
557. Zou D, Yoon H-S, Perez D, Weeks RJ, Guilford P, Humar B. Epigenetic silencing in non-neoplastic epithelia identifies E-cadherin (CDHI) as a target for chemoprevention of lobular neoplasia. *J Pathol* 2009; 218:265-272.
558. Elshaer M. Histopathological and immunohistochemical study of E-cadherin in breast neoplasia. *J Med Sci* 2007; 7(5):740-747.
559. Bukholm IK, Nesland JM, Kåresen R, Jacobsen U, Børresen-Dale A-L. Expression of E-cadherin and its relation to the p53 protein status in human breast carcinomas. *Virchows Arch* 1997; 431:317-321.
560. Bratthauer GL, Moinfar F, Stamatakis MD, et al. Combined E-cadherin and high molecular weight cytokeratin immunoprofile differentiates lobular, ductal, and hybrid mammary intraepithelial neoplasias. *Hum Pathol* 2002; 33:620-627.
561. Jacobs TW, Pliss N, Kouria G, et al. Carcinomas in situ of the breast with indeterminate features. Role of E-cadherin staining in categorization. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:229-236.
562. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62:1613-1618.
563. Kanai Y, Oda T, Tsuda H, et al. Point mutation of the E-cadherin gene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85:1035-1039.
564. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, et al. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 1995; 14:6107-6115.
565. Layfield LJ, Saria E, Mooney EE, et al. Tissue heterogeneity of immunohistochemically detected estrogen receptor. Implications for image analysis quantification. *Am J Clin Pathol* 1998; 110:758-764.
566. Douglas-Jones AG, Collett N, Morgan JM, et al. Comparison of core oestrogen receptor (ER) assay with excised tumour: intratumoral distribution of ER in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2001; 54:951-955.
567. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival. An overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365:1687-1717.
568. Bengtsson E. Computerized cell image analysis: past, present, and future. Image analysis: 13th Scandinavian Conference. SCIA 2003 Halmstad Sweden 2003. *Proceedings Vol 2749/2003. Lecture Notes in Computer Science*. Berlin/Heidelberg: Springer 2003; 395-407.
569. Bearman G, Levenson R. Biological imaging spectroscopy. In Vo-Dinh T ed. *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton; CRC Press 2003; 818-826.
570. Press MF, Sauter G, Bernstein L, et al. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res* 2005; 11:6598-6607.
571. Taylor CR. Standardization in immunohistochemistry: the role of antigen retrieval in molecular morphology. *Biotechnic Histochem* 2006; 81:3-12.

572. Leong AS-Y. Quantification in immunohistology. Factt or fiction? A discussion of variables that influence results. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12:1-7.
573. O'Leary TJ. Standardization in immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001; 9:3-8.
574. Taylor CR. Quantifiable internal reference standards for immunohistochemistry. The measurement of quantity by weight. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14:253-259.
575. Kim YJ, Romeike BF, Uszkoreit J, Feiden W. Automated nuclear segmentation in the determination of the Ki-67 labeling index in meningiomas. *Clin Neuropathol* 2006; 25(2):67-73.
576. Raymond WA, Leong AS. Oestrogen receptor staining of paraffin-embedded breast carcinomas following short fixation in formalin: a comparison with cytosolic and frozen section receptor analyses. *J Pathol* 1990; 160:295-303.
577. Molino A, Micciolo R, Turazza M, et al. Estrogen receptors in 699 primary breast cancers: a comparison of immunohistochemical and biochemical methods. *Breast Cancer Res* 1995; 34:221-228.
578. Pertschuk LP, Feldman JG, Kim Y-D, et al. Estrogen receptor immunocytochemistry in paraffin embeded tissues with ER1D5 predicts breast cancer endocrine response more accuarately than H222Sp-gamma in frozen sections or cytosol-based ligand-binding assays. *Cancer* 1996; 77:2514-2519.
579. 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; 189:862-866.
580. Detre S, Saclani-Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 1995; 48:876-878.
581. Sklarew RJ, Bodmer SC, Pertschuk LP. Quantitative imaging of immunocytochemical (PAP) estrogen receptor staining patterns in breast cancer sections. *Cytometry* 1990; 11:359-378.
582. Baddoura FK, Cohen C, Unger ER, De Rose PB, Chenggis M. Image analysis for quantification of estrogen receptor in formalin-fixed paraffin-embeded sections of breast carcinoma. *Mod Pathol* 1991; 4:91-95.
583. el-Badawy N, Cohen C, De Rose PB, Check IJ, Sgoutas D. Immunohistochemical progesterone receptor assay. Measurement by image analysis. *Am J Clin Pathol* 1991; 96:704-710.
584. Aziz DC. Quantitation of estrogen and progesterone receptors by immunocytochemical and image analysis. *Am J Clin Pathol* 1992; 98:105-111.
585. Auger M, Katz RL, Johnston DA, Sneige N, Ordonez NG, Fritsche H. Quantitation of immunocytochemical estrogen and progesterone receptor content in fine needle aspirates of breast carcinoma using the SAMBA 4000 image analysis system. *Anal Quant Cytol Histol* 1993; 15:274-280.
586. Jagoe R, Steele JH, Vucicevic V, et al. Observer variation in quantification of immunocytochemistry by image analysis. *Histochem J* 1991; 23:541-547.

