

INVERZNA KORELACIJA IZMEĐU VREDNOSTI PROLIFERATIVNOG ĆELIJSKOG INDEKSA KI-67 I VREDNOSTI STEROIDNIH RECEPTORA KOD PACIJENTKINJA SA KARCINOMOM DOJKE

Ognjen Živković, Anđela Milićević, Ivana Petrović, Jelena Rakočević, Zorka Inić, Duško Dunderović, Dejan Oprić, Svetislav Tatić, Milica Labudović Borović, Svetlana Ristić, Marko Buta
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

INVERSE CORRELATION BETWEEN KI-67 EXPRESSION AND STEROID RECEPTORS IN PATIENTS WITH BREAST CARCINOMA

Ognjen Zivkovic, Anđela Milicevic, Ivana Petrovic, Jelena Rakocevic, Zorka Inic, Dusko Dundjerovic, Dejan Opric, Svetislav Tatic, Milica Labudovic Borovic, Svetlana Ristic, Marko Buta
Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Belgrade, Serbia

SAŽETAK

Cilj. Cilj ovog istraživanja je prikupljanje kliničko-patoloških karakteristika i određivanje uzajamne korelacije ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 s vrednostima steroidnih receptora u okviru dvofaktorskih modela analize kod pacijentkinja sa patohistološkom dijagnozom karcinoma dojke. Uticaj neoadjuvantne terapije na biološke markere kod karcinoma dojke ostaje kontroverzan.

Metode: U retrospektivnu studiju uključene su sve pacijentkinje sa invazivnim karcinomom dojke, kao primarnim i jedinim malignitetom, koje su na osnovu konzilijarne odluke primile neoadjuvantnu i hiruršku terapiju na Institutu za onkologiju i radiologiju Republike Srbije (IORS), u periodu od 2017. do 2019. godine. Nivo ekspresije Ki-67 i steroidnih receptora određen je imunohistohemijskom analizom. Podaci su grupisani u bazi podataka u programu Excel i analizirani u statističkom softverskom programu SPSS verzija 25. Za statističku obradu podataka korišćeni su hi-kvadrat test, Kruskal-Valisov H-test i Man-Vitnjev U test. Svi testovi su realizovani kao dvosmerni. Vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom, a vrednost $p \leq 0,001$ visoko statistički značajnom.

Rezultati. Naša studija obuhvatila je 190 pacijentkinja obolelih od invazivnog karcinoma dojke. Prosečna starost svih pacijentkinja prilikom postavljanja dijagnoze iznosila je $57,2 \pm 11,8$ godina, od kojih je 64,2% u postmenopauzi, 33,7% u perimenopauzi i 2,1% u menopauzi. Postoji statistički visoko značajna inverzna korelacija između vrednosti Ki-67 i ekspresije steroidnih receptora. Više vrednosti ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 kod pacijentkinja povezane su sa nižim vrednostima ekspresije steroidnih receptora.

Zaključak. Ki-67 predstavlja važan biomarker u kliničkoj praksi za određivanje prognoze, procenu rezidualnog rizika, odgovora i procenu efikasnosti neoadjuvantne terapije. Rezultati naše studije pokazali su povezanost visoke vrednosti ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 sa nižim vrednostima ekspresije steroidnih receptora.

Cljučne reči: neoplazije dojke; neoadjuvantna terapija; receptor; estrogen; receptor; progesteron; Ki-67 antigen.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the relationship between the immunohistochemical score of cell proliferation index Ki-67 and steroid receptors in patients with a pathohistological diagnosis of breast cancer. The impact of neoadjuvant therapy on biological markers in breast cancer remains controversial.

Methods: All patients with invasive breast cancer, as the primary and only malignancy, who underwent surgical and neoadjuvant therapy at the Institute of Oncology and Radiology of the Republic of Serbia (IORS) between 2017 and 2019 were included in the retrospective study. The expression level of Ki-67 and steroid receptors was detected by immunohistochemical analysis. Data were collected in an Excel database and analyzed in the statistical software SPSS program version 25. For statistical data processing Chi-squared test, Kruskal-Wallis test, and Mann-Whitney U test were used. For all statistical analyses, a $p < 0.05$ was considered statistically significant and a $p \leq 0.001$ was considered highly statistically significant.

Results: The study included 190 patients with invasive breast cancer. The mean age of all patients at diagnosis was 57.2 ± 11.8 years. Among the patients, 64.2% are postmenopausal, 33.7% perimenopausal and 2.1% menopausal. There is a significant inverse correlation between the value of Ki-67 and the expression of steroid receptors.

Conclusion: Ki-67 is an important biomarker in clinical practice for determining prognosis, residual risk, and response, and evaluating the effectiveness of neoadjuvant therapy. The results of our study revealed a correlation between high Ki-67 cell proliferative index values and lower steroid receptor expression values.

Key words: breast neoplasms; neoadjuvant therapy; receptors, estrogen; receptors, progesterone; Ki-67 antigen.

UVOD

Karcinom dojke je jedan od najčešćih malignih tumora kod žena u celom svetu, sa procenjenom incidencijom od 22% (1). Smatra se da od ukupnog broja žena obolelih od malignih bolesti, trećina boluje od karcinoma dojke (2).

