

# Prognostički značaj serumske koncentracije HER2/ECD u bolesnica s lokaliziranim tumorima dojke

---

**Badžek, Saša**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2012**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:084946>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Saša Badžek**

**Prognostički značaj serumske  
koncentracije HER2/ECD u bolesnica s  
lokaliziranim tumorima dojke**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2012.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Saša Badžek**

**Prognostički značaj serumske  
koncentracije HER2/ECD u bolesnica s  
lokaliziranim tumorima dojke**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2012.**

Disertacija je izrađena u Klinici za onkologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu znanstvenog projekta „Molekularni biljezi u solidnim tumorima – prediktivni i prognostički značaj“ prof. dr. sc. Stjepka Pleštine

Voditelj rada: doc. dr. sc. Vesna Lesko Kelović

Zahvaljujem:

doc. dr. sc. Vesni Lesko Kelović i prof. dr. sc. Stjepku Pleštini, mojim mentorima, na pokretanju ovog istraživanja i svesrdnoj pomoći u svim fazama istraživanja i tijekom izrade rada.

dr. sc. Ines Humar i dr. Irmu Goršić, na pomoći pri prikupljanju uzoraka, izradi rezultata i analizi podataka.

dr. sc. Željku Mihaljeviću, na pomoći u statističkom planiranju i analizi ovog istraživanja.

Medicinskim sestrama Klinike za onkologiju i Zavoda za plastičnu kirurgiju, na zalaganju i stručnosti pri provođenju istraživanja.

Svim bolesnicama uključenima u istraživanje, na iskazanom povjerenju u za njih teškim životnim trenucima.

## POPIS KRATICA

5-FU – 5-fluorouracil

ACS – eng. American Cancer Society

AJCC – eng. American Joint Cancer Committee

ALP – alkalna fosfataza

ALT – alanin transferaza

ASCO – eng. American Society of Clinical Oncology

AST – aspartat transferaza

BRCA – eng. breast cancer 1 and 2 gene

CA – eng. cancer antigen

CDI – lat. carcinoma ductale invasivum

CEA – eng. carcinoembryonic antigen

CI – eng. confidence interval

CISH – eng. chromogenic in situ hybridization

CLI – lat. carcinoma lobulare invasivum

CMF – polikemoterapijski protokol: ciklofosamid, metotreksat i 5-fluorouracil

CT – eng. computerized tomography

DFS – eng. disease-free survival

DNA – eng. deoxyribonucleic acid

ECOG – eng. Eastern Cooperative Oncology Group

EGF(R) – eng. epidermal growth factor (receptor)

EKG – elektrokardiogram

ELISA – eng. enzyme-linked immunosorbent assay

ER – estrogenski receptori

FAC – polikemoterapijski protokol: 5-fluorouracil, doksorubicin i ciklofosamid

FDA – eng. Food and Drug Administration

FEC – polikemoterapijski protokol: 5-fluorouracil, epirubicin i ciklofosamid

FISH – eng. fluorescence in situ hybridization

GGT – gama glutamil transpeptidaza

GSK3 $\beta$  – eng. glycogen synthase kinase 3 $\beta$

GUK – glukoza u krvi

HER2/ECD – eng. human epidermal growth factor receptor 2 extracellular domain  
HER2/neu – eng. human epidermal growth factor receptor 2  
HIF (eng. hypoxia inducible factor)  
IGF-1 i -2 (eng. insulin-like growth factor 1 and 2)  
IHC – eng. immunohistochemistry  
LHRH – eng. luteinizing hormone releasing hormone  
LRP5 (eng. low-density lipoprotein receptor related protein 5)  
MR – magnetska rezonanca  
NOS – eng. not otherwise specified  
OS – eng. overall survival  
PARP – eng. poly ADP ribose polymerase  
PFS – eng. progression-free survival  
PR ili PgR – progesteronski receptori  
PTEN – eng. phosphatase on chromosome 10 gene product, mutated in Cowden disease  
QOL – eng. quality of life  
RANKL – eng. receptor activator of nuclear kappa-B ligand  
RECIST – eng. response evaluation criteria in solid tumors  
RTG – rentgen  
RT-PCR – eng. reverse transcription polymerase chain reaction  
TCF4/LEF – eng. T cell factor 4/lymphoid enhanced factor  
TGF – eng. transforming growth factor  
TNM – eng. T = tumor, N = node, M = metastasis  
TTP – eng. time to progression  
VEGF – eng. vascular endothelial growth factor  
WHO – eng. World Health Organization

## Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 1.1 Epidemiologija raka dojke .....  | 1  |
| 1.2 Patologija raka dojke i patohistološki prognostički čimbenici .....                                    | 1  |
| 1.2.1 Veličina primarnog tumora.....   | 6  |
| 1.2.2 Status pazušnih limfnih čvorova.....   | 7  |
| 1.2.3 Histološki stupanj diferenciranosti .....  | 8  |
| 1.2.4 Status hormonskih receptora .....  | 8  |
| 1.2.5 Histološki tip .....   | 10 |
| 1.2.6 Vaskularna invazija .....  | 10 |
| 1.2.7 HER2 status .....  | 10 |
| 1.2.8 Proliferacijski indeks Ki67 .....  | 11 |
| 1.2.9 Genetski profil .....  | 11 |
| 1.3 Klinički prognostički čimbenici: anatomsko širenje raka dojke i procjena<br>proširenosti bolesti ..... | 12 |
| 1.4 Klinička slika i rano otkrivanje raka dojke .....  | 16 |
| 1.5 Etiologija i patogeneza raka dojke .....   | 19 |
| 1.5.1 Čimbenici rizika za nastanak raka dojke .....  | 24 |
| 1.5.2 Uloga ženskih spolnih hormona u nastanku raka dojke .....  | 25 |
| 1.5.3 Uloga epidermalnog čimbenika rasta u nastanku raka dojke .....                                       | 27 |
| 1.5.4 Klinički značaj HER2/ECD.....  | 29 |
| 1.5.5 Liječenje raka dojke.....  | 32 |
| 2. HIPOTEZA .....  | 35 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....  | 36 |
| 4. BOLESNICI I METODE .....  | 37 |

|   |    |
|---|----|
| 4.1 Bolesnice i kontrolna skupina .....   | 37 |
| 4.2 Prikupljanje uzoraka tumorskog tkiva i određivanje ekspresije HER2/neu..... | 39 |
| 4.3 Prikupljanje i analiza uzoraka krvi i određivanje HER2/ECD u serumu.....    | 40 |
| 4.4 Procjena proširenosti bolesti i praćenje bolesnica .....                    | 40 |
| 4.5 Statistička analiza.....  | 42 |
| 5. REZULTATI .....  | 43 |
| 6. RASPRAVA .....   | 49 |
| 7. ZAKLJUČAK.....   | 61 |
| 8. SAŽETAK .....  | 62 |
| 8.1 Ključne riječi.....   | 63 |
| 9. SUMMARY .....  | 64 |
| 9.1 Keywords .....  | 65 |
| 10. LITERATURA .....  | 66 |
| 11.<br>ŽIVOTOPIS.....   |    |
| 82  |    |



# 1. UVOD

## 1.1 Epidemiologija raka dojke

Rak dojke najčešći je maligni tumor u žena u razvijenim zemljama svijeta, najčešći je uzrok smrtnosti od raka u žena od 20-59. godine života, te drugi po učestalosti uzrok smrtnosti od karcinoma u žena starijih od 60 godina. Obzirom na učestalost i estetske posljedice koje ostavlja liječenje raka dojke, u populaciji ima značajnu simboličnu vrijednost. Tijekom posljednjih 20 godina uloženi su iznimni naponi u istraživanje raka dojke, što je dovelo do brojnih spoznaja o njegovom nastanku i liječenju, a samim time i ranijem otkrivanju i razvoju novih, učinkovitijih, manje radikalnih i manje toksičnih terapija.

Incidencija raka dojke je stabilna od 1992. godine, nakon inicijalnog porasta zabilježenog od 1979. godine. U Sjedinjenim Američkim Državama 2005. godine zabilježeno je 211240 novooboljelih od raka dojke, a procjenjuje se da će u 2008. godini biti 184450 novooboljelih, te da će 40930 bolesnica umrijeti od raka dojke.<sup>i</sup>

Sukladno podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Republici Hrvatskoj je 2005. godine zabilježeno ukupno 2331 novooboljelih od raka dojke, s najvećom učestalošću od 50-79. godine života. Stopa incidencije iznosila je 100/100000 stanovnika za žene te 1,3/100000 za muškarce, odnosno ukupno 52,5/100000. Rak dojke je ujedno najčešće sjelo raka u žena u Hrvatskoj (24%).<sup>ii</sup>

## **1.2 Patologija raka dojke i patohistološki prognostički čimbenici**

Proliferativne promjene epitela dojke obuhvaćaju hiperplaziju, karcinom in situ i invazivni karcinom, a mogu nastati iz epitela mliječnih žljezda ili njihovih izvodnih kanalića, tj. iz dukalnog ili lobularnog epitela.<sup>iii</sup> Osim žljezdanih karcinoma u dojci rijetko mogu nastati dugi zloćudni tumori poput sarkoma, limfoma ili metastaza drugih primarnih tumora.<sup>iv</sup>

Invazivni karcinomi dojke su heterogena skupina bolesti koje se razlikuju po kliničkim, patohistološkim, biološkim i radiološkim osobinama. Najčešća histološka prezentacija karcinoma dojke je dukalni invazivni karcinom, čija se dijagnoza postavlja isključivanjem drugih, specifičnih, oblika. Većina klasifikacijskih sustava se za ovu bolest koristi nazivom invazivni dukalni karcinom koji nije specificiran drugačije (CDI NOS), a koji čini 70-80% svih invazivnih karcinoma dojke. Svi ostali oblici invazivnih karcinoma dojke čine 20-30% slučajeva.<sup>v</sup> U tablici 1 prikazane su vrste tumora dojke prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji.<sup>vi</sup>

### **Tablica 1. Podjela tumora dojke**

---

#### **Invazivni tumori dojke**

Invazivni dukalni karcinom

NOS

miješani tip

pleomorfni karcinom

karcinom s osteoklastičnim gigantskim stanicama

karcinom s osobinama koriokarcinoma

karcinom s melanotičkim osobinama

Invazivni lobularni karcinom

Tubularni karcinom

Invazivni kribriformni karcinom

Medularni karcinom

Mucinozni karcinom i drugi tumori s nakupljanjem sluzi

mucinozni karcinom

cistadenokarcinom

karcinom sa stanicama poput prstena pečatnjaka

Neuroendokrini tumori

solidni neuroendokrini karcinom (karcinoid dojke)

atipični karcinoid

karcinom malih stanica

neuroendokrini karcinom velikih stanica

Invazivni papilarni karcinom

Invazivni mikropapilarni karcinom

Apokrini karcinom

Metaplastični karcinomi

Čisti epitelni metaplastični karcinomi

karcinom pločastih stanica

adenokarcinom

adenoskvamozni karcinom

mukoepidermoidni karcinom

Miješani epitelno-mezenhimalni metaplastični karcinomi

Karcinom stanica bogatih mastima

Sekretorni karcinom

Onkocitični karcinom

Adenoid cistični karcinom

Karcinom acinarnih stanica

Karcinom svijetlih stanica bogatih glikogenom

Sebaceozni karcinom

Inflamatorni karcinom

Bilateralni karcinom dojke

**Mezenhimalni tumori (uključujući sarkome)**

Hemangiom

Angiomatoza

Hemangiopericitom

Pseudoangiomatozna stromalna hiperplazija

Miofibroblastom

Agresivna fibromatoza  
Inflamatorni miofibroblastični tumor

Lipom

angioliom

Tumor zrnatih stanica

Neurofibrom

Schwannom

Angiosarkom

Liposarkom

Rabdomiosarkom

Osteosarkom

Leiomiom

Leiomiosarkom

### **Tumori muške dojke**

Ginekomastija

Karcinom

in situ

invazivni

### **Maligni limfomi**

Non-Hodgkin limfom

**Metastatski tumori** u dojku iz drugih sijela u tijelu

### **Prekursorske lezije**

Lobularna neoplazija

lobularni karcinom in situ

Intraduktalne proliferativne lezije

uobičajena duktalna hiperplazija

ravna epitelna hiperplazija

atipična duktalna hiperplazija

duktralni karcinom in situ

Mikroinvazivni karcinom

Intraduktalne papilarne neoplazije

centralni papilom

- periferni papilom
- atipični papilom
- intraduktalni papilarni karcinom
- intracistični papilarni karcinom

### **Benigne epitelne lezije**

Adenoza

- sklerozirajuća adenoza
- apokrina adenoza
- adenoza slijepih kanalića
- mikroglandularna adenoza
- adenomioepitelna adenoza

Kompleksne sklerozirajuće lezije / ožiljci

Adenomi

- tubularni adenom
- laktadenom
- apokrini adenom
- pleomorfni adenom
- duktalni adenom

### **Mioepitelne lezije**

Mioepitelioza

Adenomioepitelna adenoza

Adenomioepiteliom

Maligni mioepiteliom

### **Fibroepitelni tumori**

Fibroadenom

Phyllodes tumor

- benigni
- granični
- maligni

Periduktalni stromalni sarkom niskog gradusa

Hamartom

### **Benigni tumori bradavice**

Adenom

Siringomatozni adenom

Pagetova bolest

**Maligni tumori bradavice**

Pagetova bolest

---

Pri dijagnozi invazivnog karcinoma dojke, nakon određivanja histološkog tipa tumora potrebno je definirati stupanj diferenciranosti, sukladno Elston-Ellisovoj modifikaciji Scarff-Bloom-Richardsonovog sustava.<sup>vii,viii</sup> U skladu s morfološkim značajkama (stvaranje tubula, polimorfizam jezgara, broj mitozna) tumori se razvrstavaju u tri skupine: niski (G1, 3-5 bodova, dobro diferenciran), srednjeg (G2, 6 i 7 bodova, srednje diferenciran) ili visokog (G3, 8 i 9 bodova, slabo diferenciran) stupnja.

U žljezdanim strukturama dojke postoje dva glavna podtipa epitelnih stanica, bazalni (mioepitelni) i luminalni, koji se mogu razlikovati određivanjem ekspresije citokeratina koji su specifični za pojedini podtip stanica. S obzirom na očuvanost ekspresije citokeratina i nakon maligne transformacije stanica, određivanjem njihove ekspresije možemo zaključiti o podrijetlu karcinoma. Tako razlikujemo karcinome podrijetla luminalnog epitela i, prognostički lošije zbog agresivnijeg tijeka bolesti, karcinome podrijetla bazalnog epitela (basal-like) koji čine 5-15% svih karcinoma dojke.<sup>ix</sup>

Spoznaje o staničnoj i molekularnoj heterogenosti raka dojke te o velikom broju gena uključenih u regulacijske procese staničnog rasta i razmnožavanja, smrti i diferencijacije, dovele su do pokušaja klasifikacije karcinoma dojke sukladno ukupnim obrascima genske ekspresije (global gene expression patterns). Neki su autori kombinirali DNA oligonukleotidne mikročip eseje s imunohistokemijskom analizom, te dobivene rezultate usporedili s kliničkim tijekom bolesti, čime su potvrdili opstojnost najmanje pet biološki različitih podtipova karcinoma dojke.<sup>x,xi</sup> Time su potvrđeni lošiji ishod liječenja za HER2 pozitivne, basal-like karcinome, te bolja prognoza bolesnica s luminalnim A podtipom tumora u odnosu na bolesnice s luminalnim B podtipom. Bolesnice koje imaju mutaciju BRCA1 gena imaju tumore agresivnijeg kliničkog tijeka, visokog gradusa i stope proliferacije, koji su najčešće ER, PR i HER2 negativni, a genetski profil im ukazuje na podrijetlo iz bazalnog epitela.<sup>xii,xiii,xiv</sup>

S obzirom da je rak dojke heterogena skupina bolesti koja se razlikuje prema svojim kliničkim, histološkim, biološkim, molekularnim i genetskim značajkama, tijekom niza godina proučavanja definirani su brojni klinički i patohistološki rizični čimbenici, zasebno za lokalni i metastatski povrat bolesti. Slijedi prikaz najvažnijih prognostičkih čimbenika povrata bolesti.

### 1.2.1 Veličina primarnog tumora

Veličina primarnog tumora u invazivnom raku dojke je dovoljno bitna kao prognostička varijabla da tolerira odstupanja zbog mjerenja različitim metodama (klinička procjena, mamografija ili patohistološki preparati). Prema brojnim analizama prognostički je važnija samo zahvaćenost pazušnih limfnih čvorova. Direktno je povezana s većom vjerojatnošću prisutnosti lokoregionalnih metastaza, većim brojem zahvaćenih pazušnih limfnih čvorova te većom vjerojatnošću recidiva i smrti od raka dojke.

Bolja prognoza nepalpabilnih invazivnih karcinoma u usporedbi s palpabilna je uzrokovana upravo manjim primarnim tumorom. Metastaze u pazušnim limfnim čvorovima uočavaju se u samo 7,7% bolesnica s tumorima veličine 0,1 do 5 mm, dok se u bolesnica s tumorima promjera 6-10 mm uočava u 12,5% slučajeva. Tumori jednake veličine imaju jednaku prognozu bez obzira jesu li palpabilni ili ne, odnosno bez obzira na koji način se otkriju.