587. Wied GL, Bartels PH, Bibbo M, Dych HE. Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. *Hum Pathol* 1989; 20:549-571.
588. Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, et al. Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19:1865-1878.
589. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, et al. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol* 2000; 53:125-130.
590. Ikpatt OF, Kuopio T, Collan Y. Nuclear morphometry in african breast cancer. *Image Anal Stereol* 2002; 21:145-150.
591. Baak JP, van Diest PJ, Benraadt T, et al. The multicenter morphometric mammary carcinoma project (MMMCP) in the Netherlands: value of morphometrically assessed proliferation and differentiation. *J Cell Biochem Suppl* 1993; 179:220-225.
592. Kronqvist P, Kuopio T, Collan Y. Morphometric grading of invasive ductal breast cancer: thresholds for nuclear grade. *Br J Cancer* 1998; 78(6):800-805.
593. Sneige N, Wang J, Baker BA, Krishnamurthy S, Middleton LP. Clinical, histopathologic and biologic features of pleomorphic lobular (ductal-lobular) carcinoma in situ of the breast: a report of 24 cases. *Mod Pathol* 2002; 15:1044-1050.
594. Frolik D, Caduff R, Varga Z. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: its cell kinetics, expression of oncogenes and tumour suppressor genes compared with invasive ductal carcinomas and classical infiltrating lobular carcinomas. *Histopathology* 2001; 39:503-513.
595. Varga Z, Zhao J, Ohlschlegel C, Odermatt B, Heitz PU. Preferential HER-2/neu over-expression and/or amplification in aggressive histological subtypes of invasive breast cancer. *Histopathology* 2004; 44:332-338.
596. Baak JPA, van Dop H, Kurver PH, Herman J. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 1985; 56:374-382.
597. Baak JPA. Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis. Springer-Verlag; Berlin 1992:158.
598. Collan Y, Torkkeli T, Pesonen E, et al. Application of morphometry in tumor pathology. *Anal Quant Cytol Histol* 1987; 9:79-88.
599. Van der Linden HC, Baak JPA, Smeulders AWM, Lindeman J, Meyer CJLM. Morphometry of breast cancer. I. Comparison of the primary tumor and the axillary lymph node metastases. *Path Res Pract* 1986; 181:236-242.
600. Friedrich K, Dimmer V, Haroske G, Meyer W, Theissig F, Kunze KD. Correlation between p53 status, DNA ploidy, proliferation rate and nuclear morphology in breast cancer. An image cytometric study. *Anal Cell Pathol* 1997; 15(2):85-97.
601. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005; 205:248-254.
602. Roylance R, Gorman P, Hanby A, Tomlinson I. Allelic imbalance analysis of chromosome 16q shows that grade I and grade III invasive ductal breast cancers follow different genetic pathways. *J Pathol* 2002; 196:32-36.

603. Reis-Filho JS, Simpson PT, Gale T, Lakhani SR. The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization. *Pathol Res Pract* 2005; 201:713-725.
604. Stange DE, Radlwimmer B, Schubert F, et al. High-resolution genomic profiling reveals association of chromosomal aberrations on 1q and 16p with histologic and genetic subgroups of invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:345-352.
605. Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, et al. Comparative genomic hybridisation of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol* 1999; 187:396-402.
606. Landini G. Quantitative analysis of the epithelial lining architecture in radicular cysts and odontogenic keratocysts. *Head & Face Medicine* 2006; 2(4):1-9.