Neoadjuvantna terapija definisana je kao terapijski pristup koji se primenjuje pre primene primarne terapije, hirurške i/ili zračne terapije, radi poboljšanja njenog ishoda (3). Kao važna strategija za smanjenje veličine tumora, odnosno snižavanje stadijuma tumora u lokalno uznapredovalim karcinomima dojke, neoadjuvantna terapija omogućava lakšu primenu hirurške terapije uz praćenje odgovora tumora na terapiju i poboljšanje kliničkog ishoda, pre svega eliminisanje mikrometastaza (4).

Da bi se odabrao odgovarajući protokol neoadjuvantne terapije prema biologiji tumora, neophodno je izvršiti preoperativnu evaluaciju perkutane biopsije, na kojoj su određeni histološki tip i gradus tumora, kao i vrednosti IHC4 panela, koji je posebno važan za određivanje terapijskog pristupa, ali i procenu rizika od rekurencije tumora kod pacijentkinja na neoadjuvantnoj terapiji (4). Uz ove parametre, razmatraju se i drugi klinički faktori od prognostičkog značaja: životna dob, menopauzalni status, veličina i stadijum tumora, kao i histološke karakteristike tumora (histološki tip i stepen diferencijacije tumora), molekularni profil i podtip tumora, kao i broj metastatski izmenjenih aksilarnih limfnih čvorova.

IHC4 panel je imunohistohemijski esej koji čini ekspresija sledeća četiri proteina: estrogenog receptora (ER), progesteronskog receptora (PR), receptora humanog epidermalnog faktora rasta (c-erbB2/HER2 ili HER2) i Ki-67. Ovaj panel predstavlja dragoceni klinički algoritam sa posebnim značajem i validnošću u uslovima stroge kontrole i standardizacije (5).

Na osnovu profila ekspresije proteina panela IHC4, sve karcinome dojke možemo podeliti u četiri grupe: luminalni tip, HER2 tip, bazalni tip i *normal-like* tip. Luminalni tip karcinoma podeljen je u dva podtipa, Luminal A i Luminal B. Tumori luminal A podtipa su uglavnom ER pozitivni i imaju bolju prognozu od tumora luminal B podtipa (6).

Uvođenje ovako definisanih molekularnih profila tumora dojke baziranih na određivanju ekspresije ili izostanka ekspresije IHC4, ali i niza drugih membranskih i jedarnih biomarkera u ćelijama karcinoma dojke, omogućilo je bolje razumevanje prirode tumora, njihove prognoze, kao i bolje planiranje terapijskih modaliteta.

Estrogeni i progesteronski receptori pripadaju porodici steroidnih receptora i predstavljaju nuklearne transkripcione faktore koji utiču na rast tkiva dojke, diferencijaciju i preživljavanje (3).

Oko 70% karcinoma dojke eksprimira hormonske receptore (7). Status hormonskih receptora procenjen na osnovu imunohistohemije predstavlja nezavisan prediktor terapijskog odgovora. Dokazano je da ER-negativni tumori imaju tendenciju da bolje reaguju na neoadjuvantnu terapiju nego ER-pozitivni tumori (3).

Sa stanovišta savremene onkološke i patološke prakse posebno je važno sagledavanje značaja ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 u nekoliko dijagnostičkih i terapijskih, prediktivnih i prognostičkih algoritama: definisanje njegovog značaja u određivanju molekularnog podtipa karcinoma dojke, potom procena efekata hemoterapije i hormonske terapije, kao i definisanje protokola za pristup trostruko negativnim karcinomima dojke (triple negative breast carcinoma – TNBC). Poseban izazov predstavlja tumačenje i sačinjavanje prediktivnih prognostičkih algoritama za TNBC, koji predstavljaju 15% svih karcinoma dojke (8). Grupi TNBC pripadaju karcinomi sa negativnim ER, PR i HER2 statusom ekspresije. Pacijentkinje obolele od TNBC nemaju benefit od ciljane hormonske terapije, te je rekurencija tumora i pojava metastaza češća, ovi tumori smatraju se tumorima sa agresivnijim biološkim ponašanjem, lošijom prognozom i manjim stepenom preživljavanja.

Ki-67, marker ćelijske proliferacije, jedarni je nehistski protein. Prvi put su ga identifikovali 1983. godine Gerdes i saradnici u ćelijskoj liniji Hodžkinovog limfoma na departmanu za patologiju Univerziteta u Kilu (Kiel) (9). Stoga je Ki-67 prvobitno nazvan antigen Kiel 67, prema geografskoj odrednici, ali i prema broju 67 kojim je označen jedan od 96 „bunarčića“ koji je sadržao klon antitela kojim je protein konačno detektovan.

Gen koji kodira Ki-67 lokalizovan je na hromozomu 10q25. Ki-67 je ekspimiran u svim fazama ćelijskog ciklusa, osim u fazi mirovanja – G0. Nivo ekspresije Ki-67 varira tokom ćelijskog ciklusa, niske vrednosti izražene su u G1 i ranoj S fazi, dok je ekspresija ovog proteina najizraženija u fazi mitoze (10). Iako funkcija Ki-67 nije u potpunosti razjašnjena, postoje dokazi o njegovoj ulozi u ćelijskoj deobi i sintezi ribozomalne RNK (2). Danas znamo da je genski i molekularni profil estrogen pozitivnih karcinoma dojke u ranoj fazi determinisan ekspresijom gena povezanih s proliferacijom (11). Stoga Ki-67 predstavlja važan prognostički marker za estrogen pozitivne karcinome dojke u ranoj fazi bolesti. Ki-67 se takođe smatra važnim faktorom u preciznom definisanju molekularnog podtipa estrogen pozitivnih karcinoma dojke: Luminal A i Luminal B podtipa (10).