Utjecaj veličine primarnog tumora na prognozu može se statistički raspoznati i u bolesnica s negativnim i u bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima, što se tumači češćom vaskularnom ili limfnom invazijom u većim tumorima. Najveća je prognostička važnost veličine tumora u bolesnica s negativnim limfnim čvorovima, prvenstveno u smislu češćeg lokalnog recidiva. Naime, u 30% bolesnica s primarnim tumorom većim od 1 cm i negativnim pazušnim limfnim čvorovima citološki je dokazana i infiltracija koštane srži.<sup>xv,xvi</sup>

Tumori manji od 1 cm su osobito prognostički povoljni. Petogodišnje preživljenje u N0 bolesnica s tumorom manjim od 1 cm je 92-96%. Velika studija provedena u Sloan-Kettering centru pokazala je da je u ovih bolesnica 10-godišnje preživljenje bez znakova bolesti 91%. Upravo zahvaljujući toj studiji (i nekoliko sličnih) razlučile su se bolesnice s primarnim tumorom manjim od 1 cm i negativnim limfnim čvorovima kao bolesnice koje nemaju koristi od adjuvantne sistemske terapije.

## 1.2.2 Status pazušnih limfnih čvorova

Status pazušnih limfnih čvorova najvažniji je prognostički čimbenik ukupnog preživljenja i ima ključnu ulogu pri određivanju kliničkog stadija bolesti.<sup>xvii</sup> Stratifikacijom rizika povrata bolesti otkrilo se da bolesnice s 1-3 pozitivna lokoregionalna limfna čvora imaju jednak rizik kao bolesnice s negativnim čvorovima, te su se samo bolesnice s 4 ili više pozitivnih limfnih čvorova smatrale rizičnijim i u njih je rutinski provedena adjuvantna radioterapija limfne drenaže. Od prošle godine napuštena je takva praksa, obzirom da su objavljene dodatne analize ukupnog preživljenja nakon duljeg praćenja, te se u svih bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima rutinski provodi adjuvantna radioterapija limfne drenaže.<sup>xviii</sup> Poboljšanjem tehnike radioterapije (3D konformalna terapija vanjskim snopovima) umanjena je i njezina kardiotoksičnost, te se u posljednjih godinu dana u znanstvenoj zajednici dosta raspravlja i o zahvaćenosti (koja može biti potvrđena samo radiološki) i adjuvantnoj radioterapiji limfnih čvorova uz a. mammariu internu, no po tom pitanju još uvijek nije postignut konsenzus.

Sukladno AJCC sustavu prihvaćena je pojednostavljena shema stratifikacije rizika, prema kojoj se bolesnice dijele u četiri skupine: negativni limfni čvorovi, 1-3 pozitivna limfna čvora, 4-9 pozitivnih limfnih čvorova te 10 i više pozitivnih limfnih čvorova.<sup>xix</sup>

## 1.2.3 Histološki stupanj diferenciranosti

Histološki gradus tumora jedan je od ključnih patohistoloških čimbenika rizika, a može biti i čimbenik odluke o potrebi adjuvantne kemoterapije. Za histološko stupnjevanje karcinoma dojke koristi se Bloom-Richardsonov sustav, pri čemu se tumor vrednuje na skali od 1 do 3. Procjenjuju se tri mikroskopske osobine tumorskih stanica: stpanj formiranja tubula (odnosno postotak tumora koji se sastoji od tubularnih struktura), tumorska mitotička aktivnost (brzina dijeljenja stanica) te nuklearni gradus (veličina i uniformnost stanica). Svaka od navedenih osobina boduje se od 1-3, te se dobija ukupni zbroj, koji može biti od 3 do 9. Tumori ukupnog zbroja 3-5 smatraju se tumorima histološkog gradusa 1 (dobro diferencirani), tumori zbroja 6-7 smatraju se tumorima histološkog gradusa 2 (umjereno diferencirani), a tumori zbroja 8-9 smatraju se



tumorima histološkog gradusa 3 (slabo diferencirani). Dakle, tumori višeg gradusa su histološki slabije diferencirani, a što je povezano s bržim rastom tumora, češćim metastaziranjem i češćom infiltracijom krvnih i limfnih žila. Samim time bolesnice s dobro diferenciranim karcinomima (G1) imaju značajno bolje ukupno preživljenje od bolesnica sa srednje (G2) i slabo (G1) diferenciranim karcinomima.

#### 1.2.4 Status hormonskih receptora

Status ER i PR važan je pri izboru modaliteta liječenja karcinoma dojke. Bolesnice s tumorima koji ne izražavaju hormonske receptore nemaju koristi od liječenja hormonskom terapijom, bilo da imaju metastatsku ili lokaliziranu bolest. Iako većina studija ukazuje na bolje preživljenje bolesnica čiji tumori imaju izražene hormonske receptore, postoje i istraživanja koja ukazuju suprotno, osobito u premenopauzalnih bolesnica.<sup>xx,xxi</sup> Neki autori sugerirali su i nepodudarnost metodologije određivanja statusa hormonskih receptora (neusporedivost imunohistokemijskih i biokemijskih metoda).<sup>xxii,xxiii</sup>

Naime, imunohistokemijsko određivanje hormonskih receptora pokazalo se kao jednako dobro ili bolje od drugih referentnih metoda određivanja (DCC [eng. dextran-coated charcoal assay], EIA, ELISA) u 20 od 22 studije, koje su usporedile pojačanu ekspresiju estrogenskih i progesteronskih receptora u prediktivnom smislu za učinkovitost hormonske terapije te u prognostičkom smislu za ukupno preživljenje, preživljenje bez znakova bolesti, vrijeme do progresije bolesti, vrijeme do pojave udaljenih metastaza odnosno trajanje kompletne remisije.

Imunohistokemijsko određivanje ima određene prednosti nad starijim metodama određivanja hormonske ekspresije, poput potrebe za manjom količinom uzorkovanog tkiva, mogućnosti testiranja u preparatima fiksiranim formalinom (što istovremeno omogućava određivanje histološke vrste i gradusa tumora), te mogućnosti uskladištavanja preparata i naknadne retrospektivne analize. Kako bi se tumor proglasio hormonski neovisnim, potrebno je u uzorku analizirati najmanje 100 tumorskih jezgara. Analiza se provodi u parafinom fiksiranim preparatima, no za validaciju kvalitete parafinske fiksacije koriste se smrznuti blokovi. Ukoliko se hormonska ekspresija imunohistokemijski određuje iz smrznutih blokova, konkordancija između smrznutih i parafinskih blokova iznosi preko 72% (medijan 91,4%) za estrogenske receptore, a

preko 84% (medijan 90,8%) za progesteronske receptore. Bez obzira kojom metodologijom se određuju estrogenski receptori (parafin, smrznuti uzorak ili DCC) prediktivna im je vrijednost jednaka, iako je u jednoj od spomenutih studija imunohistokemijsko određivanje iz parafinskih blokova čak imalo prednost. Analiza u smrznutim uzorcima je teža kod malih uzoraka tumorskog tkiva, što je od posebnog značenja u bolesnica s malim nepalpabilnim primarnim tumorom zbog otežanog uzorkovanja.

Danas je uobičajena praksa imunohistokemijsko određivanje hormonskih receptora iz parafinskih blokova, prvenstveno zbog mogućnosti istovremenog određivanja hormonske ovisnosti i histološke vrste tumora.

#### 1.2.5 Histološki tip

Niz istraživanja ukazao je na bolju prognozu bolesnica s tubularnim, invazivnim kribriformnim, mucinoznim, adenoid cističnim i papilarnim podtipom karcinoma dojke u usporedbi s bolesnicama s duktalnim invazivnim karcinomom (NOS).<sup>xxiv,xxv</sup>

Prognostičko značenje medularnog karcinoma još uvijek nije razjašnjeno, dok invazivni lobularni karcinomi imaju sličnu prognozu kao i duktalni.<sup>xxvi</sup>

Sve histološke vrste tumora dojke prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji veću su prethodno prikazane u tablici 1.

#### 1.2.6 Vaskularna invazija

Vaskularna invazija prepoznata je kao zaseban rizični čimbenik, no za pouzdanost ovog kriterija važno je nedvojbeno postojanje malignih stanica unutar endotelnih prostora izvan glavne tumorske mase u najmanje dva patološka reza tumora.<sup>xxvii</sup> Pinder i suradnici su još 1994. godine istakli prognostičku važnost tumorske invazije vaskularnih prostora (limfnih i krvnih žila) procijenjenu bojanjem hemalaunom i eozinom. Dokazali su da je vaskularna invazija snažno povezana s brojem zahvaćenih pazušnih limfnih čvorova, veličinom primarnog tumora, histološkim gradusom i histološkom vrstom tumora, te da predstavlja neovisan prognostički čimbenik i za ukupno preživljenje i učestalost lokalnog recidiva. Vaskularna invazija nije povezana s hormonskom ovisnošću tumora.

### 1.2.7 HER2 status

Prekomjernu ekspresiju HER2/neu nalazimo u 25-30% bolesnica s karcinomom dojke, a dobro je prepoznat rizični čimbenik lošijeg ukupnog preživljenja i ranijeg povrata bolesti. Najvažniji je prediktivni čimbenik učinkovitosti terapije trastuzumabom. Prognostičkom i prediktivnom značenju HER2/neu pozitivnosti, s obzirom na važnost za provedeno istraživanje, posvećeno je zasebno poglavlje u daljnjem tekstu.

### 1.2.8 Proliferacijski indeks Ki67

Ki67 je jedan od najvažnijih proliferacijskih biljega, a ukazuje na udio malignih stanica u fazi rasta i razmnožavanja. U bolesnica s lokaliziranom bolešću njegova viša vrijednost korelira s ranijim povratom bolesti i lošijim ukupnim preživljenjem. U bolesnica s lokalno uznapredovalom bolešću (klinički stadij III) viša vrijednost Ki67 ima prediktivni značaj za bolju učinkovitost neoadjuvantne kemoterapije, dok niža vrijednost Ki67 nakon provedene kemoterapije korelira s duljim vremenom do povrata bolesti i boljim ukupnim preživljenjem.<sup>xxviii</sup>

Još od 2005. godine proliferacijski indeks Ki67 shvaćen je kao značajan negativan prognostički čimbenik i sugirirana njegova uporaba za odluku o sistemskej adjuvantnoj terapiji u bolesnica s rakom dojke. Iako još uvijek nije jednoglasno prihvaćena metodologija kojom bi se trebao određivati, niti su nedvojbeno razjašnjene granične vrijednosti za stratifikaciju rizika, 2007. godine je na osnovi multivarijatne analize identificirana prekomjerna ekspresija Ki67 ( $\geq 10\%$ ) kao neovisan prognostički čimbenik ukupnog preživljenja i preživljenja bez znakova bolesti, osobito u bolesnica s hormonski ovisnim i HER2/neu negativnim tumorima. Sukladno preporukama stručnjaka (St Gallen) iz 2009. godine, proliferacijski indeks Ki67 treba se smatrati važnim razlučnim čimbenikom za primjenu kemoterapije uz hormonsku terapiju u bolesnica s hormonski ovisnim tumorima, a pritom se tumori trebaju klasificirati kao slabo proliferirajući (Ki67  $\leq 15\%$ ), srednje proliferirajući (Ki67 16-30%) i jako proliferirajući (Ki67  $>30\%$ ).

### 1.2.9 Genetski profil

Koristeći obrasce genske ekspresije i tehnologiju DNA oligonukleotidne mikročip tehnologije, van der Vijver i sur. su razvili prognostički obrazac koji se sastoji od 70 različitih gena, a koji je ukazao na statistički značajnu razliku u ukupnom 10-godišnjem preživljenju bolesnica s karcinomom dojke stadija I i II povoljnog genetskog profila u usporedbi s nepovoljnim. Prognostička vrijednost ove metode pokazala se boljom od klasične kliničko-histološke stratifikacije rizika.<sup>xxix</sup>

Komercijalno je dostupan i Oncotype DX esej (Genomic Health Inc.), kojim se iz parafinskog tumorskog uzorka učini prognostički profil od 21 gena, temeljem kojeg se definira rizik povrata bolesti u narednih 10 godina. Paik i sur. su 2004. godine analizirali bolesnice iz studije NSABP B-14, koje su imale negativne limfne čvorove, hormonski pozitivne tumore i liječene su samo tamoksifenom, pri čemu su dokazali manji rizik pojave udaljenih metastaza u bolesnica s niskorizičnim genetskim profilom u usporedbi s bolesnicama s većim rizikom.<sup>xxx</sup>

### **1.3 Klinički prognostički čimbenici: anatomsko širenje raka dojke i procjena proširenosti bolesti**

Dojka se histološki sastoji od kože, potkožnog tkiva, te žljezdanog epitela mliječne žlijezde uklopljenog u vezivnu stromu i okolno masno tkivo. Na vrhu dojke je bradavica kroz koju se dreniraju izvodni kanalići mliječne žlijezde, koja se sastoji od 15 do 20 alveotubularnih žlijezda (režnja), koji se dijele na režnjiće odijeljene vezivnim pregradama. Limfna drenaža odvija se putem površinske i duboke limfne mreže koje su međusobno povezane, a najvećim dijelom putem pazušnih limfnih čvorova koji se dijele u tri razine sukladno anatomskom odnosu prema malom prsnom mišiću: prva razina se

nalazi inferolateralno od mišića, druga razina ispod mišića, a treća je razina kraniomedijalno (infraklavikularno).

Rak dojke najčešće metastazira limfnim putem u limfne čvorove pazuha. Preoperativnom limfoscintigrafijom u bolesnica s klinički negativnim limfnim čvorovima, utvrđeno je da je limfna drenaža u pazušne limfne čvorove najčešća bez obzira na lokalizaciju tumora u dojci (95,2% bolesnica).<sup>xxxii</sup> Limfni čvorovi uz a. mammariu internu zahvaćeni su najčešće u bolesnica s tumorom u donjem medijalnom kvadrantu dojke (u 52% bolesnica), iako se i u njih najčešće odvija primarno putem pazušnih limfnih čvorova (u 88% bolesnica).

Udaljene metastaze podrazumijevaju širenje raka dojke u druge organe. Najčešća sjela metastaziranja su kosti, pluća, jetra, limfni čvorovi i mozak, uz napomenu da su metastaze uočene u praktično svim organima u tijelu. Značajke primarnog tumora mogu sugerirati inicijalno mjesto rasapa bolesti, pa tako hormonski ovisni tumori najčešće prvo metastaziraju u kosti, hormonski negativni i HER2 pozitivni u jetru i pluća, a lobularni u pleuru i peritoneum.

Osim prethodno opisanih histoloških čimbenika rizika, proširenost bolesti iznimno je važna za procjenu prognoze bolesnica s rakom dojke, te prije početka liječenja svim bolesnicama treba odrediti stadij bolesti. Najčešće se koristimo TNM klasifikacijom AJCC sustava:

### **Primarni tumor (T)**

**TX** Primarni tumor se ne može procijeniti.

**T0** Nema dokaza za postojanje primarnog tumora.

**Tis** Karcinom in situ.

**T1** Tumor 2 cm ili manji u najvećem promjeru:

T1mic Mikroinvazija 0,1 cm ili manje,

T1a Tumor veći od 0,1 cm, ali ne veći od 0,5 cm,

T1b Tumor veći od 0,5 cm, ali ne veći od 1 cm,

T1c Tumor veći od 1 cm, ali ne veći od 2 cm.

**T2** Tumor veći od 2 cm, ali ne veći od 5 cm.

**T3** Tumor veći od 5 cm.

**T4** Tumor bilo koje veličine s direktnim širenjem u (a) torakalnu stijenku ili (b) kožu, kako je navedeno ispod:

T4a Širenje u torakalnu stijenku, ne uključujući pektoralni mišić,

T4b Edem (uključujući „peau d orange“) ili ulceracija kože dojke, satelitski čvor u koži ograničen na istu dojku,

T4c T4a i T4b,

T4d Inflamatorni karcinom.

### **Regionalni limfni čvorovi (N)**

#### **Patološki (pN)<sup>a</sup>**

**pNX** Zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova ne može se procijeniti (npr. prethodno odstranjeni),

**pN0** Bez presadnica u regionalnim limfnim čvorovima histološki, bez dodatnog pregleda za izolirane tumorske stanice (ITC).

Napomena: ITC se definiraju kao pojedinačne tumorske stanice obično uočljive samo imunohistokemijskim ili molekularnim metodama, ali mogu biti uočene i bojanjem hemalaunom i eozinom. Nakupine stanica veće od 0,2 (i/ili više od 200 stanica) do 2 mm smatraju se mikrometastazama. Izolirane tumorske stanice obično ne pokazuju znakove metastatske aktivnosti, npr. proliferaciju ili stromalnu reakciju ili penetraciju u krvne ili limfne žile. Prema tome, postoje:

pN0(i-) Bez presadnica u regionalnim limfnim čvorovima histološki, negativan morfološki nalaz na ITC (IHC),

pN0(i+) Nakupine malignih stanica u regionalnim limfnim čvorovima (H&E, IHC ili ITC) ne veće od 0,2 mm,

pN0(mol-) Bez presadnica u regionalnim limfnim čvorovima histološki, negativan molekularni nalaz (RT-PCR) na ITC,

pN0(mol+) Bez presadnica u regionalnim limfnim čvorovima histološki, pozitivan molekularni nalaz (RT-PCR) na ITC.

<sup>a</sup>Klasifikacija se temelji na disekciji pazušnih limfnih čvorova s ili bez sentinel disekcije limfnih čvorova. Klasifikacija temeljena isključivo na sentinel disekciji limfnih čvorova

bez naknadne disekcije pazušnih limfnih čvorova se određuje s (sn) za „sentinel čvor“, npr. pN0(i+) (sn).

**pN1** Presadnice u 1 do 3 pazušna limfna čvora, i/ili unutarnje mamarne čvorove s mikroskopskom bolešću koja je otkrivena disekcijom sentinel limfnih čvorova, ali nije *klinički uočljiva*:

pN1m Mikropresadnice (veće od 0,2 mm, ne više od 2,0 mm),

pN1a Presadnice u 1 do 3 pazušna limfna čvora,

pN1b Presadnice u unutarnje mamarne limfne čvorove s mikroskopskom bolešću koja je otkrivena disekcijom sentinel limfnih čvorova, ali nije *klinički uočljiva*,

pN1c Presadnice u 1 do 3 pazušna limfna čvora i unutarnje mamarne limfne čvorove s mikroskopskom bolešću koja je otkrivena disekcijom sentinel limfnih čvorova, ali nije *klinički uočljiva*.