9. SAŽETAK

KVANTITATIVNA MIKROMORFOLOŠKA STUDIJA LOBULARNIH KARCINOMA DOJKE RAZLIČITE BIOLOŠKE AGRESIVNOSTI

Studijom su obuhvaćene 334 bolesnice sa lobularnim karcinomom dojke, kod kojih su analizirane mikromorfološke, imunohistohemijske i kvantitativne karakteristike. Dobijeni rezultati su komparirani u odnosu na starost, veličinu tumora, gradus, multicentričnost/multifokalnost i prisustvo metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima. U literaturi je prisutno više klasifikacionih sistema, kao i dilema o multifokalnosti/multicentričnosti i bilateralnosti lobularnih karcinoma dojke. Na osnovu rezultata se pokazalo da su dva najčešća podtipa lobularnog karcinoma dojke klasični 244 (73,1%) i pleomorfni podtip 53 (15,9%), ali ni jedan od podtipova nije bio značajno povezan sa multifokalnošću, ili prisustvom metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima. Narednom kariometrijskom analizom je pokazano da invazivni lobularni karcinomi (ILC-i) sa većom prosečnom površinom jedara značajno češće imaju multifokalni i multicentrični način rasta, kao i veći procenat metastatski izmenjenih aksilarnih limfnih čvorova. Takođe je zaključeno da ILC-i veći od 2 cm češće daju metastaze u aksilarne limfne čvorove i da je negativnost ER receptora statistički značajno povezana sa većim metastatskim potencijalom ILC-a. Znatno veći broj slučajeva klasičnog podtipa ILC-a sa pozitivnim ER i PR receptorima, većim Ki-67 indeksom, a manjom prosečnom površinom preseka jedara u odnosu na pleomorfni podtip ILC-a govori o jasnim razlikama između dva podtipa ILC-a. Međutim, na njihovo zajedničko histogenetsko poreklo je indirektno ukazano odsustvom statistički značajne razlike između podtipova ILC-a i metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima, podtipova i multifokalnosti/multicentričnosti ILC-a, kao i odsustvom povezanosti podtipova prema genskim lezijama tipa HER-2 onkoproteina, BRCA1, p53 i E-cadherina. Visoka proliferativna aktivnost (Ki-67) je u značajnoj interakciji sa prekomernom ekspresijom tumor supresornog proteina p53, a BRCA1 prekomernu ekspresiju su imali svi lobularni karcinomi sa izraženom dezmodoplastičnom reakcijom strome. Konačno, upotrebom standardizovanog fotometrijskog sistema za kvantitativnu imunohistohemijsku analizu ekspresije ER receptora izbegnuti su pojedini problemi u analizi intenziteta imunohistohemijske reakcije. U tom smislu je pokazano postojanje statistički značajne korelacije procenta, kao i prosečnog intenziteta bojenja jedara na ER receptore sa godinama starosti bolesnica. Statistički značajno veći prosečni intenzitet bojenja jedara na ER receptore je prisutan kod bolesnica sa pleomorfnim podtipom ILC-a u odnosu na bolesnice sa klasičnim podtipom ILC-a.

Neosporan je značaj kvantitativne mikromorfološke analize u diferencijalnoj dijagnostici podtipova ILC-a i njihove biološke agresivnosti.