Određivanje celularnog proliferativnog indeksa Ki-67 pre i posle primene neoadjuvantne terapije ispituje se radi sagledavanja odgovora na primenjenu terapiju. Dokazano je da visoke vrednosti celularnog proliferativnog indeksa koreliraju sa lošijom prognozom (1). Takođe je dokazano da Ki-67 indeks u rezidualnom tumoru nakon završetka

neoadjuvantne terapije visoko korelira s dugoročnim ishodom terapije (12). Visoke vrednosti Ki-67 pre neoadjuvantne terapije udružene su sa češćim kompletnim odgovorom na terapiju. Ki-67 je dokazan kao nezavisni prognostički faktor za ukupno preživljavanje kod pacijentkinja na neoadjuvantnoj terapiji (13). U istom kontekstu analizira se i prediktivni značaj Ki-67 indeksa za procenu efekata endokrinih agenasa.

Analiza ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 kao nezavisnog prognostičkog i prediktivnog faktora, kao i analiza ovog parametra u okviru multifaktorijskog istraživačkog modela neophodna je za sagledavanje pristupa lečenju karcinoma dojke i ključna za donošenje individualne strategije lečenja. On je važan u određivanju prognoze, odgovora i rezistencije na hemoterapiju i endokrinu terapiju, procenu rezidualnog rizika kod pacijenata na standardnoj terapiji i, posebno, procenu efikasnosti neoadjuvantne terapije.

Cilj ovog rada je određivanje uzajamne korelacije ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 sa vrednostima steroidnih receptora u okviru dvofaktorskih modela analize kod pacijentkinja na neoadjuvantnoj terapiji, kao i razmatranje ovih parametara u kontekstu kliničkih karakteristika pacijentkinja i rezultata histopatološke analize.

ISPITANICI I METODE

Kriterijumi za uključivanje u studiju. U retrospektivno istraživanje uključene su sve pacijentkinje s karcinomom dojke koje su na osnovu konzilijarne odluke primale neoadjuvantnu i hiruršku terapiju za karcinom dojke na Institutu za onkologiju i radiologiju Republike Srbije (IORS) u periodu 2017. godine do 2019. godine. Studijom su obuhvaćene sve pacijentkinje, životne dobi između 33 godine i 87 godina, kod kojih je karcinom dojke dijagnostikovao kao jedini primarni tumor.

Primenjeni modaliteti terapije. Pod primarnom terapijom u uslovima naše sprovedene studije podrazumeva se hirurško lečenje. Hirurški modaliteti lečenja obuhvatili su totalnu mastektomiju kod 154 pacijentkinje (81,1%) i parcijalnu mastektomiju ili tumorektomiju kod 36 pacijentkinja (18,9%). Disekcija aksile sprovedena je kod 180 pacijentkinja (94,7%), a analiza sentinel limfnog čvora kod 19 (10%).

Protokoli neoadjuvantne terapije određeni su na osnovu odluke konzilijuma za maligne bolesti dojke IORS na osnovu kliničkih, radiografskih i histopatoloških nalaza i primenjeni su pre primarne terapije.

Period između poslednjeg ciklusa primenjene terapije i hirurškog lečenja iznosi 20–30 dana.

Kriterijumi za isključivanje iz studije. U studiju nisu uključene pacijentkinje kod kojih su konstatovane

hirurške kontraindikacije, klinički komorbiditeti (*diabetes mellitus*, hipertenzija, hronične inflamatorne bolesti, srčana insuficijencija, insuficijencija bubrega ili jetre), udaljene metastaze i metastaze dijagnostikovane u toku primene neoadjuvantne terapije, kao i pacijentkinje koje su napustile terapiju zbog neželjenih efekata.

Analizirane kliničke karakteristike pacijentkinja uključenih u studiju. Uvidom u istorije bolesti i patohistološke izveštaje pacijentkinja analizirani su sledeći podaci: starost, menopauzalni status, lokalizacija i veličina tumora, status limfnih čvorova aksile, klinički stadijum bolesti, primenjeni protokol neoadjuvantne terapije i histopatološki odgovor na terapiju u skladu sa protokolom AJCC.

Lokalizacija i veličina tumora utvrđeni su radiografski (ultrazvučnim pregledom, mamografskim pregledom, pregledom CT ili MRI). Status limfnih čvorova aksile procenjen je radiografski (ultrazvučnim pregledom, pregledom CT ili MRI).

Klinički stadijum bolesti definisan je prema TNM klasifikaciji na osnovu mamografije, CT i scintigrafije kostiju.

U bazu su uneti primenjeni protokoli neoadjuvantne terapije uključujući hemoterapiju, potom primenu trastuzumaba kod pacijentkinja sa HER2 pozitivnim karcinomima dojke, kao i primena karboplatine kod trostruko negativnih karcinoma dojke i primena hormonske terapije.

Analizirane histopatološke karakteristike. U bazu su potom uključeni svi podaci dobijeni analizom preoperativne dijagnostičke iglene biopsije – perkutane biopsije širokom iglom („core“): histološki tip i gradus tumora određen prema protokolu AJCC, CAP i WHO, nuklearni gradus tumora, vrednosti ekspresije estrogenskog receptora (ER), vrednosti ekspresije progesteronskog receptora (PR), vrednosti ekspresije HER2, ćelijski proliferativni indeks Ki-67 i molekularni podtip tumora na osnovu imunohistohemijskih karakteristika.