**pN2** Presadnice u 4 do 9 pazušnih limfnih čvorova, ili u *klinički uočljive* unutarnje mamarne limfne čvorove u odsutnosti presadnica u pazušne limfne čvorove:

pN2a Presadnice u 4 do 9 pazušnih limfnih čvorova (najmanje jedan tumorski depozit mora biti veći od 2,0 mm),

pN2b Presadnice u *klinički uočljive* unutarnje mamarne limfne čvorove u odsutnosti presadnica u pazušne limfne čvorove.

**pN3** Presadnice u 10 ili više pazušnih limfnih čvorova, ili u infraklavikularne limfne čvorove, ili u *klinički uočljive* istostrane unutarnje mamarne limfne čvorove uz prisutnost jednog ili više pozitivnih pazušnih limfnih čvorova, ili u više od 3 pazušna limfna čvora s klinički negativnim mikroskopskim presadnicama u unutarnje mamarne limfne čvorove, ili u istostrane supraklavikularne limfne čvorove:

pN3a Presadnice u 10 ili više pazušnih limfnih čvorova (najmanje jedan tumorski depozit mora biti veći od 2,0 mm), ili presadnice u infraklavikularne limfne čvorove,

pN3b Presadnice u *klinički uočljive* istostrane unutarnje mamarne limfne čvorove uz prisutnost jednog ili više pozitivnih pazušnih limfnih čvorova; ili u više od 3 pazušna limfna čvora i u unutarnje mamarne

limfne čvorove s mikroskopskom bolešću koja je otkrivena disekcijom sentinel limfnih čvorova ali nije *klinički uočljiva*,

pN3c Presadnice u istostrane supraklavikularne limfne čvorove.

*Klinički uočljiv* se definira mogućnošću otkrivanja radiološkim pretragama (isključujući limfoscintigrafiju) ili kliničkim pregledom.

Određivanje kliničkog stadija bolesti iz TNM klasifikacije prikazano je u tablici 2.

**Tablica 2. Određivanje kliničkog stadija raka dojke prema AJCC**

| <b>Stadij</b> | <b>T</b>    | <b>N</b>    | <b>M</b> |
|---------------|-------------|-------------|----------|
| <b>0</b>      | Tis         | N0          | M0       |
| <b>I</b>      | T1          | N0          | M0       |
| <b>IIA</b>    | T0-1        | N1          | M0       |
|               | T2          | N0          | M0       |
| <b>IIB</b>    | T2          | N1          | M0       |
|               | T3          | N0          | M0       |
| <b>IIIA</b>   | T0-2        | N2          | M0       |
|               | T3          | N1-2        | M0       |
| <b>IIIB</b>   | T4          | N0-2        | M0       |
| <b>IIIC</b>   | Bilo koji T | N3          | M0       |
| <b>IV</b>     | Bilo koji T | Bilo koji N | M1       |



## 1.4 Klinička slika i rano otkrivanje raka dojke

Većina bolesnica s rakom dojke prezentira se bezbolnim čvorićem u dojci ili patološkim nalazom mamografije tijekom rutinskog probira zdravih žena. Kod lokalno uznapredovale bolesti mogu se uočiti kožne promjene, krvavi iscjedak iz bradavice, promjene oblika ili veličine dojke. Klinički stadij bolesti (a posljedično i mortalitet) u trenutku postavljanja dijagnoze ovisi i o geografskoj lokalizaciji, pa se tako u razvijenim zemljama u trenutku postavljanja dijagnoze rijetko vidi pazušna limfadenopatija, dok se tek 5-10% bolesnica prezentira s metastazama. Nasuprot tome, u siromašnim krajevima s teško dostupnom kvalitetnom zdravstvenom skrbi većina bolesnica u trenutku postavljanja dijagnoze ima uznapredovalu bolest. Primjerice, u crkinja u Južnoj Africi bolest se otkriva u III stadiju kod 41,6% bolesnica, a u IV stadiju u čak 36,1% bolesnica.<sup>xxxii</sup>

U Sjedinjenim Američkim Državama znatno se smanjio mortalitet od raka dojke tijekom posljednjeg desetljeća, uslijed sve ranijeg otkrivanja s jedne strane, te poboljšanja terapijskih mogućnosti s druge strane. Nažalost, u Republici Hrvatskoj se u lokaliziranom stadiju bolest otkriva tek u 42% bolesnica, u stadiju II u 47% bolesnica, a u stadijima III i IV u 11% bolesnica. Izlječivost bolesti je, naravno, daleko veća u stadiju I od ostalih kliničkih stadija bolesti.

Rak dojke jedina je maligna bolest epitelnih stanica za koju se pokazalo da adekvatan probir poboljšava prognozu (u vidu mamografije jedan puta godišnje). Meta-analiza randomiziranih kliničkih istraživanja u smislu ispitivanja učinka mamografije na poboljšanje preživljenja ukazuje na 25-30%-tno smanjenje rizika mortaliteta od raka dojke uz redovito mamografsko praćenje jednom godišnje nakon 50. godine života, a podaci za žene u dobi 40. do 50. godina gotovo su identični. Iako perzistiraju kontroverze oko probirne mamografije, superiornost pozitivnosti navedenih rezultata podržava njezinu rutinsku uporabu. Novije analize starijih randomiziranih kliničkih studija ne pokazuju ovako pozitivne rezultate, no većina stručnjaka (uključujući odbore American Society of Clinical Oncology, te American Cancer Society) danas smatra da screening donosi značajnu korist, pogotovo ako se uzme u obzir da se nedostaci pojedinih starijih studija danas više ne mogu ispraviti. Nadalje, značajno poboljšanje preživljenja od raka dojke tijekom posljednjeg desetljeća teško se može pripisati samo

poboljšanju terapijskih modaliteta. Čak se čini mudrom odlukom pomaknuti dobnu granicu mamografskog probira za 10 godina, te započeti godišnje radiološke preglede u žena nakon 40. godine života. Iako niti jedna randomizirana studija nije pokazala korist od samopregleda dojki u smislu poboljšanja preživljenja, čini se kako glavna korist leži u povećanoj učestalosti poštenih kirurških zahvata. Bolja tehnologija mamografije, uključujući digitalnu mamografiju, rutinska uporaba uvećanih snimaka, kao i veća vještina u očitavanju i interpretaciji mamografskih nalaza, osobito u kombinaciji s novijim dijagnostičkim tehnikama (magnetska rezonancija, magnetska rezonancija sa spektroskopijom, pozitronska emisijska tomografija itd.) će vjerojatno učiniti daljnji pomak u smislu ranije i pouzdanije identifikacije karcinoma dojke.

Sukladno meta-analizi smrtnost od karcinoma dojke smanjuje se za 18% uz uvođenje mamografskog probira.<sup>xxxiii</sup> Glavni problem mamografske dijagnostike je nespecifičnost tumorskih obilježja, zbog čega se javlja relativno velik broj lažno pozitivnih nalaza, a zbog čega je potrebna dodatna dijagnostika. Osjetljivost metode je oko 77-95%, a sukladno provedenim kliničkim pokusima učestalost lažno pozitivnih nalaza je 2-6%. Jednako tako, incidencija lažno pozitivnih nalaza veća je u mlađih žena od 59 godina u odnosu na starije, sukladno nekim istraživanjima čak i do 20%.<sup>xxxiv</sup>

Kako bi se povećalo osjetljivost i specifičnost metode, možemo se koristiti dvostrukim očitanjem bilo od strane drugog radiologa, bilo od strane računala (tzv. double-reading odnosno computer-assisted mamografija).<sup>xxxv</sup> Dvostruko očitavanje može se učiniti na više načina – može se dva puta očitavati iste informacije sa snimke od strane dva neovisna radiologa ili dva puta od istog radiologa, ili pak očitavanje od strane jednog a ponovna provjera sumnjivih promjena od strane drugog radiologa tj. metodologija zasnovana na odvojenom očitavanju različitih osobina mamografskih snimaka. Komparacijom jednostrukog i dvostrukog očitavanja mamografskih snimaka uočava se porast osjetljivosti za 7%, kao i smanjenje vjerojatnosti lažno negativnih i pozitivnih nalaza.<sup>xxxvi</sup> Realan praktični problem je ograničen ljudski kapacitet za dvostruko očitavanje snimaka, te su za ispomoć razvijeni kompjutorski analitički modeli. Iako je njihova učinkovitost u praksi još uvijek kontroverzna, sukladno nekim istraživanjima korist bi mogla biti podjednaka dvostrukom očitavanju od strane radiologa.<sup>xxxvii</sup> Naime, komparacijom jednostrukog očitavanja s kompjutorskom asistencijom i dvostrukog očitavanja dobijaju se

senzitivnost, specifičnost i pozitivna prediktivna vrijednost od 87.2%, 96.9% i 18.0% naprama 87.7%, 97.4% i 21.1%.

Sukladno navedenom, krajem 2006. godine započeo je program ranog otkrivanja raka dojke „Mamma“, prvi nacionalni program javnog otkrivanja malignih bolesti u Hrvatskoj. Program je sukladan Rezoluciji o prevenciji i kontroli karcinoma (WHO 58.22 „Cancer prevention and control“) koju je usvojila Svjetska zdravstvena organizacija. Osmišljen je kao program mamografskog screeninga svake 2-3 godine svih žena u Republici Hrvatskoj (a najmanje 70%) starijih od 50 godina života, obzirom na upitnu vrijednost mamografskog probira u dobnoj skupini od 40-49 godine života. Od programa očekujemo redistribuciju stadija otkrivanja bolesti (veći udio lokaliziranog od metastatskog), uz porast incidencije raka dojke tijekom slijedećih nekoliko godina. Posljedično tome očekuje se i smanjenje mortaliteta od raka dojke za 25% tijekom 5 godina nakon početka programa.

## **1.5 Etiologija i patogeneza raka dojke**

Rak dojke je heterogena bolest bez jasno definiranog uzročnika. Kroz povijest je inicijalno shvaćen kao lokalna bolest koja se prvo širi limfogeno, a tek potom daje udaljene metastaze. Sukladno navedenom, s godinama su kirurški zahvati postajali sve radikalniji, sve do uvođenja radikalne mastektomije s odstranjenjem pazušnih limfnih čvorova u inicijalnu kiruršku terapiju raka dojke 1882. godine (Halsted). Kako takav pristup tijekom slijedećih stotinu godina nije davao značajnog poboljšanja u

preživljenju, te kako se u većine bolesnica i dalje javljao recidiv u vidu diseminirane bolesti, 1980. godine Fischer je predložio model prema kojem je rak dojke inicijalno sustavna bolest, a sukladno kojem je svakoj bolesnici s rakom dojke potrebna sustavna terapija. Kada se uočilo da sustavna terapija dovodi do smanjenja učestalosti i lokalnog recidiva bolesti i pojavnosti udaljenih metastaza, te da se adekvatnom lokalnom terapijom jednako tako smanjuje i učestalost lokalnog recidiva i udaljenih metastaza, 14 godina kasnije prihvaćen je spektarni model (Hellman, 1994.) koji predlaže da rak dojke u trenutku postavljanja dijagnoze može biti dio čitavog spektra bolesti, od lokalne do inicijalno sustavno proširene.<sup>xxxviii</sup> Spektarni model ističe važnost kako lokalnog i sustavnog liječenja, tako i rane detekcije raka dojke (screening mamografija) u sprečavanju povrata bolesti, a zahvaljujući prihvaćanju tog modela tijekom posljednjih godina dolazi do smanjenja radikalnosti kirurških zahvata (poštedni kirurški zahvat u vidu odstranjenja samo tumora ili kvadranta dojke uz dodatnu lokalnu radioterapiju zamijenio je radikalnu mastektomiju s jednakom učinkovitošću u sprečavanju recidiva), uz kontinuirano probiranje rizičnih čimbenika za recidiv bolesti i optimizaciju adjuvantne terapije.<sup>xxxix,xl</sup>

Karcinom dojke nastaje, poput drugih vrsta karcinoma, kao posljedica oštećenja gena koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa. Konstitutivna ekspresija oštećenih onkogenih gena, gubitak funkcije tumorskih supresorskih gena, kao i ekspresija antiapoptotičkih gena i gubitak funkcije proapoptotičkih gena uslijed mutacija ili bilo kojih drugih genetskih promjena dovodi do nekontrolirane diobe i rasta stanica te besmrtnosti stanice, omogućujući time daljnja oštećenja genoma i nastanak raka.

Protoonkogen ciklin D1 važan je regulator prijelaza iz G1 u S fazu staničnog ciklusa. Naime, vezivanjem s partnerskim kinazama CDK4 i 6 (eng. *cyclin dependent kinase 4 and 6*) stvara aktivne komplekse koji fosforiliraju RB protein (eng. *retinoblastoma tumor suppressor protein*), a njegova hiperfosforilacija dovodi do proizvodnje RB-sekvestriranih E2F transkripcijskih faktora i posljedične ekspresije gena potrebnih za ulazak u S fazu. Osim toga, ciklin D1 je ujedno i kofaktor nekoliko transkripcijskih faktora, a predominantno se nalazi u jezgrama stanica. Tijekom G1 faze dolazi do gomilanja ciklina D1, njegovog transporta u citoplazmu, fosforilacije na Thr-286 putem GSK3 $\beta$  (eng. *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) i konačne degradacije na ubikvitinsko-proteasomskom sustavu, nakon čega dolazi do prijelaza stanice u S fazu ciklusa.<sup>xli</sup>

Transport ciklina D1 u citoplazmu i njegova degradacija ključan je proces u progresiji G1 u S fazu ciklusa, obzirom da blokada fosforilacije treonina-286 i posljedična stabilizacija i gomilanje ciklina D1 dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1 fazi.<sup>xlii</sup> Novija istraživanja ukazuju da je u trećine bolesnica s rakom dojke osim aktivacije ciklina D1 nazočna i inaktivacija p16 proteina, G1-specifičnog inhibitora staničnog ciklusa koji sprečava povezivanje CDK4 i CDK6 s ciklinom D1, čime se omogućuje dodatno pojačanje procesa razmnožavanja stanica.

Wnt1 je prvi otkriveni onkogen koji ima ulogu u nastanku raka dojke u miševa, a čija se transkripcija aktivira insercijom MMTV.<sup>xliii</sup> Wnt signalni put ima ulogu u pokretanju staničnog ciklusa, a dijelovi su mu identični u gotovo svih danas postojećih živih bića. Ljudski genom kodira oko 20 različitih Wnt liganada.<sup>xliv</sup> Vezivanjem liganda aktivirani receptor u suradnji s LRP5 (eng. *low-density lipoprotein receptor related protein 5*) aktivira citoplazmatski protein Dishevelled (od eng. *dishevel* = stvaranje nereda), koji u suradnji s GBP (eng. *GSK3 $\beta$  binding protein*) inhibira GSK3 $\beta$  kinazu.<sup>xlv,xlvi</sup> GSK3 $\beta$  kinaza je sastavni dio multiproteinskog kompleksa koji se sastoji još od aksina, APC (eng. *adenomatous polyposis coli*), konduktina,  $\beta$ -katenina i kazein kinaze II (CKII), a čija je uloga potpomaganje dvostupanjske fosforilacije i posljedične razgradnje  $\beta$ -katenina putem ubikvitinsko-proteasomskog sustava (UPS). Inhibicijom GSK3 $\beta$  kinaze dolazi do stabilizacije  $\beta$ -katenina, što dovodi do njegovog gomilanja u staničnoj jezgri, stvaranja kompleksa  $\beta$ -katenina s transkripcijskim čimbenikom TCF4/LEF (eng. *T cell factor 4/lymphoid enhanced factor*) te konačno pokretanja procesa transkripcije 20-ak različitih gena uključenih u procese staničnog razmnožavanja, apoptoze i metastaziranja, poput ciklina D1, C-myc, MMP-7, CD44, Nr-CAM, L1, glikoproteina P, interleukina-8, Id2, C-jun, Fra-1, Groucho proteina, CBP/p300, Frizzled, Akt1, PPAR $\delta$ , konduktina, Met, te EphB2 i B3.<sup>xlvii,xlviii,xlix,l,li,lii,liii,liv,lv,lvi,lvii,lviii,lix,lx</sup>  $\beta$ -katenin pokreće transkripciju i neovisno od  $\beta$ -katenin/TCF4 kompleksa, putem transkripcijskog čimbenika FoxO, a koji regulira sintezu ARF, pozitivnog regulatora tumor supresora p53.<sup>lxi</sup> Aktivnost GSK3 $\beta$  kinaze moduliraju i drugi unutarstanični procesi osim Wnt signalizacije, između ostalih aktivacija akt kinaze, čime ovaj proces dobija dodatnu važnost u karcinogenezi. Hiperaktivacija Wnt/ $\beta$ -kateninskog sustava mutacijama bilo koje proteinske komponente aksin/APC/ GSK3 $\beta$ / $\beta$ -kateninskog kompleksa igra važnu ulogu u karcinogenezi gotovo svih vrsta tumora, no ne postoje čvrsti dokazi da mutacije

navedenog kompleksa igraju ulogu u nastanku raka dojke. Unatoč tome u stanicama raka dojke u gotovo 50% bolesnica nalazimo povećanu koncentraciju  $\beta$ -katenina, što se ogleda u povećanoj produkciji ciklina D1, jednog od njegovih ciljnih gena, te posljedičnoj lošijoj prognozi istih bolesnica.<sup>lxii, lxiii, lxiv</sup> Zanimljivo je da se mutacije aksin/APC/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -kateninskog kompleksa nalaze u 45% bolesnica s fibromatoznim promjenama dojke.<sup>lxv</sup>

Wnt/ $\beta$ -kateninski put je reguliran i intracelularnom komponentom epitelnih kadherina (E-kadherina), transmembranskih glikoproteina koji svojom ekstracelularnom domenom međustaničnim interakcijama stabiliziraju stanice u epitelnom tkivu.  $\beta$ -katenin naime služi kao prijemnica između E-kadherina i aktina.<sup>lxvi</sup> Mutacija ili oštećenje E-kadherina dovodi do razdvajanja stanica, povećanja njihove pokretljivosti i invazivnosti, te konačno oslobađanja  $\beta$ -katenina koji aktiviraju ekspresiju *c-myc*. Ekspresija E-kadherina je smanjena u bolesnica s rakom dojke.