10. SUMMARY

QUANTITATIVE MICROMORPHOLOGICAL STUDY OF LOBULAR BREAST CARCINOMA VARIOUS BIOLOGICAL AGGRESSIVENESS

This study analyzed lobular breast cancers of 334 female patients, and their micro-morphological, immunohistochemical and quantitative characteristics. The results of breast cancer tissue analysis were compared with patient's age, tumor dimensions, tumor grade, multicentric/multifocal tumor growth, and presence/absence of axillary lymph node metastasis. Scientific literature offers more different classification systems of lobular breast cancers, followed by controversy about multifocality/multicentricity, as well as bilaterality of these cancers. The most usual types of analyzed lobular breast cancer were: classical 244 (73.1%), and pleomorphic type (15.9%), however none was significantly correlated with multifocal growth or presence of metastases in axillary lymph nodes. Nuclear morphometry showed that invasive lobular breast cancers (ILC), with a larger values of average nuclear area, more often are followed by multifocal tumor growth, or presence of metastases in lymph nodes. The ILC larger than 2 cm, frequently gives metastases in axillary lymph nodes, as well as the absence of immunohistochemically verified estrogen receptors was significantly correlated with metastatic potential of ILCs. A large number of classical type of lobular breast cancers associated with positive ER and PR, higher Ki-67 labeling index, and with lower values of average nuclear area, showed clear difference about mentioned parameters toward pleomorphic type. However, their common histological origin was indirectly demonstrated with absence of statistically significant difference between them about presence of metastases in axillary lymph nodes, multifocal/multicentric growth ILCs, and about absence of their association with genetic lesions, namely, HER-2 oncoprotein, BRCA1, p53, and E-cadherin. High proliferative activity of breast cancer cells was significantly correlated with overexpression of tumor-suppressor p53. All ILC-s with desmoplastic stromal reaction showed overexpression of BRCA1. Finally, in order to avoid subjective bias during chromogene color intensity analysis, immunohistochemical expression of ER was quantitatively performed by using calibrated photometric system. Moreover, statistically significant correlation of percentage and average intensity of immunohistochemical ER presence in nuclei of cancer cells with age of patients was observed. Higher average values of immunohistochemical nuclear intensity staining on ER were statistically more significant at pleomorphic type lobular breast carcinoma patients, than at patients with classical type.

It is obvious that quantitative micromorphological analysis could be very useful for unbiased differential diagnostics of ILC's types, and estimation of their biological aggressiveness.

11. BIOGRAFIJA

Ime i prezime: IVAN R. ILIĆ

Datum i mesto rođenja: 7. septembar 1981. godine u Nišu.

Adresa i br.telefona: Bulevar Nemanjića 87/32, 18000 NIŠ, 063/7268033

E-mail: ilicko81@gmail.com

Obrazovanje:

- Gimnaziju "Bora Stanković" u Nišu završio odličnim uspehom.
- Medicinski fakultet u Nišu upisao 2000/2001, diplomirao juna 2006 sa prosečnom ocenom 10 i odbranio diplomski rad ocenom 10.
- Akademske doktorske studije molekularne medicine upisao 12.02.2007. na Medicinskom fakultetu u Nišu.
- U okviru Akademskih doktorskih studija edukovan u oblasti metoda 'in-situ' hibridizacije HER2 onkogen na Institutu za onkologiju u Sremskoj Kamenici i Institutu za nuklearne nauke u Vinči, kao i imunohistohemijskih metoda u KBC Zemun.
- 18.02.2010. odlukom nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Nišu i saglasnosti Univerziteta u Nišu odobrena mu je tema za izradu doktorske disertacije pod naslovom: KVANTITATIVNA MIKROMORFOLOŠKA STUDIJA LOBULARNIH KARCINOMA DOJKE RAZLIČITE BIOLOŠKE AGRESIVNOSTI.

Profesionalna karijera:

- Od decembra 2007. godine je u radnom odnosu u Centru za patologiju i patološku anatomiju Kliničkog centra u Nišu.
- Marta 2008 izabran za saradnika u nastavi za UNO Patologija na Medicinskom fakultetu u Nišu.
- 08.07.2013. položio specijalistički ispit iz PATOLOŠKE ANATOMIJE sa ocenom odličan.
- Maja 2014.godine izabran u zvanje asistenta za UNO Patologija na Medicinskom fakultetu u Nišu.

Stipendije u toku školovanja:

- Do kraja 2005. stipendista grada Niša.
- Decembra 2005. godine dobija stipendiju Fonda za mlade talente Republike Srbije za 1000 najboljih studenata u Srbiji.
- Od 1.4.2007. stipendista Ministarstva Nauke za stipendiranje 100 mladih istraživača-doktoranata i uključanje u naučnoistraživačke projekte.

Nagrade i priznanja:

- Tri puta najbolji student godine (III, V i VI).
- NAGRADA SRPSKOG LEKARSKOG DRUŠTVA** najbolje diplomiranom studentu na Medicinskom fakultetu u Nišu školske 2005/06. godine.
- **POVELJA UNIVERZITETA U NIŠU** kao najboljem diplomiranom studentu Medicinskog fakulteta u Nišu u školskoj 2005/06. godini.