Rezultati patološke analize i imunohistohemijske karakteristike tumora poređene su preoperativno, na uzorcima dobijenim perkutanom biopsijom širokom iglom i postoperativno, na operativnom materijalu.

Histopatološka i imunohistohemijska analiza načinjeni su u istoj laboratoriji, Laboratoriji Službe za patološku i drugu dijagnostiku Instituta za onkologiju i radiologiju Republike Srbije. Tkivo dojke je procesuirano za analizu rutinskim postupkom, fiksirano u formalinu, zatim kalupljeno u parafinu i bojeno hematoksilin-eozin metodom za analizu tipa, histološkog i nuklearnog gradusa. Postavljanje dijagnoze, stadiranje i gradiranje tumora usklađeno je s preporukama WHO i AJCC.

Imunohistohemijskim bojenjem utvrđena je ekspresija ER, PR, HER2 i Ki-67. Priprema tkiva sprovedena je u skladu s protokolom laboratorije i ASCO/CAP preporukama. Određivanje vrednosti ER i PR utvrđeno je prema kriterijumima Allred scoring sistema.

Određivanje ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 vršeno je sledećim postupkom: pri ravnomernoj distribuciji Ki-67 birano je najmanje tri mikroskopska polja velikog uveličanja (40x). Ukoliko je tumor heterogen u pogledu distribucije ekspresije Ki-67, za skoriranje Ki-67 korišćena su polja prepoznata kao „hot-spots“, koja se smatraju biološki najaktivnijim delom tumora (14). „Hot spots“ polja predstavljaju oblasti sa najvećim brojem pozitivnih jedara. Vrednost ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 iskazana je u vidu procenta pozitivnih invazivnih tumorskih ćelija. Samo prebojenost jedara smatra se pozitivnim, a intenzitet bojenja nema značaja. Bilo koji intenzitet prebojenosti jedara ukazuje na pozitivnu ekspresiju Ki-67. Procenat Ki-67 pozitivnih ćelija određivan je u odnosu na ukupan broj od najmanje 500 tumorskih ćelija.

Statistička obrada podataka. Svi podaci dobijeni su uvidom u istorije bolesti pacijentkinja i grupisani u bazi u programu Excell (Microsoft Excell Version 2023), radi dalje statističke analize. Rezultati su prikazani metodom deskriptivne i analitičke statistike. Za potrebe statističke obrade podataka korišćeni su metode identifikacije empirijskih raspodela, metode za procenu značajnosti razlike: hi-kvadrat test, Mann-Whitney U test, Kruskal Wallis H-test u statističkom softverskom programu SPSS verzija 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Svi testovi su realizovani kao dvosmerni. Vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom, a vrednost $p \leq 0,001$ visoko statistički značajnom.

REZULTATI

Našim istraživanjem obuhvaćeno je ukupno 190 žena obolelih od karcinoma dojke. Opšte karakteristike pacijentkinja prikazane su u tabeli 1. Prosečna starost iznosila je $57,2 \pm 11,8$ godina. Najmlađa pacijentkinja imala je 33 godine, dok je najstarija imala 87 godina.

Pacijentkinje su grupisane u starosne kategorije prema prethodno definisanim kriterijumima (15). U grupi starosti 25–44 godine nalazi se 29 pacijentkinja. Najveći broj pacijentkinja je u starosnoj dobi 45–64 godine – 103 pacijentkinje, a potom po učestalosti sledi kategorija starosti preko 65 godina, gde se nalazi 58 pacijentkinja.

Analizom distribucije vrednosti medijane ćelijskog, proliferativnog indeksa Ki-67 prema starosnim kategorijama, dobijeni su sledeći rezultati:

- 25–44 godina ($n = 31$ pacijentkinja), Ki-67 30,00 (IQR 20,00–40,00),

Tabela 1. Opšte karakteristike pacijentkinja sa karcinomom dojke.

Opšte karakteristike	Vrednost
Prosečna starost (godine)	$57,2 \pm 11,8$
Menopauzalni status	
Postmenopauza	122
Perimenopauza	64
Menopauza	4
Veličina tumora	
10–20 mm	37
21–50 mm	124
≥ 51 mm (max. 100 mm)	21
Kompletno tumorski izmenjena dojka	1
Lokalizacija tumora	
Leva dojka	96
Desna dojka	94

Vrednost – srednja vrednost,
 \pm standardna devijacija; apsolutni broj

- 45–64 godina ($n = 100$ pacijentkinja), Ki-67 30,00 (IQR 15,00–50,00),
- 65+ godina ($n = 59$ pacijentkinja), Ki-67 25,00 (IQR 15,00–41,25).

Nema značajne razlike u ekspresiji Ki-67 prema različitim starosnim kategorijama ($H = 1,414$, $p = 0,493$).

Analizom menopauzalnog statusa utvrđeno je da se većina pacijentkinja – 64,2% nalazi u postmenopauzi, 33,7% u perimenopauzi i 2,1% u menopauzi.