*c-myc* je transkripcijski faktor koji se vezivanjem s proteinima iz Max i Mad obitelji veže za DNA i igra važnu ulogu u rastu i razmnožavanju stanica, progresiji staničnog ciklusa, stabilnosti genoma, diferencijaciji stanica i apoptozi.<sup>lxvii</sup> Prekomjerna ekspresija *c-myc* je jedna od najčešćih genetskih promjena u oboljelih od raka dojke, a javlja se u trećine bolesnica. Ona dovodi do pojačane proliferacije stanica i kromosomske nestabilnosti Myc-Max povezivanjem, ili pak diferencijacije stanica Myc-Mad povezivanjem. Amplifikacija *c-myc* gena je povezana s lošijom prognozom bolesti zbog pojačanja S faze staničnog ciklusa.

Integrini su adhezijske molekule koje stabiliziraju stanice interakcijom s ekstracelularnim matriksom. Integrini aktiviraju Fak-Src (eng. *focal adhesion kinase*) signalni put, što dovodi do aktivacije PI3K (eng. *phosphoinositide-3-kinase*) i akt kinaze. Akt1 kinaza igra ulogu u čitavom nizu unutarstaničnih procesa, s posljedičnim poboljšanjem preživljenja i proliferacije stanica aktivacijom nuklearnog transkripcijskog faktora NF $\kappa$ -B i inhibicijom proapoptotičkih Bad proteina iz Bcl-2 proteinske obitelji, te povećanja pokretljivosti stanica i promociji angiogeneze.<sup>lxviii</sup> Glavne komponente ovog puta, Fak, PI3K i akt kinaze inhibira PTEN fosfataza (eng. *phosphatase on chromosome 10 gene product, mutated in Cowden disease*), što dovodi do aktivacije apoptoze i supresije preživljenja stanica.

Druga mutacija uključena u kontrolu apoptoze je mutacija p53, nazočna u 20-40% bolesnica s rakom dojke. Većina mutacija p53 u raku dojke su točkaste mutacije, što dovodi do sinteze nefunkcionalnog p53 proteina s posljedičnim gomilanjem istog u tumorskim stanicama, a što se pak lako detektira imunohistokemijskim metodama. Protein p53 je transkripcijski čimbenik uključen u regulaciju nekoliko skupina gena uključenih u regulaciju kontrole staničnog ciklusa i apoptoze, poput proteina iz Bcl-2 porodice (Bad, Bax, PUMA, Noxa), receptora smrti (Fas, DR4, DR5), proteina koji reguliraju aktivnost kaspaza (PIDD), Cdk inhibitora p21, regulatora staničnog ciklusa (14-3-3 $\sigma$ , Gadd45), te E3 ligaza (Siah1, mdm2).<sup>lxxix,lxx,lxxi,lxxii</sup> Može pokrenuti unutarstanične puteve i u smislu opstanka stanice i u smislu apoptoze, a koji će procesi biti pokrenuti ovisi o fosforilaciji p53 proteina u različite produkte, a na nivou transkripcije o kofaktorima koji se uz njega vežu na regulacijske slijedove DNA nukleotida ovisno o promjenama uzrokovanim fosforilacijom. Poznati su aktivatori p53 kinaza ATM (eng. *ataxia teleangiectasia mutated*) u slučaju oštećenja DNA, zatim GSK-3 $\beta$ , p38 i JNK.<sup>lxxiii</sup> Protein p53 je otkriven prije više od 25 godina kao jedan od ključnih gena za nastanak karcinoma crijeva. U karcinogenezi raka dojke ključna je njegova uloga kao regulatora stabilnosti  $\beta$ -katenina, putem ciljnog gena Siah-1 (E3 ligaza koja ubikvitinira  $\beta$ -katenin za razgradnju).<sup>lxxiv</sup> Mutacija p53 dodatno pojačava procese homeostaze poremećene oštećenjem  $\beta$ -kateninskog sustava, a dovodi do inhibicije apoptoze kao reakcije na ireverzibilno oštećenje DNA, čime se omogućuje njezina replikacija i promocija nastanka tumora.<sup>lxxv</sup> Preko Siah-1 E3 ligaze p53 je povezan i sa staničnim odgovorom na hipoksiju, jer su supstrati navedene ligaze i prolilhidroksilaze koje pripremaju transkripcijski čimbenik HIF (eng. hypoxia inducible factor) za razgradnju putem ubikvitinsko-proteasomskog sustava<sup>lxxvi</sup>. Hipoksija tumorskih stanica je jedan od ključnih čimbenika pojačanja procesa rasta i razmnožavanja tumorskih stanica (sintezom epidermalnog, inzulinu sličnog i transformirajućeg čimbenika rasta EGF, IGF-2 i TGF- $\beta$  (eng. epidermal growth factor, insulin-like growth factor-2)), pojačanja procesa angiogeneze (sintezom vaskularnog endotelnog čimbenika rasta VEGF (eng. vascular endothelial growth factor)), promocije malignog fenotipa tumora metaboličkom adaptacijom na nepovoljne uvjete u staničnom mikrookolišu (pokretanjem anaerobnog metabolizma i glikolize), te konačno otpornosti

tumorske stanice na radioterapiju i kemoterapiju, a regulirana je transkripcijskim čimbenikom HIF.<sup>lxxvii,lxxviii</sup> Ovi se procesi dodatno pojačavaju oštećenjem funkcije p53.

Osim toga, i  $\beta$ -katenin direktno inhibira transkripcijski čimbenik NF- $\kappa$ B, čime se inhibira niz unutarstaničnih procesa uključenih u apoptozu.<sup>lxxix</sup>

Čini se da značajnu ulogu u razvoju mliječne žlijezde i u karcinogenezi tumora dojke imaju i proteini iz porodice inzulinu sličnog čimbenika rasta, odnosno IGF-1 i -2 (eng. *insulin-like growth factor 1 and 2*), te njihovi odgovarajući receptori IGFR-1 i -2. IGF-1 i IGF-2 vezivanjem za IGFR-1 aktivacijom akt kinaza promoviraju karcinogenezu, sinergistički estrogenima. U stanicama raka dojke pojačana je ekspresija IGF-1, IGF-2 i IGFR-1, no prediktivna uloga pojačanja njihove ekspresije govori u prilog bolje prognoze bolesti, najvjerojatnije zbog djelovanja povezanog s hormonskim učincima. IGFR-2 je supresor tumora, a njegova aktivacija inhibira djelovanje IGF-2. U novije vrijeme vršena su ispitivanja o ulozi klotho gena u karcinogenezi raka dojke. Naime, klotho je gen supresor starenja, a supresija IGF-1 glavni mu je mehanizam djelovanja. Na taj način djeluje supresivno na nastanak karcinoma dojke. Drugo djelovanje klotho gena je vezano uz aktivaciju FGF (eng. *fibroblast growth factor*) signalnog puta, koji inhibira razmnožavanje stanica karcinoma dojke. Učinak klotho gena na karcinogenezu preko signalnog puta epidermalnog čimbenika rasta nije dokazan.<sup>lxxx</sup>

Obitelj TGF- $\beta$  proteina sastoji se od 3 TGF- $\beta$  i dva neovisna serin-treonin kinazna receptora. Vezivanjem TGF- $\beta$  (eng. *transforming growth factor  $\beta$* ) za receptore T $\beta$ RI i T $\beta$ RII dolazi do pokretanja unutarstanične signalizacije koja aktivira R-Smad proteine (Smad 2, 3 i 4) koji su transkripcijski čimbenici, a koji na transkripcijskoj razini međudjeluju s  $\beta$ -katenin/TCF4 kompleksom.<sup>lxxxi</sup> Složenost TGF- $\beta$  signalizacije odražava se u činjenici da regulira ekspresiju oko 4000 različitih gena (što je oko 10% procijenjenog ljudskog genoma). U normalnim epitelnim stanicama mliječne žlijezde TGF- $\beta$  suprimira ekspresiju ciklina A (promotorskog proteina S faze), te u manjoj mjeri ciklina D i E uključenih u G1 fazu, a uz što inducira ekspresiju CDKI p15, što posljedično dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze. Ovaj mehanizam je važan u postlaktacijskoj redukciji žljezdanog tkiva. Ekspresija TGF- $\beta$  u raku dojke je pojačana, a čini se da bolje korelira s progresijom bolesti nego supresijom tumora. Mutacijama TGF- $\beta$  receptora (prvenstveno T $\beta$ RI i T $\beta$ RII) ili bilo koje Smad molekule (prvenstveno Smad4) dolazi do povećanja otpornosti stanica raka dojke na supresivne



učinke. Jednako tako uloga TGF $\beta$  sustava u promociji angiogeneze i invazivnosti te supresiji imunološkog sustava pogoduje tumorskim stanicama.

Mutacije BRCA1 (na kromosomu 17q21) i BRCA2 (na kromosomu 13q12-13) (eng. *breast cancer 1 and 2 gene*) su dokazani rizični čimbenik za nastanak raka dojke. Opisano je više od 500 mutacija BRCA1 gena, te oko 250 mutacija BRCA2 gena. Mutacije koje se javljaju na krajevima gena povezane su s agresivnijim tumorima, s time da su one koje se javljaju na 5' kraju povezane s tumorima dojke i jajnika, dok su one koje se javljaju bliže 3' kraju povezane samo s tumorima dojke. Većina BRCA1 tumora dojke imaju sličan histološki fenotip, visokog su staničnog gradusa, brzo proliferirajući, nemaju eksprimirane hormonske receptore kao niti HER2/neu receptore, a eksprimiraju bazalne histološke biljege poput keratina, P-kadherina i receptora epidermalnog čimbenika rasta. Često su im pridružene mutacije p53. BRCA2 tumori dojke su većinom hormonski ovisni, a imaju sniženu ekspresiju HER2/neu.<sup>lxxxii</sup> Biološka uloga BRCA1 i 2 gena nije dobro poznata, no čini se da imaju ulogu u reparatnim procesima DNA, kao i u regulaciji staničnog ciklusa. Oštećenje DNA dovodi do aktivacije BRCA1, BRCA2, RAD51 i p53 s posljedičnom ekspresijom p21 proteina, koji zaustavlja stanični ciklus do popravka DNA molekule.<sup>lxxxiii</sup>

### 1.5.1 Čimbenici rizika za nastanak raka dojke

Brojna epidemiološka istraživanja su izdvojila brojne okolišne rizične čimbenike za nastanak raka dojke, a kako je rak dojke posljedica niza genetskih oštećenja poput drugih vrsta karcinoma, uočeni su i genetski čimbenici rizika. Rane mutacije mogu biti naslijeđene (tj. mutacije matičnih stanica dojke) ili stečene (tj. somatske mutacije nastale ionizirajućim zračenjem, karcinogenim kemikalijama ili oksidativnim oštećenjima).

Smatra se kako je svega 5-10% karcinoma dojke nasljedno, no sukladno novijim istraživanjima provedenim na blizancima čini se da se nasljednim čimbenicima može pripisati čak do 27% karcinoma dojke. U oko 30-40% oboljelih identificirani su mutirani geni BRCA1 i BRCA2. Prevalencija BRCA1 u populaciji je oko 0,1%, a veća je u Ashkenazi židova (oko 20%). BRCA1 se nalazi u 3% bolesnica, dok se u žena s nasljednim oblikom raka dojke nastalim u ranijoj životnoj dobi nalazi i u 70% slučajeva. Rak dojke nastane tijekom života u oko 50-87% žena nositeljica mutiranog

BRCA1 gena. Mutacije BRCA2 su identificirane u 10-20% obitelji s visokim rizikom nastanka raka dojke i jajnika, te u samo 2,7% bolesnica u kojih rak dojke nastane u ranoj životnoj dobi. Mutacije BRCA2 povezane su i s rizikom nastanka drugih vrsta raka, poput raka prostate, gušterače, jajovoda, mokraćnog mjehura, non-Hodgkin limfoma i bazeocelularnog karcinoma kože. U bolesnice s Li-Fraumenijevim sindromom, kojem je glavno obilježje mutacija p53 gena, dolazi do nastanka čitavog niza tumora (sarkomi, tumori dojke, tumori mozga, leukemije, karcinom grkljana i pluća), a najčešće nastaju upravo tumori dojke (bilateralni u 25% slučajeva). Rak dojke je uočen i u 29% bolesnica s Cowdenovom bolešću, rijetkim genetskim sindromom povezanim s papilomatozom usana i sluznice usne šupljine, multiplim trihilemomima lica i akralnom keratozom. U ovih bolesnica češće se nalaze i benigne promjene dojke, poput fibroadenoma, fibrocističnih lezija, duktalne epitelne hiperplazije, deformiteta bradavice i sl. Brojni drugi rijetki genetski sindromi su povezani s većom učestalošću raka dojke, poput Peutz-Jeghersovog ili Muir-Torreovog sindroma.

Epidemiološki čimbenici, kao što su uznapredovala životna dob, mjesto rođenja u razvijenim zapadnim zemljama (prvenstveno Sjeverna Amerika i Europa), visoka premenopauzalna serumska koncentracija IGF-1, visoka postmenopauzalna serumska koncentracija estrogena, te pozitivna obiteljska anamneza u bliskih rođaka povećavaju rizik nastanka raka dojke za više od 4 puta. Dobar socioekonomski status, kasna prva trudnoća (iznad 30. godine života), prethodno dijagnosticiran rak dojke, pozitivna obiteljska anamneza u daljih rođaka, te prethodno dijagnosticirane benigne proliferativne lezije, mamografski uočljive displastične promjene ili visoka doza ionizirajućeg zračenja na područje prsnog koša povećavaju rizik nastanka raka dojke za 2-4 puta. Nuliparitet, rana menarhe (prije 11. godine života), kasna menopauza (nakon 55. godine života), postmenopauzalna pretilost, prehrana bogata visoko zasićenim masnim kiselinama, bijela rasa u osoba starijih od 45 godina, crna rasa u osoba mlađih od 45 godina, te karcinom endometrija ili jajnika u anamnezi povećavaju rizik nastanka raka dojke za 1,1-1,9 puta.

Poznati su i protektivni čimbenici, poput kasne menarhe (nakon 15. godine života), dojenja duljeg od godinu dana, prehrane bogata nezasićenim masnim kiselinama, tjelesne aktivnosti te pretilosti nazočne prije menopauze.

### 1.5.2 Uloga ženskih spolnih hormona u nastanku raka dojke

Gotovo svi navedeni čimbenici rizika za nastanak raka dojke povezani su s duljinom i intenzitetom izloženosti estrogenima tijekom života. Naime, estrogeni imaju promotivni učinak na proliferaciju žljezdanog epitela dojke, zbog čega češće nastaju greške u replikaciji DNA, a samim time povećava se i učestalost karcinogenih mutacija. Tako rana menarhe, uredni menstrualni ciklusi i kasna menopauza povećavaju ukupnu izloženost estrogenima tijekom života u premenopauzalnih žena, dok debljina i hormonska nadomjesna terapija povećavaju izloženost estrogenima u postmenopauzalnih žena. Nasuprot tome kasna menarhe, anovulatorni ciklusi i rana menopauza (spontana ili inducirana) imaju protektivnu ulogu, zahvaljujući skraćanju ili smanjenju intenziteta izloženosti estrogenima. Laktacija i debljina u premenopauzalnoj dobi povezane su s manjom izloženosti estrogenima zbog anovulatornih ciklusa. Iz nepoznatih razloga trudnoća smanjuje podložnost tkiva dojke somatskim mutacijama i time smanjuje rizik nastanka raka dojke, te tako prva trudnoća u ranijoj životnoj dobi igra protektivnu ulogu.