Rezultati naučno-istraživačkog rada:**Izabrane publikacije:**

Radulovic N, Randjelovic P, Stojanovic N, Blagojevic P, Stojanovic-Radic Z, **Ilic I**, Djordjevic V. Toxic essential oils. Part II: Chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of *Artemisia annua* L. volatiles. Food and Chemical Toxicology 2013; 58:37–49. **IF: 3.010**

Radulović N, Jovanović I, **Ilić I**, Randjelović P, Stojanović N, Miltojević A. Methyl and isopropyl N-methylantranilates attenuate diclofenac- and ethanol-induced gastric lesions in rats. Life Sciences 2013; 93:840–846. **IF: 2.704**

Randjelovic P, Veljkovic S, Stojiljkovic N, Jankovic-Velickovic L, Sokolovic D, Stoilkovic M, **Ilic I**. Salicylic Acid attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. ScientificWorld Journal 2012; 390613. **IF: 1.730**

Randjelovic P, Veljkovic S, Stojiljkovic N, Velickovic Lj, Sokolovic D, Stoilkovic M, **Ilic I**. Protective effect of selenium on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. Drug Chem Toxicol 2012;35(2):141-8. **IF: 1.293**

Radulović N, Stojković M, Mitić S, Randjelović P, **Ilić I**, Stojanović N, Stojanović-Radić Z. Exploitation of the Antioxidant Potential of *Geranium macrorrhizum* (Geraniaceae): Hepatoprotective and Antimicrobial Activities; Natural Product Communications 2012; 7(12): 1609-1614. **IF: 0.956**

Petrović A, Abramović M, Mihailović D, Gligorijević J, Živković V, Mojsilović M, **Ilić I**. Multicolor counterstaining for immunohistochemistry – a modified Movat's pentachrome. Biotechnic & Histochemistry 2011; 86(6):429-435. **IF: 1.015**

Jankovic I, Kovacevic P, Visnjic M, Jankovic D, Binic I, Jankovic A, **Ilic I**. Application of sentinel lymph node biopsy in cutaneous basosquamous carcinoma. Ann Dermatol 2011; 23(S1):S123-S126. **IF: 0.531**

Radenkovic G, **Ilic I**, Zivanovic D, Vlajkovic S, Petrovic V, Mitrovic O. C-kit-immunopositive interstitial cells of Cajal in human embryonal and fetal oesophagus. Cell Tissue Res 2010; 340(3): 427-436. **IF: 2.804**

Radojković D, Antić S, Pešić M, Radojković M, Bašić D, Radjenović-Petković S, Radenković S, **Ilić I**. Significance of hyperprolactinemia for cytomorphic features of breast secretions. *Vojnosanit Pregl* 2010; 67(1):42-47.

Ilić I, Randjelović P, Ilić R, Katić V, Milentijević M, Velicković L, Krstić M. An approach to malignant mammary phyllodes tumors detection. *Vojnosanit Pregl*. 2009; 66(4):277-82.

Veličković Janković L, Hattori T, Dolicanin Z, Višnjić M, Krstić M, **Ilić I**, et al. Upper urothelial carcinoma in Balkan endemic nephropathy and non-endemic regions: a comparative study of pathological features. *Pathol Res Pract* 2009; 205: 89-96. **IF: 1.219**

Ilić I, Randjelović P, Ilić R, Đorđević L, Radojković D. Granular-cell tumor: a rare variant of mammary tumor. *Vojnosanit Pregl*. 2008; 65(6):488-91.

Projekti:

- Od aprila 2007. na projektu Ministarstva Nauke (br.145004) pod nazivom: Istraživanje uzroka, mehanizma nastanka, prevencije i lečenja endemske nefropatije i tumora urotelijuma, čiji je nosilac Akademik Vladislav Stefanović.
- Aprila 2007. uključen u projekat-studiju ML20397 pod nazivom: Terapija Herceptinom (Trastuzumab) posle standardne adjuvantne terapije u primarnom karcinomu dojke, čiji je nosilac Roche d.o.o. Beograd i obuhvata celu Srbiju i region.
- Od januara 2011. na projektu Ministarstva Nauke (br.172061) pod nazivom: Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim.
- Od januara 2011. na projektu Ministarstva Nauke (br.175092) pod nazivom: Etiologija, dijagnostika, prevencija, i terapija endemske nefropatije i sa njom povezanih tumora urotela – značaj istraživanja genoma i proteoma.

Pedagoški rad:

- Na III godini studija demonstrator na predmetu Fiziologija.
- Na IV, V i VI godini studija demonstrator na predmetu Patologija.
- Pedagoško-metodičko usavršavanje u sklopu obuke nastavnika i saradnika na Medicinskom fakultetu u Nišu 2008.