Pre operacije, najveći procenat operisanih tumora – 67,8%, bio je veličine od 21 mm do 50 mm. Nakon primenjene neoadjuvantne terapije približno kompletan ili kompletan patološki odgovor na terapiju utvrđen je kod 31,1% pacijentkinja. Prilikom analize rezultata za 130 pacijentkinja s reziduom tumora nakon primene neoadjuvantne terapije, kod 38,5% pacijentkinja utvrđena je veličina rezidualnog tumora od 11 mm do 20 mm, dok je kod 36,2% pacijentkinja veličina tumora bila od 21 mm do 50 mm.

Broj tumora u levoj dojci gotovo je jednak broju tumora u desnoj dojci (50,5% i 49,5%). U analiziranom materijalu tumori su najčešće lokalizovani u gornjem spoljašnjem kvadrantu dojke (29,3%). Preovlađuju unifokalni tumori u odnosu na multifokalne tumore (91,6%).

Najčešći histološki tip tumora u analiziranom materijalu bio je invazivni duktalni karcinom. Ovaj rezultat dobijen je histopatološkom analizom preoperativnih, perkutanih biopsija dojke širokom iglom („core“), 51,3% pacijentkinja, ali i analizom uzoraka dobijenih nakon operacije, 35,8% pacijentkinja. Invazivni lobularni karcinom imalo je 15,9% pacijentkinja, dok je preostalih 32,8% pacijentkinja imalo neki drugi histološki tip tumora.

Najčešće utvrđeni histološki gradus tumora prilikom analize preoperativnih, perkutanih biopsija dojke širokom

iglom („core“) bio je II (84,2%), a isti rezultat dobijen je i histopatološkom analizom operativnog materijala (54,2%). Najčešće utvrđeni nuklearni gradus tumora je II kako na preoperativnim dijagnostičkim, perkutanom biopsijama dojke širokom iglom („core“), tako i na operativnom materijalu (80,3% na „core“ biopsijama i 51,1% na operativnom materijalu).

Najčešće utvrđen klinički stadijum tumora na preoperativnom materijalu je T2N0M0 (25,7% pacijentkinja), što korelira sa najčešćim nalazom izostanka metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima (47,6% pacijentkinja). Sumirane histološke karakteristike tumora predstavljene su u tabeli 2.

Tabela 2. Histološke karakteristike pacijentkinja sa karcinomom dojke.

Histološke karakteristike	Broj
Histološki tip	
Duktalni invazivni karcinom	97
Lobularni invazivni karcinom	30
Ostali tipovi	63
Histološki gradus	
Gradus I	9
Gradus II	160
Gradus III	9
Nuklearni gradus	
Gradus I	7
Gradus II	153
Gradus III	17
Status regionalnih limfnih čvorova	
Nisu dostavljeni	3
Nema metastaze	90
Metastaze u 1–3 limfna čvora	42
Metastaze u 4–9 limfnih čvorova	49
Metastaze u 10–49 limfnih čvorova	6

Tabela 3. Vrednosti steroidnih receptora dobijene na preoperativnom materijalu uzorkovanom perkutanom biopsijom širokom iglom.

Skor steroidni receptori	Broj
ER	
0	43
2	5
3	8
4	5
5	6
6	10
7	29
8	81
PR	
0	54
2	10
3	11
4	12
5	14
6	19
7	22
8	45

Prilikom primene IHC4 na materijal dobijen preoperativnom, dijagnostičkom, perkutanom iglom biopsijom („core“), najveći broj pacijentkinja imao je vrednosti estrogenskog receptora (ER) osam. Ista vrednost dobijena je i prilikom analize operativnog materijala.

Najveći broj pacijentkinja, na materijalu dobijenom preoperativno perkutanom biopsijom širokom iglom („core“), imao je vrednosti progesteronskog receptora (PR) osam, dok je na operativnom materijalu najveći zabeleženi skor PR bio sedam. Vrednosti Alred skora za ER i PR prikazane su u tabeli 3.

Korelacija ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 na materijalu dobijenom preoperativno, perkutanom biopsijom širokom iglom sa vrednostima ER na istom materijalu po pojedinačnim vrednostima nije moguća jer nema monotone povezanosti ove dve varijable. To je preduslov za izvođenje Spirmanove korelacije.

Ukoliko vrednosti ER kategorišemo na sledeći način – grupa 1 (ER core 0–2), grupa 2 (ER core 3, 4 i 5) i grupa 3 (ER core 6, 7 i 8), dobijamo sledeće rezultate:

- ER core 0–2, n = 48 pacijentkinja, 25,7%, medijana Ki-67 core je 45 (IQR 30–60)
- ER core 3–5, n = 19 pacijentkinja, 10,1%, medijana Ki-67 core je 50 (IQR 30–65)
- ER core 6–8, n = 120 pacijentkinja, 63,2%, medijana Ki-67 core je 25 (IQR 10,25–35).

Kada se uporede ove tri grupe, postoji statistički visoko značajna razlika ($H = 34,260$, $p < 0,001$).

Testiranjem razlika među grupama *post hoc* analizom, dobijeni su sledeći rezultati:

- ER core 0–2 vs 3–5: nema značajne razlike ($U = 336,5$, $p = 0,095$),
- ER core 0–2 vs 6–8: visoko statistički značajna razlika ($U = 1275,5$, $p < 0,001$),
- ER core 3–5 vs 6–8: statistički značajna razlika ($U = 737$, $p = 0,013$).