Estrogeni i progesteroni induciraju ekspresiju ciklina D1 i *c-myc*, čime se tumači njihova uloga u regulaciji staničnog ciklusa i poticanju rasta i razmnožavanja tumorskih stanica.<sup>lxxxiv</sup> Stanice karcinoma dojke s izraženim estrogenskim receptorima (ER) podliježu apoptozi u odsutnosti estrogena, tako da estrogen osim kao mitogen vjerojatno djeluje i kao promotor preživljenja stanica raka. Pojačana ekspresija važnog antiapoptotičkog faktora Bad/Bcl-2 važan je događaj u karcinogenezi hormonski ovisnog karcinoma dojke, a regulirana je pojačanom ekspresijom ER i PgR (progesteronskih receptora). Naime, istovremena pojačana ekspresija Bcl-2 i ER i PgR je nazočna u preko 80% slučajeva invazivnih i neinvazivnih oblika tumora dojke.<sup>lxxxv</sup>

Jedna trećina primarnih tumora dojke nema izražene ER, kao niti trećina recidiva inicijalno ER-pozitivnih tumora. Međutim, u ovim tumorima gen za ER je u pravilu u cijelosti očuvan, bez dokazanih delecija ili mutacija. Novija istraživanja ukazuju da se utišavanje ekspresije gena za ER (a jednako tako i za HER2/neu) odvija najvjerojatnije hipermetilacijom CpG otočića u njegovim regulacijskim sklopovima, a demetilacija agensima poput 5-azacitidina, 5-aza-2-deoksicitidina, prokainamida i hidralazina obnavlja njegovu funkciju, čime se potencijalno otvara novi terapijski pravac u liječenju raka dojke kombiniranjem navedenih agensa s hormonskom terapijom.<sup>lxxxvi</sup>

Progesteronski receptor (PgR) nalazimo u oko 50% svih ER-pozitivnih tumora dojke. Njegova nazočnost ovisi o ekspresiji funkcionalnog ER, što objašnjava njegovu odsutnost u gotovo svih ER-negativnih tumora. PgR su transkripcijski faktori čija je aktivnost isprepletena s drugim unutarstaničnim signalnim putevima koji imaju važnu ulogu u hormonski reguliranom poticanju rasta tkiva, poput tkiva mliječne žlijezde. Mitogeni učinak progesterona u karcinogenezi tumora dojke potječe najvjerojatnije od njegovog učinka na pojačanje lokalne proizvodnje hormona rasta u tkivu dojke, no visoke koncentracije progesterona imaju protektivni učinak zbog smanjenja aktivnosti CDK kinaza G1 faze staničnog ciklusa i ciklina D1, te posljedičnog pojačanja diferencijacije stanica i inhibicije rasta.<sup>lxxxvii</sup>

### 1.5.3 Uloga epidermalnog čimbenika rasta u nastanku raka dojke

Porodica receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGF, eng. *epidermal growth factor*) ima kritičnu ulogu u karcinogenezi raka dojke. Do sada su identificirana četiri EGF receptora, i to EGFR (HER1), c-erb-B2 (ili HER2/neu), c-erb-B3 i c-erb-B4 za koje se vežu brojni parakrini ligandi koji se luče nakon oštećenju tkiva, poput EGF, transformirajućeg čimbenika rasta  $\alpha$  (TGFA, eng. *transforming growth factor alpha*), hegulina (ili Neu diferencijacijskog čimbenika), heparin-vežućeg EGF-sličnog čimbenika rasta, beta-celulina i epiregulina.<sup>lxxxviii,lxxxix,xc</sup> Vezivanjem liganda za odgovarajući receptor dolazi do homodimerizacije ili heterodimerizacije receptora, što dovodi do autofosforilacije intracelularne domene receptora i aktivacije kinazne aktivnosti. Fosforilacijom adaptornih proteina (GRB2-SOS, Shc, IRS-1/2, STAT) dolazi do aktivacije RAS-GTP proteina, a potom odgovarajućih unutarstaničnih signalnih puteva za započinjanje transkripcije odgovarajućih gena (Raf/MEK/ERK-1/2, MEKK1/MEK4/7/JNK, ili PI3K/akt/GSK). Transmisija signala preko RAS-GTP moguća je i preko Fak/Src ili Rho/Rac/CDC42 signalnog puta. Osim toga, fosforilacija c-erb-B2 direktno aktivira fosfolipazu C, no posljedični signalni put do sada nije razjašnjen. Aktivacijom navedenih signalnih puteva dolazi do indukcije transkripcijskih faktora Myc, NF- $\kappa$ B, ATF, Ets, AP-1, EIK i SRF, što dovodi do pokretanja staničnog ciklusa i inhibicije CDKI i proapoptotičkih signala. Kada se biološka poruka prenese i provede, ligand-receptor kompleks se internalizira i razgrađuje u lizosomima. Uzorak

heterodimerizacije, unutarstanični signalni put i brzina internalizacije i razgradnje receptora ovise o ligandu koji je vezan za receptor.

HER2/neu nema specifičan ligand, već je njegova biološka uloga najvjerojatnije modulacija signala rasta i razmnožavanja prenešena putem EGF/EGFR.<sup>xci</sup> Naime, stanicama koje imaju nisku ili oštećenu ekspresiju HER2/neu je potrebna jaka aktivacija HER1 receptora kako bi se aktivirali unutarstanični signalni putevi promocije rasta i razmnožavanja. Za to je potrebna velika količina parakrinih EGFR liganda, a koji se u dovoljnoj količini luče samo u slučaju oštećenja tkiva. Dimerizacija HER1/HER2 receptora na površini stanica ima puno jaču signalnu aktivnost, što stanice čini puno osjetljivijima na stimulaciju rasta aktiviranu EGF-om i drugim ligandima. Tako su stanice koje imaju oštećen c-erb-B2 otporne na tumorigeni učinak EGF, dok su stanice koje imaju oštećenu bilo ekstracelularnu bilo intracelularnu domenu EGFR ali imaju očuvan c-erb-B2 sposobne izvršiti sve signalne poruke prenešene EGF-om. Na površini stanica koje ih prekomjerno ekspimiraju se može dogoditi i spontana HER2/HER2 homodimerizacija i bez vezivanja specifičnih liganda, a takvi dimeri imaju snažnu signalnu aktivnost i omogućavaju autonomnu bazalnu stimulaciju rasta.<sup>xcii</sup>

U posljednjih 20 godina provedena su brojna istraživanja o ulozi HER2/neu u karcinogenezi tumora dojke. Pojačana ekspresija HER2/neu nalazi se u oko 25-30% karcinoma dojke.<sup>xciii</sup> Stanice koje imaju pojačanu ekspresiju HER2/neu mogu na svojoj površini imati i do dva milijuna kopija receptora u usporedbi s 20000-50000 kopija na normalnim epitelnim stanicama, što dovodi do snažnog pojačanja unutarstaničnog signaliziranja i malignog rasta. Unatoč konstantnim kontroverzama glede biologije, prognostičke važnosti i metodama korištenim za određivanje HER2/neu, općenito je prihvaćeno da je pojačana ekspresija HER2/neu povezana s višim histološkim gradusom tumora, izostankom ekspresije hormonskih receptora, aneuploidijom, visokim proliferacijskim indeksom, veličinom tumora te, posljedično, lošim kliničkim ishodom zbog povećane agresivnosti, potencijala diseminacije i otpornosti na liječenje.

Prognostička uloga c-erb-B2 za odgovor na kemoterapiju ili hormonsku terapiju nije jasno definirana. Naime, prema nekim kliničkim istraživanjima u HER2/neu pozitivnih bolesnica ne samo da izostaje odgovor na hormonsku terapiju, već tako liječene bolesnice imaju lošiju prognozu. Retrospektivne studije ukazuju na bolje ukupno preživljenje i preživljenje bez progresije bolesti u HER2/neu pozitivnih bolesnica

liječenih kemoterapijom na bazi antraciklina u usporedbi s HER2/neu negativnim bolesnicama. Jednako tako, kemoterapija na bazi taksana ima bolji učinak u HER2/neu pozitivnih nego u negativnih bolesnica (relativni rizik 65% vs. 35%). Učinkovitost kemoterapije na bazi ciklofosfamida, metotreksata i 5-fluorouracila (CMF) u ovisnosti o HER2/neu ekspresiji ne može se jasno procijeniti na osnovu dostupnih podataka.

#### 1.5.4 Klinički značaj HER2/ECD

HER2/neu receptor je transmembranski protein veličine 185 kDA. Sastoji se iz tri dijela, unutastanične tirozin kinaze koja igra ulogu u aktivaciji unutarstaničnih signalnih puteva za pokretanje rasta i razmnožavanja stanica, malog transmembranskog dijela te vanjske domene (HER2/ECD, eng. *extracellular domain*) veličine 105 kDA koja služi za vezivanje epidermalnog čimbenika rasta.<sup>xciv,xcv,xcvi,xcvii</sup> Normalno ga nalazimo na površini epitelnih stanica pluća, mokraćnog mjehura, gušterače, dojke i prostate.<sup>xcviii,xcix,c</sup> Metaloproteaze odcjepljuju HER2/ECD s površine tumorskih stanica, te se može detektirati u serumu bolesnica s primarnim ili metastatskim karcinomom dojke pomoću specifičnih antitijela.<sup>ci,cii,ciii,civ</sup>

Kvantifikacija prekomjerne ekspresije HER-2/neu može se učiniti imunohistokemijskim metodama (IHC) ili direktnim ispitivanjem amplifikacije DNA FISH metodom (eng. *fluorescence in situ hybridization*) iz histoloških uzoraka tumorskog tkiva, ili pak određivanjem serumske koncentracije HER2/ECD. IHC je subjektivna, ovisna o osobi koja očitava nalaz, dok je FISH objektivna, ali i tehnički složenija metoda. Trenutno je jedini kit za određivanje serumske koncentracije HER2/ECD razvijen u farmaceutskoj tvrtci Bayer (ADVIA Centaur, Bayer Diagnostic, Tarrytown, NY) validiran i odobren od strane FDA, od nekoliko predloženih.<sup>cv</sup> Obzirom na neprikladnost histoloških uzoraka za praćenje HER-2/neu ekspresije tijekom liječenja, određivanje serumske koncentracije HER2/ECD je i manje invazivno od IHC i FISH metoda, i pruža više informacija u smislu procjene dinamike i evolucije maligne bolesti tijekom kemoterapijskog liječenja, što je dokazano u bolesnica s metastatskom bolešću.<sup>cvi,cvii,cviii</sup> Ideja određivanja HER2/ECD i ispitivanja njegove korisnosti u kvantifikaciji ekspresije HER-2/neu u bolesnica s rakom dojke potječe prvenstveno od potrebe za predviđanjem

patohistološkog odgovora na kemoterapiju i terapiju trastuzumabom tijekom neoadjuvantnog liječenja, obzirom da je histološki odgovor važan prognostički čimbenik preživljenja navedenih bolesnica.<sup>cix,cx,cxi</sup>

Brojna su klinička istraživanja dokazala prognostičku ulogu HER2/ECD i za ukupno preživljenje (OS, eng. *overall survival*) i za interval bez znakova bolesti (DFS, eng. *disease-free survival*), dok je u bolesnica s metastatskom bolešću važan prognostički čimbenik odgovora na terapiju. Naime, Mehta i sur. su još 1998. godine retrospektivnim istraživanjem otkrili da je povišena koncentracija HER2/ECD u serumu prije početka adjuvantnog kemoterapijskog liječenja u 79 bolesnica s rakom dojke II i III stadija bila značajan prognostički čimbenik kraćeg DFS.<sup>cxii</sup> Na kraće DFS ukazivala je i povišena serumska koncentracija HER2/ECD nakon kemoterapije, a jedini bolji prognostički čimbenik bio je broj zahvaćenih limfnih čvorova. Saghatchian i sur. su 3 godine kasnije u retrospektivnom istraživanju na 700 bolesnica otkrili prognostičku važnost povišene serumске koncentracije HER2/ECD za kraće DFS i u bolesnica s lokaliziranim karcinomom dojke, sukladno rezultatima Mehte i sur.<sup>cxiii</sup> Ukazali su i na pozitivnu korelaciju serumске koncentracije HER2/ECD s veličinom tumora, zahvaćenošću pazušnih limfnih čvorova i većim histološkim gradusom. Sukladno rezultatima Hayesa i sur., povišena serumska koncentracija HER2/ECD ukazuje na lošije OS u bolesnica s metastatskom bolešću ukoliko se liječe hormonskom terapijom, no nema značajniju prognostičku važnost u bolesnica liječenih kemoterapijom.<sup>cxiv</sup>

Određivanje serumске koncentracije HER2/ECD svakih 6 mjeseci nakon inicijalnog liječenja karcinoma dojke dobra je metoda za procjenu trenutka povrata bolesti, osobito u inicijalno HER2 pozitivnih bolesnica. Naime, Isola i sur. su zabilježili porast serumске koncentracije HER2/ECD bar 6 mjeseci prije kliničke detekcije udaljenih metastaza u 37% praćenih bolesnica.<sup>cxv</sup> U istraživanju Moline i sur. tijekom prve 4 godine praćenja došlo je do povrata bolesti u 38% bolesnica, a porast serumске koncentracije HER2/ECD, CA 15-3 ili CEA zabilježen je u 69,5% svih bolesnica.<sup>cxvi,cxvii</sup> Porast HER2/ECD bio je prvi znak povrata bolesti u 28,3% bolesnica, odnosno u 83,3% bolesnica s inicijalno HER2/neu pozitivnim tumorima.

U bolesnica s metastatskom bolešću serumska koncentracija HER2/ECD je važna za procjenu odgovora na terapiju. Colomer i sur. su prvi 2000. godine ukazali da je povišena koncentracija HER2/ECD na početku liječenja statistički značajno povezana s

rjeđim kompletnim odgovorom (0 vs. 26%,  $p < 0,021$ ) i ukupnim trajanjem odgovora (7,5 vs. 11 mjeseci,  $p = 0,035$ ) na kemoterapiju paklitakselom i doksorubicinom.<sup>cxviii</sup> Slične rezultate dobili su Luftner i sur., kao i Harris i sur., s time da u potonjem istraživanju nije dokazana korelacija HER ekspresije i OS ukoliko se HER status određivao imunohistokemijski ili fluorescentnom in-situ hibridizacijom.<sup>cxix,cxx</sup> Lipton i sur. ukazali su da bolesnice s HER2/neu, ER i PgR pozitivnim tumorima, a koje se liječe megastrol acetatom ili inhibitorom aromataze, imaju slabiji odgovor na terapiju (kompletni odgovor + djelomični odgovor + stabilna bolest 23 vs. 45%), kraće trajanje odgovora na terapiju (11,7 vs. 17,4 mjeseca) i vrijeme do progresije bolesti (90 vs. 180 dana) ukoliko su u početku liječenja imale povišenu serumsku koncentraciju HER2/ECD.<sup>cxxi</sup> U istom ispitivanju uočeno je da bolesnice s inicijalno povišenom koncentracijom HER2/ECD imaju nešto bolji odgovor na terapiju ukoliko se liječe inhibitorom aromataze.

Niz kliničkih istraživanja ukazuje na korelaciju serumske koncentracije HER2/ECD i progresije odnosno regresije metastatskog karcinoma dojke, te se kontinuirano određivanje HER2/ECD može koristiti i za procjenu odgovora tumora na liječenje. Serijskim praćenjem HER2/ECD u HER2/neu pozitivnih bolesnica na taj način možemo umanjiti i toksičnost kemoterapije, koristeći trastuzumab kao terapiju održavanja tijekom remisije bolesti, a kombinirajući ga s kemoterapijom samo u intervalima progresije bolesti. Naime, Cook i sur. su ukazali na vrlo dobru korelaciju serijskog određivanja HER2/ECD i kliničkog tijeka bolesti u 86,8% bolesnica, dok su Esteva i sur. su ukazali na pad serumske koncentracije HER2/ECD u 87% bolesnica liječenih trastuzumabom i paklitakselom u tjednom režimu, a u kojih je dokazan klinički i radiološki odgovor na terapiju.<sup>cxxii,cxxiii</sup> U potonjem istraživanju su u 75% bolesnica vrijednosti HER2/ECD pale „na normalu“ (tj. ispod 15 ng/mL).

U jednom kliničkom ispitivanju ispostavilo se da početna serumska koncentracija HER2/ECD nema prognostičku važnost niti u bolesnica s lokalnim niti s uznapredovalim tumorima dojke, no i u tom je istraživanju kinetika koncentracije HER2/ECD u bolesnica s lokalno uznapredovalim HER-2 pozitivnim tumorima bila povezana s dobrim patohistološkim odgovorom na neoadjuvantnu kemoterapiju antraciklinima ili taksanima uz trastuzumab.<sup>cxxiv</sup>



Pretpostavlja se da HER2/neu ekspresija nije homogena u čitavom tumoru zbog poliklonalnosti, tako da HER2/ECD odražava trenutnu ekspresiju HER2/neu statusa tumora, dok ugljikohidratni antigeni poput CA 15-3 ili CA 27.29 odražavaju ukupnu tumorsku masu, što potvrđuje i različita kinetika HER2/ECD i CA antigena za vrijeme liječenja. U gotovo svih bolesnica liječenih trastuzumabom pad serumske koncentracije HER2/ECD odmah po započinjanju liječenja govori za 90%-tnu vjerojatnost kompletnog ili djelomičnog odgovora na terapiju. Ukoliko koncentracija HER2/ECD ne padne za više od 35% tijekom prva 4 tjedna liječenja, tumor najvjerojatnije ne odgovara na terapiju, te je potrebna rana reevaluacija statusa bolesti.<sup>cxxv</sup> Naime, u oko 20% bolesnica s metastatskim povratom bolesti uočava se promjena HER2/neu statusa, najvjerojatnije kao posljedica klonalne selekcije primijenjenom terapijom.<sup>cxxvi</sup> Uzmemo li u obzir da su HER2/neu klonovi otporniji na liječenje logičan je i rezultat istraživanja Brauna i sur. koji ukazuje na veću učestalost HER2/neu pozitivnosti u metastazama recidiva nego u primarnim tumorima (50-68% vs. 20-30%).<sup>cxxvii</sup>

#### 1.5.5 Liječenje raka dojke

Bolesnice s rakom dojke liječe se lokalnom (kirurgija, radioterapija) i sistemskom terapijom (kemoterapija, imunoterapija, hormonska terapija, bioterapija), s ciljem produžavanja života i poboljšanja kvalitete života u bolesnica s uznapredovalom bolešću, te s ciljem smanjenja rizika povrata bolesti u bolesnica s lokalnom ili lokalno uznapredovalom bolešću. Izbor modaliteta liječenja, njihovih kombinacija i slijeda treba biti individualan, a ovisi prvenstveno o kliničkom stadiju bolesti, prethodnom liječenju, osobinama tumora, životnoj dobi bolesnice i komorbiditetima.<sup>cxxviii</sup>