Ukoliko izvršimo statističku analizu prema dve velike kategorije vrednosti ER (ER *high* i ER *low*), dobijamo sledeće rezultate. Medijana vrednosti Ki-67 kod pacijentkinja sa ER *low* iznosi 45 (IQR 30 – 60), dok je u grupi sa ER *high* medijana vrednosti Ki-67 25 (IQR 15–35). Postoji visoko statistički značajna razlika ($U = 1578,000$, $p < 0,001$).

Obe analize ukazuju na statistički značajne više vrednosti ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 kod pacijentkinja sa nižim vrednostima ekspresije ER.

Korelacija ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 na materijalu dobijenom preoperativno, perkutanom biopsijom širokom iglom („core“) sa vrednostima PR na istom materijalu po pojedinačnim vrednostima nije moguća jer nema monotone povezanosti ove dve varijable. To je preduslov za izvođenje Spirmanove korelacije.

Međutim, vrednosti PR se mogu grupisati na isti način kao vrednosti ER sa sledećim rezultatima:

- PR core 0–2, n = 64 pacijentkinje, 34,2%, medijana Ki-67 je 40 (IQR 30–60),
- PR core 3–5, n = 37 pacijentkinja, 19,8%, medijana Ki-67 je 25 (IQR 15–37,5),
- PR core 6–8, n = 86 pacijentkinja, 46,0%, medijana Ki-67 je 20 (IQR 10–31,25).

Kada se uporede ove tri grupe, postoji visoko statistički značajna razlika ($H = 40,990$, $p < 0,001$).

Testiranjem razlika među grupama *post hoc* analizom, dobijeni su sledeći rezultati:

- PR core 0–2 vs 3–5: visoko statistički značajna razlika ($U = 628$, $p < 0,001$),
- PR core 0–2 vs 6–8: visoko statistički značajna razlika ($U = 1101$, $p < 0,001$),
- PR core 3–5 vs 6–8: nema značajne razlike ($U = 1393$, $p = 0,273$).

Ukoliko izvršimo statističku analizu prema dve velike kategorije vrednosti PR (PR *high* i PR *low*), dobijamo sledeće rezultate. Medijana vrednosti Ki67 kod pacijentkinja sa PR *low* iznosi 40,00 (IQR 30,00–58,75), dok je u grupi sa PR *high* prosečna vrednost Ki67 20,00 (IQR 10,00–35,00). Postoji visoko statistički značajna razlika ($U = 1692,000$, $p < 0,001$).

Pravilnost distribucije vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 slična je kao i prilikom analize distribucije PR i korelira inverzno, tj. niže vrednosti PR udružene su sa stistički značajno većim vrednostima Ki-67.

DISKUSIJA

Invazivni karcinom dojke predstavlja najčešći maligni tumor tkiva dojke, epitelnog porekla, u ženskoj populaciji širom sveta. Smatra se heterogenom grupom bolesti zbog promenljivih prognostičkih faktora koji utiču na njegovo ponašanje. S obzirom na različitu prognozu, oblike recidiviranja i diseminacije, karcinom dojke poseduje i različitu senzitivnost na dostupne oblike terapije. Napredak u kliničkim, laboratorijskim i translacionim istraživanjima doveo je i do promene shvatanja terapijskog pristupa karcinomima dojke. Utvrđeno je da rana adjuvantna terapija redukuje verovatnoću recidiva i mortalitet, a primena neoadjuvantne terapije kao pretretmana hirurškom lečenju znatno je unapređena, čak i kod velikih operabilnih tumora. Stoga postoji stalna potreba za analizom i boljim razumevanjem uloge različitih biomarkera u terapijskim targetiranju tumora i utvrđivanjem njihovog značaja u predikciji odgovora na primenjenu terapiju. Histološki gradus tumora, ekspresija hormonskih receptora i genski profil tumora postali su jednako važni u terapijskom odlučivanju kao i anatomsko stadiranje tumora. Od posebne je važnosti predvideti

benefit od određene terapije, kao i rezistenciju na specifični tretman. Takođe, pacijentkinje sa istim stadijumima primarnog tumora i regionalnih limfnih čvorova mogu drugačije reagovati na terapiju u zavisnosti od utvrđenih vrednosti bioloških markera. Poseban značaj biomarkeri imaju prilikom odlučivanja o terapiji malih i rano otkrivenih karcinoma dojke. Stoga se brojne savremene studije bave ispitivanjem prognostičke i prediktivne vrednosti biomarkera u korelaciji s brojnim drugim parametrima koji utiču na terapijski pristup (16).

Naša studija obuhvatila je 190 pacijentkinja, starosti između 33 godine i 87 godina, što odgovara parametrima brojnosti i starosti pacijentkinja u sličnim studijama (1, 2, 9)

U rezultatima našeg istraživanja nije utvrđena statistička značajnost između starosnih grupa i vrednosti medijane ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67, što je u skladu sa studijom koju su publikovali Madani i saradnici (6), dok je u studiji Nishimura i saradnika objavljeno da postoji visoka korelacija između ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 i životne dobi, niže vrednosti Ki-67 statistički su značajno korelirale sa starijom životnom dobi (17).

Analizom menopauzalnog statusa u našoj studiji utvrđeno je da se većina pacijentkinja, njih 64,2%, nalazi u postmenopauzi, 33,7% pacijentkinje u perimenopauzi i 2,1% u menopauzi. Rezultati studije Resendea i saradnika koja je obuhvatila 310 pacijentkinja ukazuju na jednaku distribuciju pacijentkinja u premenopauzi i postmenopauzi: 48% u odnosu na 52% (1).

Rezultati naše studije pokazali su da je pre operacije najveći procenat operisanih tumora –67,8%, bio veličine između 21 mm i 50 mm, što odgovara stadijumu pT2. Studija Ragaba i saradnika obuhvatila je, takođe, najveći broj pacijentkinja u ovom stadijumu 65,2%. Nije utvrđena statistički značajna korelacija između veličine tumora i vrednosti Ki-67 (2).

U analiziranom materijalu tumori su najčešće lokalizovani u gornjem spoljašnjem kvadrantu dojke 29,3%. Razmatranjem kliničkih karakteristika utvrđeno je da je najčešća anatomsko lokalizacija karcinoma dojke gornji spoljni kvadrant, što korelira sa anatomskim i histološkim odlikama tkiva dojke. Naime, glandularno tkivo dojke je najrazvijenije upravo u gornjem spoljnom kvadrantu, te je prema sličnim studijama više od polovine karcinoma dojke lokalizovano upravo u ovom kvadrantu (5).

Najčešći histološki tip tumora u analiziranom materijalu bio je duktalni invazivni karcinom dojke. Ovi rezultati koreliraju sa sličnim istraživanjima u kojima se najveći broj pacijentkinja sa duktalnim invazivnim karcinomom kao osnovnom dijagnozom kreće do 84%, odnosno 94,4% (2, 18). U studiji Nahed i saradnika dokazano je da histološki tip tumora ne korelira s vrednostima indeksa Ki-67 (18).

Najčešće utvrđeni histološki gradus tumora prilikom analize preoperativnih, perkutanih biopsija dojke širokom iglom („core“) bio je II 84,2%, a isti rezultat dobijen je i histopatološkom analizom operativnog materijala 54,2%. Slični rezultati nalaze se i u drugim studijama Ragab i saradnika gde je učestalost histološkog gradusa II 80,3% (2).

Najčešće utvrđeni nuklearni gradus tumora je II, kako na preoperativnim dijagnostičkim, perkutanim biopsijama širokom iglom („core“), tako i na operativnom materijalu 80,3% na „core“ biopsijama i 51,1% na operativnom materijalu, što je takođe u skladu sa istraživanjem koje su sproveli Ragab i saradnici (2).

Najčešće utvrđen klinički stadijum tumora na preoperativnom materijalu jeste T2N0M0 – 25,7% pacijentkinja, što korelira sa najčešćim nalazom izostanka metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima – 47,6% pacijentkinja, što je u skladu s rezultatima studije Ragaba i saradnika, u kojoj je izostanak metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima utvrđen kod 47,8% pacijentkinja (2). Ovi rezultati su u suprotnosti sa studijom Resendea i saradnika u kojoj kod 74% pacijentkinja postoje dokazane metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima (1). Tumorski stadijum ne korelira s vrednostima indeksa Ki-67 (18).

Prilikom primene IHC4 na materijal dobijen preoperativnom, perkutanom biopsijom širokom iglom („core“), najveći broj pacijentkinja imao je vrednosti estrogenog receptora (ER) osam, ista vrednost dobijena je i prilikom analize operativnog materijala. Ovi rezultati koreliraju donekle sa studijom Resendea i saradnika u kojoj vrednosti ER 7–8 ima 45% pacijentkinja, dok 42% pacijentkinja ima negativan status ER. U studiji Ragaba i saradnika 72,8% pacijentkinja ima status ER definisan kao pozitivan. Najveći broj pacijentkinja, na materijalu dobijenom preoperativnom, perkutanom biopsijom širokom iglom („core“), imao je vrednosti progesteronskog receptora (PR) osam, dok je na operativnom materijalu najveći zabeleženi skor PR bio sedam. U studiji Ragaba i saradnika 64,6% pacijenata imalo je status PR određen kao pozitivan (2).

Odnos između ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 i steroidnih receptora, estrogenih i progesteronskih receptora ispitivan je u prethodnim studijama. Korelacijom vrednosti ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 s vrednostima ER i PR u našoj studiji dobijene su statistički visoko značajne razlike, što je u saglasnosti sa studijom Ragaba i saradnika, pri čemu je korelacija inverzna, s porastom Ki-67 vrednosti analiziranih receptora opadaju. U studiji Haroon i saradnika pronađena je statistički značajna korelacija između Ki-67 i ekspresije PR, dok korelacija Ki-67 i pozitivne ekspresije ER nije pronađena (19). Dok je u istraživanju koje su sproveli Kamranzadeh i saradnici statistički značajna korelacija između Ki-67 i steroidnih receptora izostala. Druge studije su pokazale da je ekspresija ER u inverznoj korelaciji sa

Ki-67, odnosno da više vrednosti ekspresije ER pokazuju tumori sa nižim vrednostima proliferativnog indeksa (6). U većini studija dokazana je negativna korelacija između steroidnih receptora i vrednosti Ki-67, što je u skladu sa našim istraživanjem (4,20). Značajna korelacija visoke vrednosti ekspresije Ki-67 sa nepovoljnim prognostičkim faktorima, odnosno negativnim vrednostima ekspresije ER i PR prikazana je i u studiji Naheda i saradnika. U našoj studiji, postoji statistički značajna inverzna korelacija između vrednosti steroidnih receptora i Ki-67, visoke vrednosti ER i PR negativno koreliraju sa visokim vrednostima indeksa Ki-67.