U bolesnica s lokaliziranom bolešću liječenje najčešće započinje kirurškim zahvatom. Niz je kliničkih studija u bolesnica s bolešću stadija I i II pokazao da se radikalnom mastektomijom s disekcijom pazušnih limfnih čvorova postižu isti rezultati kao i s pošteđnim kirurškim zahvatom uz odstranjenje pazušnih limfnih čvorova i adjuvantnu radioterapiju dojke.<sup>cxxix,cxxx</sup> Apolutne kontraindikacije za pošteđni kirurški zahvat su prethodno provedena radioterapija dojke ili torakalne stijenke, trudnoća, difuzni mikrokalcifikati malignog izgleda na mamografiji, te nemogućnost potpunog odstranjenja tumora, a relativne kontraindikacije su aktivna bolest vezivnog tkiva (sistemska skleroderma, sistemski eritematodni lupus) i tumori veći od 5 cm.<sup>cxxxi</sup> Kod

bolesnica s kliničkim stadijem I i II pri disekciji aksile potrebno je odstraniti najmanje 10 limfnih čvorova prve i druge razine, a u slučaju ekstenzivne zahvaćenosti istih potrebno je zahvat proširiti i odstraniti limfne čvorove treće razine. U bolesnica s minimalnom bolešću (T1N0) jednako je učinkovita i biopsija prvog drenažnog limfnog čvora (eng. sentinel biopsy) uz disekciju aksile u slučaju zahvaćenosti istog čvora tumorom.<sup>cxxxii</sup> Nakon poštednog kirurškog zahvata u gotovo svih bolesnica provodi se radioterapija dojke, a ovisno o stadiju bolesti i limfne drenaže. Sukladno recentnim studijama pokazalo se da izostanak adjuvantne radioterapije ne kompromitira uspješnost liječenja bolesnica starijih od 70 godina s hormonski ovisnim tumorom kliničkog stadija I.<sup>cxxxiii</sup> Nakon mastektomije, adjuvantna radioterapija torakalne stijenke i limfne drenaže se provodi u bolesnica s 4 ili više pozitivnih pazušnih limfnih čvorova, s tumorom T3 ili T4 bez obzira na zahvaćenost limfnih čvorova, te s 1-3 pozitivna pazušna limfna čvora u slučaju nazočnosti drugih loših prognostičkih čimbenika.<sup>cxxxiv</sup> Adjuvantna kemoterapija se daje bolesnicama s pozitivnim limfnim čvorovima, HER2 pozitivnim tumorima, tumorima negativnim na HER2, ER i PR (eng. tripple negative) i u bolesnica s hormonski ovisnim HER2 negativnim tumorima u slučaju prisutnosti drugih loših prognostičkih čimbenika.<sup>cxxxv</sup> Kada je potrebno adjuvantno primijeniti i kemoterapiju i radioterapiju, slijed ordiniranja je sekvencijski, a liječenje se započinje kemoterapijom. Naime, niz kliničkih studija provedenih još od 1989. godine pokazao je da je upravo ovaj slijed liječenja optimalan: poznato je kako kemoterapija ima učinak na smanjenje učestalosti i lokalnog i metastatskog recidiva kao i primjena radioterapije unutar 16 tjedana od operativnog zahvata, no istodobna je primjena limitirana (kardio)toksičnošću.<sup>cxxxvi,cxxxvii,cxxxviii</sup> Meta-analiza adjuvantne kemoterapije u liječenju raka dojke objavljena 2005. godine (protokoli nisu uključivali taksane) ukazala je na godišnje smanjenje rizika smrti od raka dojke za 38% u bolesnica dobi manje od 50 godina, odnosno za 20% u bolesnica dobi 50-69 godina, ukoliko su liječene adjuvantnom kemoterapijom na bazi antraciklina (protokoli AC, FAC, FEC).<sup>cxxxix</sup> Dodatno poboljšanje preživljenja bez povrata bolesti, a sukladno nekim studijama i ukupnog preživljenja, može se postići primjenom kemoterapije na bazi antraciklina i taksana, od kojih se najučinkovitijom pokazala tjedna primjena paklitaksela.<sup>cxl,cxli,cxlii</sup> Pri odabiru optimalnog kemoterapijskog protokola osim učinkovitosti treba imati na umu i toksičnost te komorbiditete bolesnice. Stoga nije rijetkost primjena protokola bez

antraciklina i taksana, primjerice u starijih bolesnica s kardijalnim komorbiditetom (npr. CMF).

Adjuvantna primjena trastuzumaba tijekom godinu dana treba se provesti u bolesnica s HER2 pozitivnim tumorima. Može se ordinirati konkomitantno s kemoterapijom (osim antraciklina), radioterapijom ili hormonskom terapijom.<sup>cxliiii,cxliiv</sup>

U velike većine bolesnica s hormonski pozitivnim tumorima potrebno je provesti adjuvantnu hormonsku terapiju, neovisno o dobi, menopauzi ili HER2 statusu. Mogući izuzetak su bolesnice s T1N0 tumorima veličine do 10 mm, koje uz ostale povoljne prognostičke čimbenike imaju odličnu prognozu i bez hormonske terapije. Menopauza utječe na izbor hormonske terapije: premenopauzalnim bolesnicama ordinira se tamoksifen tijekom 5 godina, bilo u monoterapiji ili uz supresiju funkcije jajnika (ovariektomija, radioterapijska kastracija ili supresija LHRH agonistima), dok se postmenopauzalnim ordinira inhibitore aromataze tijekom 5 godina ili sekvencijalno tamoksifen tijekom 2-3 godine a potom inhibitor aromataze do ukupno 5 godina liječenja.

U bolesnica s lokalno uznapredovalom bolešću kliničkog stadija III provodi se neoadjuvantno kemoterapija na bazi antraciklina ili taksana, nakon čega se (ukoliko je moguće) učini operativni zahvat.

Unatoč napretku u adjuvantnom liječenju lokaliziranog raka dojke, još uvijek oko 20-30% bolesnica dobije metastatski recidiv bolesti.<sup>cxlv</sup> Po definiciji bolest je u ovom stadiju neizlječiva, s medijanom preživljenja od 12-30 mjeseci i petogodišnjim preživljenjem od 15-30%.<sup>cxlvi,cxlvii</sup> Samim time u prvi plan liječenja dolaze, uz produljenje života, poboljšanje kvalitete života i smanjenje toksičnosti liječenja. Na raspolaganju su nam svi prethodno spomenuti terapijski modaliteti.

Za bolesnice s hormonski ovisnim tumorima razumno je liječenje započeti hormonskom terapijom, a tek u slučaju njezine neučinkovitosti, pojave rezistencije, značajne proširenosti bolesti ili vitalne ugroženosti u početku liječenja isprva ordinirati kemoterapiju.

Unatoč provedenim brojnim studijama ne postoji definiran optimalan kemoterapijski protokol za prvu liniju liječenja metastatskog raka dojke. Nije definirano niti optimalno trajanje prve linije kemoterapije, obzirom da ne postoje čvrsti dokazi za bolje preživljenje bolesnica protrahirano liječenih prvom linijom kemoterapije u nazočnosti

dobrog odgovora.<sup>cxlviii,cxlix</sup> Cochrane analiza objavljena 2009. godine ukazala je na prednost polikemoterapije na bazi antraciklina u odnosu na monokemoterapiju, no u drugim studijama dobiveni su kontradiktorni rezultati.<sup>cl</sup> Uzevši u obzir da je u današnje vrijeme većina bolesnica s metastatskim recidivom kemoterapiju na bazi antraciklina primila adjuvantno, nameće se monokemoterapija taksanima kao optimalan izbor prve linije liječenja, uz napomenu da se kemoterapija na bazi antraciklina može pokušati ponovno ordinirati u prvoj liniji ako je prošlo više od 12 mjeseci od adjuvantnog liječenja imavši u vidu maksimalnu dopuštenu kumulativnu dozu antraciklina.<sup>cli,clii</sup> U bolesnica koje su adjuvantno primale i antracikline i taksane, na raspolaganju imamo nekoliko citostatika sa značajnim kliničkim učinkom: kapecitabin, vinorelbin, gemcitabin, cisplatinu, mitomicin i mitoksantron.<sup>cliii,cliv,clv,clvi,clvii,clviii,clix</sup>

U bolesnica s HER2 pozitivnim tumorima potrebno je liječenje trastuzumabom ili lapatinibom obzirom da se dodatkom anti-HER2 terapije uz kemoterapiju postiže značajno bolji odgovor na liječenje, no nije definirano optimalno trajanje liječenja.<sup>clx</sup> Postoje čak studije koje su ukazale da postoji korist od nastavka liječenja trastuzumabom unatoč progresiji bolesti.<sup>clxi</sup>

Posljednjih godina pojavljuje se čitav niz lijekova koji otvaraju nove terapijske opcije u liječenju metastatskog raka dojke, poput angiostatika (bevacizumab), novih citostatika (eribulin, iksabepilon), poli ADP riboza polimeraza (PARP) inhibitora, no koji su još uvijek u tijeku kliničkih ispitivanja.

## **2. HIPOTEZA**

Osnovna hipoteza istraživanja je da je serumska koncentracija HER2/ECD u bolesnica s ranim rakom dojke veća od koncentracije HER2/ECD u zdravih žena. Sukladno našoj procjeni navedena koncentracija u bolesnica bi trebala biti manja i od koncentracije u bolesnica s metastatskim rakom dojke.

Potvrda hipoteze bila bi nedvojben znanstveni doprinos s obzirom da u svijetu do sada nije provedeno slično istraživanje te da bi pozitivan rezultat mogao imati dodatnu važnu ulogu u planiranju liječenja bolesnica s ranim rakom dojke, a koje imaju visoku stopu izlječenja.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje učestalosti povišene serumske koncentracije vanstanične domene HER2 receptora u bolesnica s ranim rakom dojke kliničkog stadija I i II, a specifični ciljevi istraživanja su bili ispitivanje učestalosti ekspresije HER2/neu receptora u tkivu tumora i komparacija sa serumskom HER2 pozitivnošću, usporedba povišene serumske koncentracije HER2/ECD s poznatim čimbenicima rizika, te određivanje utjecaja povišene koncentracije HER2/ECD na preživljenje do progresije bolesti kao surogat ukupnog preživljenja u adjuvantno liječenih bolesnica s ranim rakom dojke.

Sukladno našoj procjeni u Klinici se kontrolira oko 25–30% svih bolesnica s tumorima dojke u Hrvatskoj, što nam ekstrapolacijom dobivenih rezultata omogućava vjerodostojnu procjenu histoloških osobina karcinoma dojke i bioloških promjena tumora tijekom liječenja te njihovog značaja za prognozu bolesti i učinkovitost liječenja u bolesničkoj populaciji u Hrvatskoj. Dobiveni podaci daju uvid u učestalost HER2/neu pozitivnih tumora, učinkovitost liječenja karcinoma dojke i prognostički značaj HER2/neu i HER2/ECD u Hrvatskoj, a isti će se podaci moći dalje koristiti u boljem planiranju optimalnog liječenja bolesnica te procjeni i racionalizaciji zdravstvenih troškova.

## **4. BOLESNICI I METODE**

### **4.1 Bolesnice i kontrolna skupina**

U prospektivno opservacijsko istraživanje je uključeno 66 bolesnica starijih od 18 godina, s lokaliziranim citološki ili histološki dokazanim karcinomom dojke, koje su liječene u polikliničkoj i stacionarnoj službi Klinike za onkologiju od veljače 2009. do veljače 2010. godine., a uz odobrenje etičkog povjerenstva KBC Zagreb i etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz vlastitu pisanu suglasnost. 41 bolesnica imala je tumor kliničkog stadija I ili II, te su samim time bile kandidati za poštedno kirurško liječenje. Uzorci navedenih bolesnica korišteni su za daljnje analize, pri čemu je osigurana adekvatna statistička snaga istraživanja. Medijan praćenja bolesnica bio je 22,8 mjeseci, a s dvije bolesnice je izgubljen kontakt tijekom praćenja. U 66% uključenih bolesnica (27/41) uočena je T1N0 bolest, a 34% (14/41) imalo je tumore svrstane kao T1N1. Raspon dobi bolesnica bio je 35 do 82 godine života, a prosječna dob bila im je 60 godina.

U kontrolnu skupinu uključene su 52 zdrave žene, s negativnom obiteljskom anamnezom za tumore dojke, a koje su starije od 18 godina, sličnih demografskih osobina kao ispitivana skupina, te u kojih je isključena nazočnost fibrocističnih proliferativnih bolesti dojke na redovitom jednogodišnjem kliničkom kontrolnom pregledu (mamografski u bolesnica starijih od 40 godina i ehosonografijom dojke u mlađih, a prema potrebi i citološkom punkcijom u dvojbenim slučajevima) u ambulanti za bolesti dojke Klinike za onkologiju KBC Zagreb od veljače 2009. do veljače 2010. godine. Kontrolna skupina nije bila nužna za određivanje prevalencije i prognostičke

važnosti serumske koncentracije HER2/ECD u bolesnica s novootkrivenim karcinomom dojke, ali smo je definirali zbog samokontrole reprezentativnosti vlastitih rezultata, procjene dijagnostičke vrijednosti testa te pojačanja negativne prediktivne vrijednosti testa.

Obilježja bolesnica prikazana su u tablici 3.



**Tablica 3. Obilježja bolesnica**

|                     |              | <b>Broj</b> | <b>%</b> |
|---------------------|--------------|-------------|----------|
| Dob                 | medijan      | 61          |          |
|                     | raspon       | 36-83       |          |
| PHD                 | CDI          | 32          | 78,05    |
|                     | CLI          | 5           | 12,19    |
|                     | Ca medullare | 1           | 2,44     |
|                     | Ca papillare | 1           | 2,44     |
|                     | DCIS         | 2           | 4,87     |
| TNM                 | T1           | 21          | 51,22    |
|                     | T2           | 20          | 48,78    |
|                     | N0           | 26          | 63,42    |
|                     | N1           | 15          | 36,59    |
| ER/PR               | ER+/PR+      | 21          | 51,22    |
|                     | ER+/PR-      | 4           | 9,76     |
|                     | ER-/PR+      | 0           | 0        |
|                     | ER-/PR-      | 16          | 39,02    |
| HER2/neu            |              | 5           | 12,2     |
| Ki67                |              | 26          | 63,42    |
| Adjuvantna terapija | antraciklini | 22          | 53,66    |
|                     | taksani      | 3           | 7,32     |
|                     | hormonska    | 28          | 68,29    |
|                     | trastuzumab  | 5           | 12,2     |
|                     | samo RT      | 4           | 9,76     |

Bolesnice su liječene u našoj ustanovi pošteditim ili radikalnim kirurškim zahvatom, standardnim kemoterapijskim protokolima, hormonskom terapijom i imunoterapijom trastuzumabom, sukladno indikacijama.

Inicijalno su prikupljeni podaci o dobi, menopauzalnom statusu, stadiju bolesti i vrsti kirurškog zahvata. Za sve bolesnice je određena histološka vrsta i gradus tumora, Ki67, status ER i PgR (komercijalnim dijagnostičkim testovima), serumska koncentracija CA15-3 (ECLIA metodom – Modular Roche, Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie E.V.), zatim tkivna ekspresija HER2/neu (imunohistokemijski HercepTest kit protokolom – Dako Ltd., Denmark House, Angel Drove, Ely, Cambridgeshire, CB7 4ET, Velika Britanija, ili u graničnim slučajevima fluorescentnom *in situ* hibridizacijom

– Abbot-Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe kit, Abbot Laboratories, Abbot Park, IL) te serumska koncentracija HER2/ECD (ELISA metodom tvrtke Bayer – Human Neu Oncoprotein ELISA, Oncogene Science/Bayer Diagnostics, Cambridge, MA; patent u vlasništvu Siemens diagnostics te odobren od strane FDA).

## **4.2 Prikupljanje uzoraka tumorskog tkiva i određivanje ekspresije HER2/neu**

Uzorci tumorskog tkiva prikupljeni su u svih operiranih bolesnica. Tkivna ekspresija HER2/neu određena je imunohistokemijski HercepTest kit protokolom (Dako Ltd., Denmark House, Angel Drove, Ely, Cambridgeshire, CB7 4ET, Velika Britanija) na parafinskim blokovima tumorskog tkiva fiksiranim formalinom, a semikvantificirana je kao 0 (ukoliko se stanice ne bojaju ili se boja manje od 10% pregledanih stanica), 1+ (ako je bojenje više od 10% pregledanih stanica slabo i nepotpuno), 2+ (ako se više od 10% stanica boja umjereno) ili 3+ (ako se više od 30% stanica jasno i potpuno boja), s time da se samo 3+ definira kao pozitivan nalaz, a 0 ili 1+ kao negativan nalaz. U graničnim slučajevima (2+) koristili smo fluorescentnu *in situ* hibridizaciju (Abbot-Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe kit, Abbot Laboratories, Abbot Park, IL), sukladno preporukama proizvođača. Rezultati FISH-a su interpretirani na 60 pregledanih tumorskih jezgara, tako da je izračunat omjer prosječnog broja kopija HER2/neu gena i centromere kromosoma 17, s time da su uzorci u kojima je navedeni omjer ispod 2,0 smatrani negativnima, a uzorci u kojima je omjer 2,0 ili veći pozitivnima. Gradus tumora, odnosno njegova invazivnost je određena Nottinghamskom metodom.

Tkivna tumorska ekspresija ER, PgR, HER2/neu, kao i histološka vrsta i gradus tumora te određivanje HER2 statusa FISH metodom učinjeno je u Kliničkom zavodu za patologiju KBC Zagreb.

### **4.3 Prikupljanje i analiza uzoraka krvi i određivanje HER2/ECD u serumu**

Prikupljeni uzorci od po 5 mL krvi su centrifugirani 5 minuta na 1250 g, nakon čega je odvojen serum i uskladišten na -20°C ili na nižoj temperaturi. U svakom prikupljenom uzorku krvi jedan puta je određen HER2/ECD i CA 15-3.

Serumska koncentracija CA 15-3 određivana je ECLIA metodom (Modular Roche, Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie E.V.) sukladno preporukama proizvođača. Raspon referentnih vrijednosti za CA 15-3 je od 0-25 kIU/l.