U zaključku, uprkos ograničenjima ove studije, uključujući ograničenu veličinu uzorka, relativno kratko vreme praćenja i njenu retrospektivnu prirodu, možemo zaključiti da je naša studija pokazala povezanost visoke vrednosti ćelijskog proliferativnog indeksa Ki-67 sa nižim vrednostima ekspresije steroidnih receptora. Stoga, Ki-67 predstavlja izuzetno važan biomarker u kliničkoj praksi u određivanju prognoze, proceni rezidualnog rizika, odgovoru i proceni efikasnosti neoadjuvantne terapije. Upotreba biomarkera u kliničkoj praksi doprinosi donošenju terapijskih odluka u skladu sa aktuelnim protokolima i predstavlja merljivo kliničko poboljšanje ishoda. Pored brojnih sprovedenih studija primena proliferativnog indeksa Ki-67 kao nezavisnog prognostičkog i prediktivnog faktora i dalje predstavlja kontroverzu i aktuelnu temu u kliničkoj praksi, te treba obaviti dalja istraživanja i ispitavanje Ki-67 s drugim kliničkim parametrima, ukupnim preživljavanjem kao i prediktivnim i prognostičkim potencijalom u tripl negativnim karcinomima dojke.

SKRAĆENICE

- AJCC – Američki zajednički komitet za rak (American Joint Committee on Cancer)
CAP – Koledž patologa Amerike (College of American Pathologists)
ER – estrogeni receptor
HER2 – receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
PR – progesteronski receptor
TNM – tumor – limfni čvor – metastaze (engleski tumor, node, metastasis)
WHO – Svetska zdravstvena organizacija

LITERATURA

1. Resende U, Cabello C, Ramalho SOB, Zeferino LC. Prognostic assessment of breast carcinoma submitted to neoadjuvant chemotherapy with pathological non-complete response. *BMC Cancer* 2019; 19: 601.

2. Ragab HM, Samy N, Afify M, El Maksoud NA, Shaaban HM. Assessment of Ki-67 as a potential biomarker in patients with breast cancer. *J Genet Eng Biotechnol* 2018; 16: 479–84.
3. Avci N, Deligonul A, Tolunay S, et al. Neoadjuvant chemotherapy-induced changes in immunohistochemical expression of estrogen receptor, progesterone receptor, HER2, and Ki-67 in patients with breast cancer. *J BUON* 2015; 20: 45–9.
4. Rey-Vargas L, Mejía-Henao JC, Sanabria-Salas MC, Serrano-Gomez SJ. Effect of neoadjuvant therapy on breast cancer biomarker profile. *BMC Cancer* 2020; 20: 675.
5. Giuliano AE, Edge SB, Hortobagyi GN. Eighth edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2018; 25: 1783–5.
6. Madani SH, Payandeh M, Sadeghi M, Motamed H, Sadeghi E. The correlation between Ki-67 with other prognostic factors in breast cancer: a study in Iranian patients. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2016; 37: 95–9.
7. Moisan A, Madéry M, Boyer T, Domblides C, Blaye C, Larmonier N. Hormone receptor signaling and breast cancer resistance to anti-tumor immunity. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 15048.
8. Zhu X, Chen L, Huang B, Wang Y, Ji L, Wu J, et al. The prognostic and predictive potential of Ki-67 in triple-negative breast cancer. *Sci Rep* 2020; 10: 225.
9. 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.
10. Reis-Filho JS, Davidson NE. Ki67 Assessment in Breast Cancer: Are We There Yet? *J Natl Cancer Inst* 2021; 113: 797–8.
11. Sestak I, Buus R, Cuzick J, et al. Comparison of the performance of 6 prognostic signatures for estrogen receptor–positive breast cancer. *JAMA Oncol* 2018; 4: 545.
12. von Minckwitz G, Schmitt WD, Loibl S, et al. Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 4521–31.
13. Ács B, Zámbo V, Vízkeleti L, et al. Ki-67 as a controversial predictive and prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Diagn Pathol* 2017; 12: 20.
14. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 1656–64.
15. Medley ML. Life satisfaction across four stages of adult life. *Int J Aging Hum Dev* 1980; 11: 193–209.
16. Kamranzadeh H, Ardekani R, Kasaeian A, Sadighi S, Maghsudi S, Jahanzad I, et al. Association between Ki-67 expression and clinicopathological features in prognosis of breast cancer: a retrospective cohort study. *J Res Med Sci* 2019; 24: 30.
17. Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, et al. Prognostic significance of Ki-67 index value at the primary breast tumor in recurrent breast cancer. *Mol Clin Oncol* 2014; 2: 1062–8.
18. Nahed AS, Shaimaa MY. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biol Med* 2016; 13: 496.
19. Haroon S, Hashmi AA, Khurshid A, et al. Ki67 index in breast cancer: correlation with other prognostic markers and potential in Pakistani patients. *Asian Pac J Cancer* 2013; 14: 4353–8.
20. Kanyilmaz G, Benli Yavuz B, Aktan M, Karaagac M, Uyar M, Findik S. Prognostic importance of Ki-67 in breast cancer and its relationship with other prognostic factors. *Eur J Breast Health* 2019; 15: 256–61.