Određivanje HER2/ECD učinjeno je ELISA metodom tvrtke Bayer (Human Neu Oncoprotein ELISA; Oncogene Science/Bayer Diagnostics, Cambridge, MA; patent u vlasništvu Siemens Diagnostics). Raspon referentnih vrijednosti za HER2/ECD u bolesnica s metastatskom bolešću je 0-15 ng/ml, a metoda je odobrena od strane FDA za praćenje bolesnica s metastatskim rakom dojke. Ukratko, kit za određivanje HER2/ECD je dvostruki sandwich imunosej. U reagensu „Lite“ je mišje monoklonalno antitijelo TA-1 obilježeno akridinijskim esterom, a u „Fluorescein Conjugate“ reagensu nalazi se monoklonalno mišje antitijelo NB-3 obilježeno fluoresceinom. Oba monoklonalna antitijela specifična su za različite epitope na vanstaničnoj domeni HER2/neu. Treća komponenta sustava je „Solid Phase“, koji se sastoji od pročišćenog mišjeg monoklonalnog antitijela koje veže nastali imunokompleks, a kovalentno je vezano s paramagnetskim česticama. Izmjerena kemiluminiscencija je izravno proporcionalna količini HER2/ECD antigena u uzorku.

Određivanje serumske koncentracije CA 15-3 i HER2/ECD je učinjeno u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb.

#### **4.4 Procjena proširenosti bolesti i praćenje bolesnica**

Proširenost bolesti je klasificirana prema međunarodnoj TNM klasifikaciji, odnosno pTNM nakon klasične patohistološke analize. Zahvaćenost limfnih čvorova procijenjena je iz patohistoloških nalaza disekcije aksile, a odsutnost udaljenih metastaza ispitana je radiološki prije planiranog operativnog zahvata.

Za vrijeme istraživanja bolesnice su praćene klinički, laboratorijski i radiološki tijekom dvije godine, četiri puta tijekom godinu dana u predviđenim razmacima od po 3 mjeseca, a u slučaju pojave kliničkog ili biokemijskog povrata bolesti odmah. Klinički status je procijenjen fizikalnim pregledom prilikom svake kontrole bolesnica. Laboratorijska kontrola za biokemijski povrat bolesti podrazumijevala je rutinske laboratorijske pretrage (hematološke, opće biokemijske i mali koagulogram) te određivanje serumske koncentracije tumorskog biljega CA15-3, a radiološke dijagnostičke pretrage rutinski su podrazumijevale rendgenogram srca i pluća te ehosonografski pregled trbuha prilikom svake kontrole, uz scintigrafiju kostiju jednom godišnje. Ciljani rendgenogrami kostiju učinjeni su u slučaju patološkog nalaza scintigrafije, a kompjutorizirana tomografija odgovarajućih anatomskih regija u slučaju pojave suspektnih lezija u nalazima rendgenograma pluća i ehotomografije trbuha. Praćenje bolesnica prikazano je u tablici 4.

#### **Tablica 4. Prikaz praćenja bolesnica**

---

| Mjesec praćenja |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| <b>FP</b>       | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  |
| <b>Lab.</b>     | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  | x  |
| <b>CA</b>       |   |   | x |   |   | x |   |   | x |    |    | x  |    |    | x  |    |    | x  |    |    | x  |    |    | x  |
| <b>15-3</b>     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| <b>Rtg s/p</b>  |   |   | x |   |   | x |   |   | x |    |    | x  |    |    | x  |    |    | x  |    |    | x  |    |    | x  |
| <b>UZV</b>      |   |   | x |   |   | x |   |   | x |    |    | x  |    |    | x  |    |    | x  |    |    | x  |    |    | x  |
| <b>SK</b>       |   |   |   |   |   | x |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    | x  |    |    |    |    |    |    |

**CT, ciljane Rtg snimke:** u slučaju patološkog nalaza snimke pluća ili scintigrafije kostiju

FP = fizikalni pregled; Lab. = rutinske laboratorijske pretrage (KKS, DKS, kreatinin, urea, Na, K, Ca, AST, ALT, GGT, ALP, LDH, CK, bilirubin, PV, APTV, fibrinogen); Rtg s/p = rendgenogram srca i pluća; UZV = ehotomografija abdomena; SK = scintigrafija kostiju.

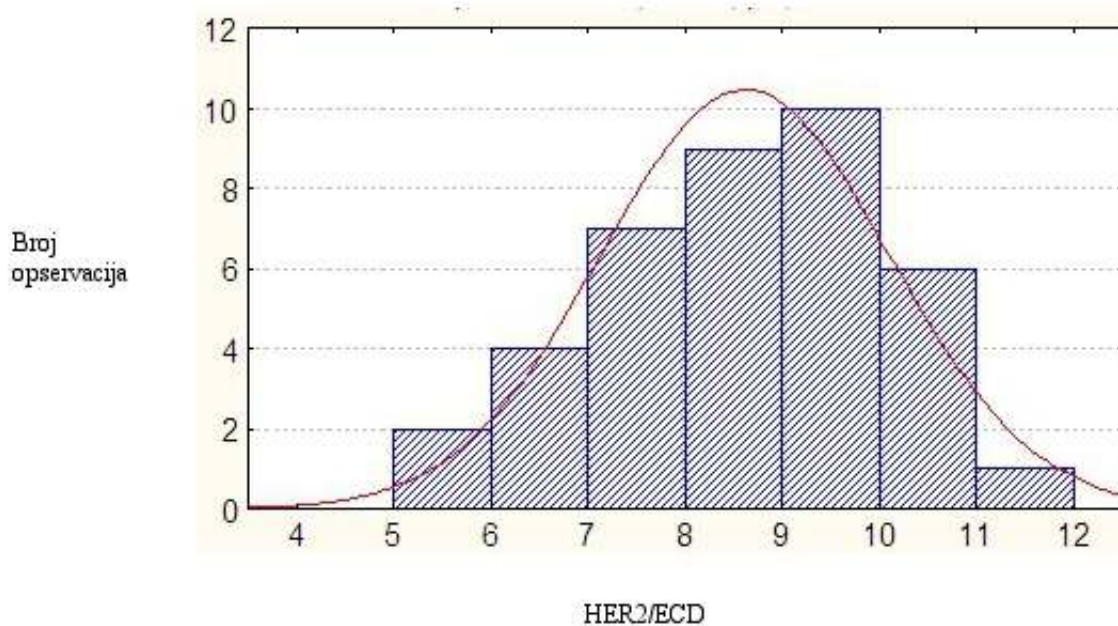
## 4.5 Statistička analiza

Rad je dizajniran kao prospektivna opservacijska studija za opis prevalencije povišene serumske koncentracije HER2/ECD u bolesnica s ranim rakom dojke, njezinu korelaciju s poznatim čimbenicima rizika, te njezin prognostički značaj za preživljenje do progresije bolesti (TTP, eng. time to progression ili DFS, eng. disease-free survival) i učinak na ukupno preživljenje (OS, eng. overall survival).

Za ispitivanje prevalencije serumskog HER2 pozitiviteta korišten je z-test, uz pretpostavljenu proporciju u uzorku 0,30 i  $\alpha=0,05$ . Uključivanjem više od 39 bolesnica osigurana je adekvatna statistička snaga istraživanja. Za usporedbu serumskih koncentracija HER2/ECD u skupini bolesnica i kontrola korišten je t-test. Za korelaciju HER2/neu i HER2/ECD s drugim čimbenicima rizika korišten je Kendallov test. Za određivanje dijagnostičke vrijednosti HER2/ECD korišten je ROC (eng. receiver operating characteristic curve) dijagram s površinom ispod krivulje (AUC, eng. area under curve) kao mjerilom dijagnostičke vrijednosti testa, a TG-ROC krivulja za određivanje najbolje granične vrijednosti serumske koncentracije HER2/ECD. Mjerila vrijednosti testa (specifičnost, osjetljivost) izračunata su korištenjem softvera STATA 10.1 (Stata Press, College station, Texas, USA). Bolesnice su stratificirane sukladno preživljenu do progresije bolesti (DFS, eng. disease-free survival), koje je definirano kao vremenski interval u od završetka liječenja do pojave recidiva, te su s ciljem ispitivanja prognostičke vrijednosti određivanja serumske koncentracije HER2/ECD u bolesnica s ranim rakom dojke izračunate procjene preživljenja Kaplan-Meier analizom.

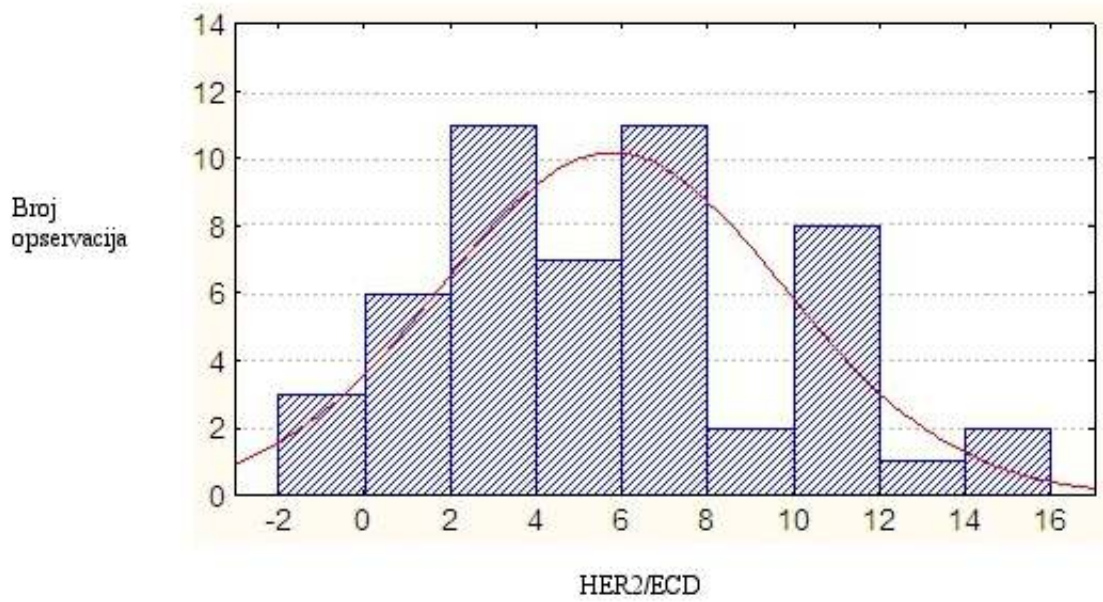
## 5. REZULTATI

Srednja serumska koncentracija HER2/ECD u bolesnica s karcinomom bila je 8,62 ng/ml (SD  $\pm$ 1,486), a u zdravih kontrola 5,78 ng/ml (SD  $\pm$ 3,99). Usporedba srednjih koncentracija HER2/ECD učinjena je t-testom, i dobivena je statistički značajna razlika ( $p=0,000061$ ), čime je potvrđena osnovna hipoteza istraživanja. Prikaz distribucije serumske koncentracije HER2/ECD u bolesnica i zdravih kontrola prikazane su na slici 1 i 2, a usporedba (Box i Whisker dijagram) je prikazan na slici 3.

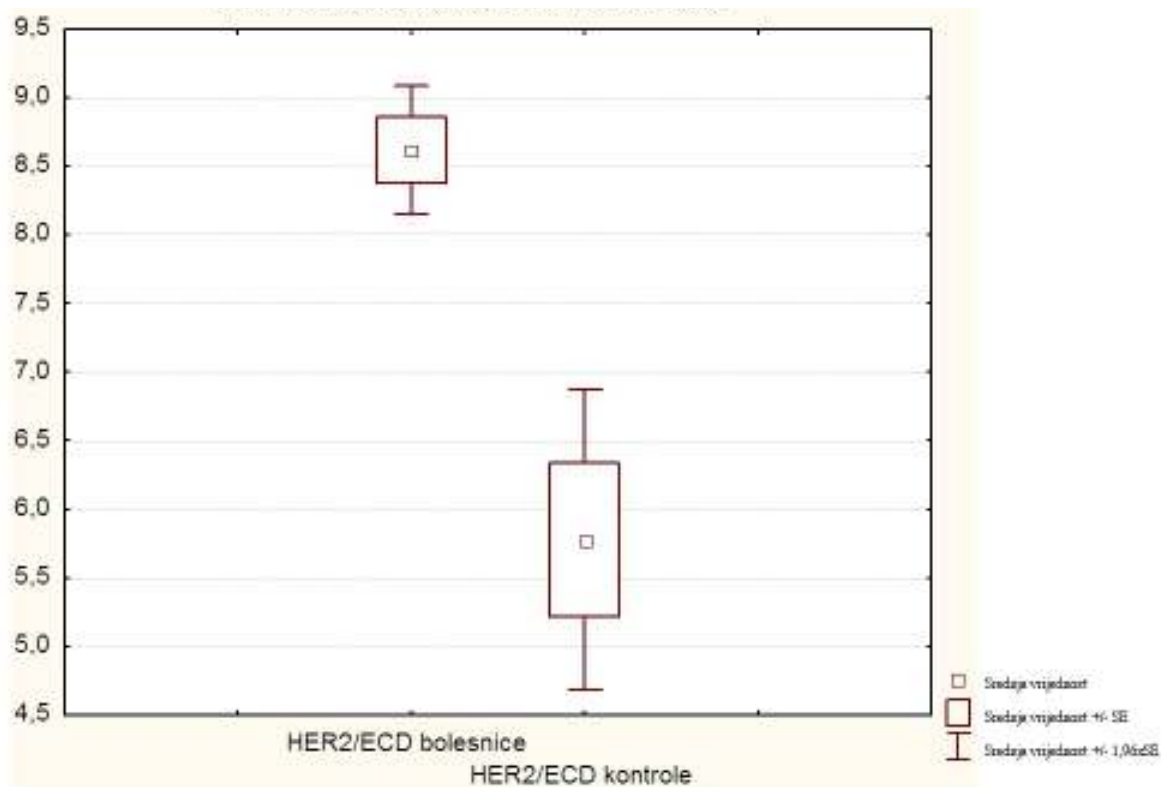


Slika 1. Prikaz normalnosti distribucije serumske koncentracije HER2/ECD u bolesnica s ranim rakom dojke.



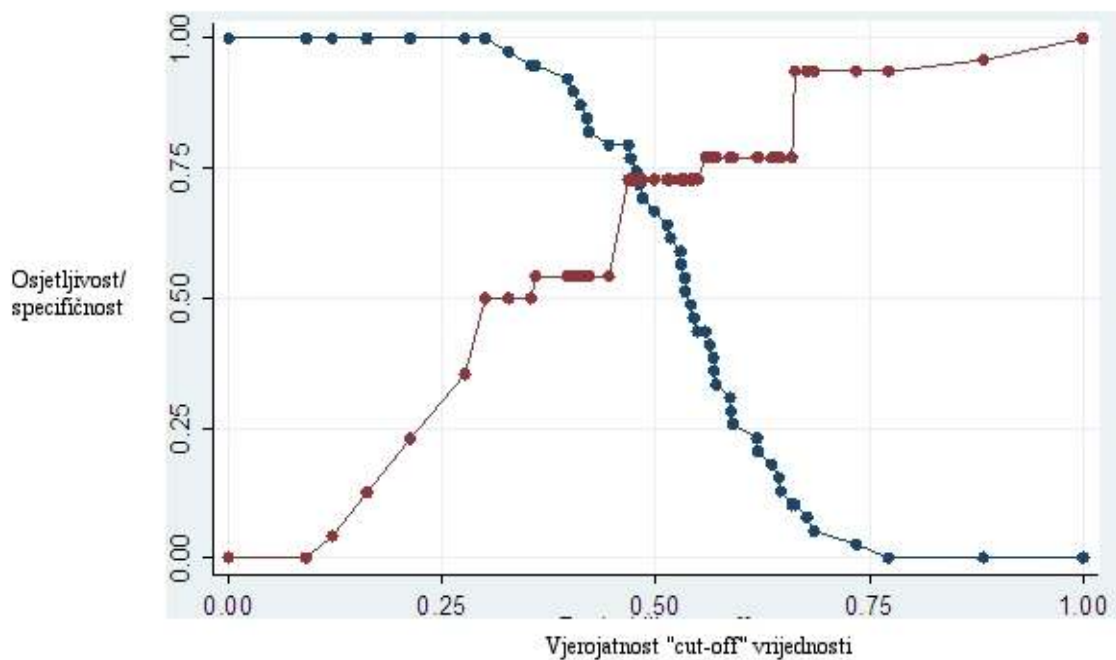


Slika 2. Prikaz normalnosti distribucije serumske koncentracije HER2/ECD u zdravih kontrola.



Slika 3. Box i Whisker dijagram usporedbe serumskih koncentracija HER2/ECD u bolesnica s rakom dojke i zdravih kontrola ( $p=0,000061$ ).

Izračunata je najbolja dijagnostička granična vrijednost serumske koncentracije HER2/ECD između bolesnica s karcinomom i zdravih kontrola, koja je iznosila 7,7 ng/ml. Bolesnice su stratificirane u dvije skupine: s koncentracijom HER2/ECD  $\geq 7,7$  ng/ml koje su deklarirane kao pozitivne, te s koncentracijom HER2/ECD  $< 7,7$  ng/ml koje su deklarirane kao negativne. U skupini pozitivnih bila je 31 bolesnica, a negativnih je bilo 10. TG-ROC krivulja je prikazana na slici 4.



Slika 4. TG ROC krivulja za određivanje najbolje granične vrijednosti serumske koncentracije HER2/ECD. Crvena linija predstavlja specifičnost, a plava osjetljivost testa.

Daljnjom analizom ustanovljena je pozitivna korelacija između serumske HER2/ECD pozitivnosti i većeg gradusa tumora, većeg proliferacijskog indeksa Ki67, te ekspresije ER i PR. Serumska HER2/ECD pozitivnost nije korelirala s kliničkim stadijem bolesti, kao niti s histološkom HER2/neu pozitivnošću. Tkivna HER2/neu pozitivnost korelirala je s većim gradusom tumora, većim proliferacijskim indeksom Ki67, te brojem tumorom zahvaćenih pazušnih limfnih čvorova. Nije dokazana pozitivna korelacija

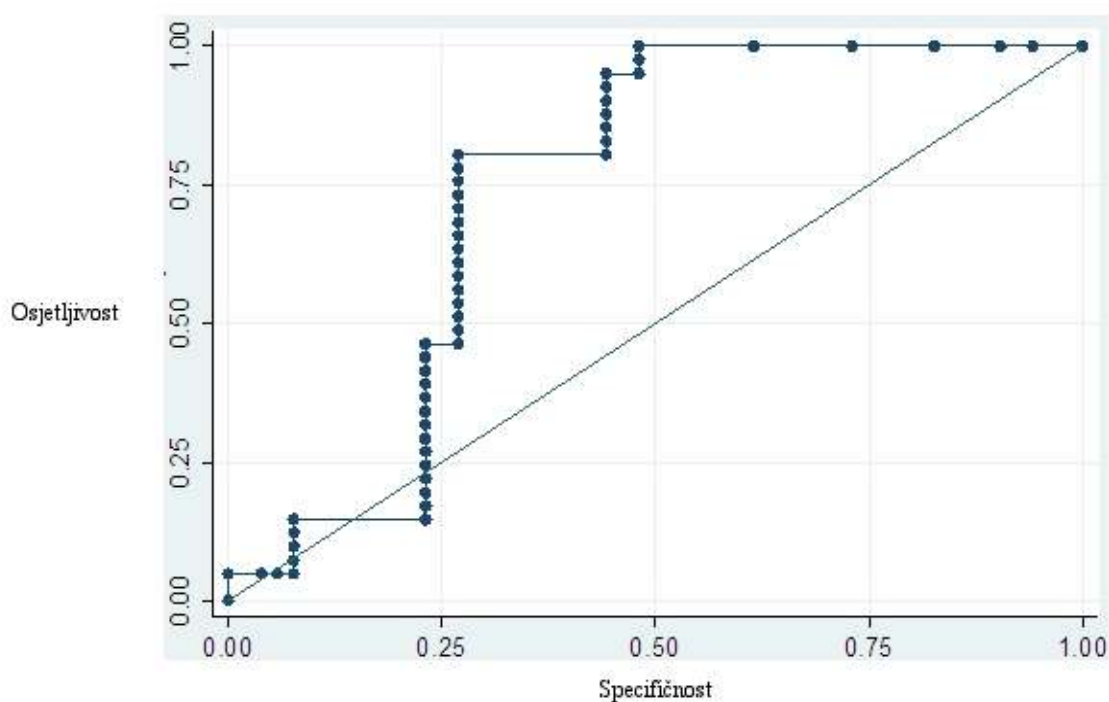
između tkivne HER2/neu pozitivnosti i statusa hormonskih receptora te kliničkog stadija bolesti. U tablici 5. prikazani su korelacijski koeficijenti serumske i histološke HER2 pozitivnosti s ostalim čimbenicima rizika.

**Tablica 5. Koeficijenti korelacije serumske koncentracije HER2/ECD i histološke HER2/neu pozitivnosti s drugim čimbenicima rizika**

| Varijabla       | NG   | ER (%) | PR (%) | Ki67 (%) | Broj    |                |                |                    |
|-----------------|------|--------|--------|----------|---------|----------------|----------------|--------------------|
|                 |      |        |        |          | poz. LN | Zahv. LN (+/-) | Stadij bolesti | HER2/ECD bolesnice |
| <b>HER2/ECD</b> | 0,28 | 0,19   | 0,47   | 0,42     | 0,19    | -0,09          | -0,18          | 1,00               |
| <b>HER2/neu</b> | 0,31 | -0,45  | -0,38  | 0,24     | 0,19    | 0,05           | -0,01          | -0,06              |

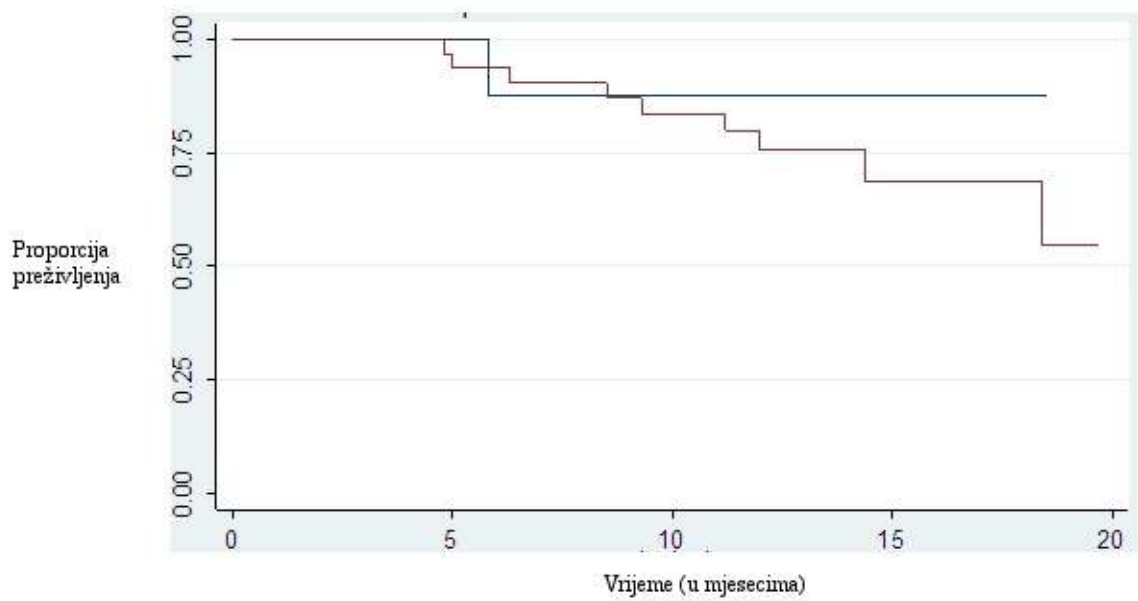
NG = nuklearni gradus, ER = estrogenski receptori, PR = progesteronski receptori, Zahv. LN = zahvaćenost limfnih čvorova.

Test je pokazao dobru dijagnostičku vrijednost za rani rak dojke. U svrhu ispitivanja dijagnostičke vrijednosti testa korišten je ROC dijagram, s površinom ispod krivulje kao mjerilom dijagnostičke vrijednosti testa. AUC je iznosila 0,739, uz osjetljivost testa od 76,92% i specifičnost od 72,92%. Pozitivna prediktivna vrijednost iznosila je 69,77%, a negativna prediktivna vrijednost testa bila je 79,55%. Koristeći graničnu vrijednost od 7,7 ng/ml, ispravno je klasificirano 74,71% bolesnica. ROC dijagram prikazan je na slici 5.



Slika 5. ROC dijagram za procjenu dijagnostičke vrijednosti testa koristeći graničnu vrijednost serumske koncentracije HER2/ECD od 7,7 ng/ml. AUC (area under ROC curve) = 0,739, što ukazuje na dobru dijagnostičku vrijednost.

U konačnici je Kaplan-Meier analizom izračunata procjena razlike u ukupnom preživljenju između navedenih skupina bolesnica na osnovi podatka o vremenu do progresije bolesti. Medijan praćenja bolesnica bio je 22,8 mjeseci, sukladno planu istraživanja. Srednje vrijeme ukupnog preživljenja u bolesnica sa serumskom koncentracijom HER2/ECD <7,7 ng/ml bilo je 22,8 mjeseci, a u bolesnica sa serumskom koncentracijom HER2/ECD  $\geq$ 7,7 ng/ml 13,5 mjeseci. Nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom preživljenju između dvaju skupina bolesnica (Log rank  $p=0,369$ ). Krivulje procjene preživljenja prikazane su na slici 6.



Slika 6. Kaplan-Meier analiza procjene preživljenja na osnovi podatka o vremenu do progresije bolesti. Crvena linija predstavlja bolesnice sa serumskom koncentracijom HER2/ECD > 7 ng/ml, a plava bolesnice s koncentracijom < 7 ng/ml. Log-rank test nije pokazao statistički značajnu razliku u preživljenju ( $p=0,369$ ).

## 6. RASPRAVA

HER2/neu receptor je transmembranski protein veličine 185 kDA, čije je prognostičko i prediktivno značenje nedvojbeno potvrđeno u brojnim kliničkim istraživanjima. Kao zlatni standard za određivanje HER2 pozitivnosti uzima se imunohistokemijsko bojenje receptora u tkivu tumora. Uslijed nekonzistentnosti rezultata imunohistokemijskog (semikvantitativnog) određivanja HER2 pozitivnosti zbog subjektivnosti same metode, koja uvelike ovisi o iskustvu patologa i onkološkog centra općenito, pokazala se potreba za otkrivanjem alternativnih metoda zbog potrebe za kvantifikacijom pozitivnosti dobivenih rezultata. Kao najbolje metode za određivanje HER2 statusa iz tkiva tumora u dvojbena slučajevima na osnovi imunohistokemijske analize pokazale su se fluorescentna i kromogena in situ hibridizacija, a koje se zasnivaju na određivanju direktne amplifikacije DNA. Odabir metode ovisi prvenstveno o iskustvu te o mogućnostima pojedinog medicinskog centra.

Znanstvena i klinička istraživanja tijekom posljednjih nekoliko godina ukazala su na mogućnost promjene biologije tumora tijekom liječenja, što za posljedicu može imati i izmjenu hormonskog ili HER2 statusa. Izmjena HER2 statusa ili hormonske ovisnosti tumora tijekom liječenja je dokazana u oko jedne petine bolesnica tijekom dvogodišnjeg praćenja u istraživanju Edgertona i suradnika 2003. godine. Uzmemo li u obzir činjenicu da su HER2/neu pozitivni klonovi tumorskih stanica otporniji na liječenje hormonskom terapijom i kemoterapijom, jasan je i rezultat istraživanja Brauna i suradnika iz 2001. godine koji ukazuje na veću učestalost HER2/neu pozitivnosti u biopsijskim uzorcima metastaza recidiva tumora nego u samim primarnim tumorima (50-68% vs. 20-30%). Još od otkrića Slammone i suradnika 1988. godine koje je ukazalo da je agresivnost tumora dojke proporcionalna broju kopija izraženih HER2/neu receptora, provedena su brojna pretklinička i klinička istraživanja koja su dovela do otkrića i registracije trastuzumaba 1998. godine, koji je zamišljen kao specifična terapija za tumore s prekomjernom ekspresijom HER2/neu receptora. Imajući u vidu da liječenje trastuzumabom uz kemoterapiju dvostruko poboljšava prognozu bolesnica s tumorima koji prekomjerno izražavaju HER2/neu receptore, izmjena biologije bolesti tijekom liječenja dovodi i do potrebe za promjenom terapijskog pristupa. Dokazano je da terapija trastuzumabom dovodi do praktično dvostrukog poboljšanja ukupnog

preživljenja, preživljenja do progresije bolesti i povećanja šanse za odgovor tumora na terapiju u bolesnica s diseminiranom bolešću te do dvostrukog poboljšanja ukupnog preživljenja u bolesnica s lokaliziranom bolešću.

Glavni problem stalnog ponovnog određivanja bioloških osobina tumora u rutinskoj kliničkoj praksi tijekom liječenja bolesnica s uznapredovalom bolešću leži zapravo u invazivnosti samih metoda za određivanje histoloških osobina tumora, osobito u svjetlu činjenice da su bolesnice s metastatskim rakom dojke suštinski neizlječive, a imajući na umu da bi pritom bile podvrgnute invazivnim i neugodnim zahvatima poput opetovanih biopsija jetre, kostiju ili torakotomija. Osim što bi invazivne dijagnostičke pretrage gotovo sigurno dovele i do povećanog broja komplikacija što zbog same invazivnosti metoda što zbog opetovanih hospitalizacija, nedvojbeno bi dovele i do narušavanja kvalitete života bolesnica s metastatskim rakom dojke.

HER2/neu receptor je transmembranski protein čija se vanstanična domena djelovanjem metaloproteaza odcjepljuje s površine stanica, a zahvaljujući njezinoj veličini (oko 105 kDA) može se relativno jednostavno detektirati u serumu vezivanjem sa specifičnim obilježenim protutijelima, primjerice ELISA metodom. Ova je metoda minimalno invazivna jer zapravo podrazumijeva samo višekratno uzorkovanje krvi, čemu su bolesnice ionako opetovano podvrgnute tijekom liječenja, te je samim time i praktična za rutinsku uporabu tijekom praćenja bolesnica za vrijeme liječenja.

U kliničkoj praksi je u početku određivanje serumske koncentracije HER2/ECD kao i ispitivanje njezine korisnosti u kvantifikaciji ekspresije HER2/neu poteklo od potrebe za predviđanjem patohistološkog odgovora na kemoterapiju i terapiju trastuzumabom tijekom neoadjuvantnog liječenja bolesnica s lokalno uznapredovalom bolešću (kliničkog stadija III), s obzirom da je histološki odgovor na neoadjuvantnu terapiju iznimno važan prognostički čimbenik ukupnog preživljenja (odnosno potencijalnog izlječenja) navedenih bolesnica. Brojna klinička istraživanja koja su provedena naknadno dokazala su korisnost određivanja serumske koncentracije vanstanične domene HER2 receptora i u prognostičkom i u prediktivnom smislu, kako u bolesnica s diseminiranom bolešću tako i u bolesnica s lokalno uznapredovalom bolešću. Naime, u neoadjuvantno liječenih bolesnica povišena serumska koncentracija HER2/ECD prije i nakon provedenog kirurškog liječenja pokazala se kao značajan rizični čimbenik kraćeg vremena do povrata bolesti, a sukladno rezultatima Mehte i suradnika iz 1998. godine te

Saghatchiana i suradnika iz 2001. godine po svom značaju pozicionirala se na drugom mjestu odmah nakon zahvaćenosti pazušnih limfnih čvorova. Zahvaćenost pazušnih limfnih čvorova ostala je najvažniji prognostički čimbenik lošijeg preživljenja bolesnica s rakom dojke, a svi ostali histološki prognostički čimbenici bili su manje značajni za procjenu prognoze bolesti. Navedena su klinička istraživanja serumsku koncentraciju HER2/ECD etablirala kao značajan rizični čimbenik za povrat bolesti u bolesnica s lokalno uznapredovalom bolešću. Isola i suradnici 1994. godine te Molina i suradnici 1999. godine pokazali su da se u neoadjuvantno liječenih bolesnica serijskim određivanjem serumске koncentracije HER2/ECD jednom mjesečno može predvidjeti povrat bolesti najmanje šest mjeseci ranije nego standardnim pretragama za otkrivanje recidiva bolesti.

U bolesnica s diseminiranom bolešću se, pored prognostičkog značenja za ukupno preživljenje te vrijeme do progresije bolesti, serumska koncentracija HER2/ECD pokazala i kao dobra metoda i za procjenu odgovora tumora na terapiju. Prvo su Colomer i suradnici 2000. godine ukazali da je povišena serumska koncentracija HER2/ECD na početku liječenja povezana s rjeđim kompletnim odgovorom i ukupnim trajanjem odgovora na kemoterapiju doksorubicinom i paklitakselom, a što su kasnije potvrdili i Harris i suradnici 2001. godine te Lüftner i suradnici 2004. godine. Lipton i suradnici su 2002. godine potvrdili da je povišena serumska koncentracija HER2/ECD na početku liječenja povezana s rjeđom regresivnom dinamikom metastatskog raka dojke i u bolesnica koje su liječene hormonskom terapijom. Cook i suradnici 2001. godine te Esteve i suradnici 2002. godine su u bolesnica s metastatskim rakom dojke dokazali da kinetika serumске koncentracije HER2/ECD tijekom liječenja dobro korelira s radiološki potvrđenim smanjenjem ili progresijom tumora uz terapiju trastuzumabom i paklitakselom, odnosno da se može koristiti i kao biljeg za praćenje regresivne dinamike bolesti. Upravo je prema istraživanju Esteve i suradnika prvi puta postavljena granična serumska koncentracija od 15 ng/ml kao referentna „normala“ za bolesnice s metastatskom bolešću. Pretpostavlja se da ekspresija HER2/neu receptora nije homogena u čitavom tumoru zbog poliklonalnosti samog tumora te da serumska koncentracija HER2/ECD zapravo odražava trenutnu ekspresiju HER2/neu statusa tumora, za razliku od ugljikohidratnih antigena poput CA 15-3 ili CA 27.29 koji isključivo odražavaju ukupnu tumorsku masu. Ove tvrdnje potkrijepljuje i različita



kinetika serumske koncentracije HER2/ECD i ugljikohidratnih antigena za vrijeme liječenja. Lüftner i suradnici dokazali su 2003. godine da u gotovo svih bolesnica liječenih trastuzumabom pad serumske koncentracije HER2/ECD odmah po započinjanju liječenja (tijekom prva četiri tjedna) ukazuje na 90%-tnu vjerojatnost potpunog ili djelomičnog odgovora tumora na terapiju.

U istraživanju Mazounija i suradnika iz 2007. godine ispostavilo se da početna serumska koncentracija HER2/ECD veća od 15 ng/ml nema prognostičku važnost niti u bolesnica s lokaliziranom niti u bolesnica s lokalno uznapredovalom bolešću. Međutim, i u tom je istraživanju kinetika serumske koncentracije HER2/ECD tijekom neoadjuvantnog liječenja bolesnica s tumorom kliničkog stadija III bila povezana s većom učestalošću dobrog patohistološkog odgovora u bolesnica koje su bile liječene kemoterapijom na bazi antraciklina ili taksana uz trastuzumab.

Tijekom liječenja bolesnica s metastatskim rakom dojke, s obzirom na neprikladnost određivanja prekomjerne ekspresije HER2/neu iz tkiva tumora, posljednjih godina se, analogijom rezultata prethodno navedenih istraživanja, kao surogatni biljeg počelo određivati serumsku koncentraciju ekstracelularne domene HER2/neu receptora, osobito u Sjedinjenim Američkim Državama gdje je test odobren i od strane regulatornih tijela.

Iako je prvotna pretpostavka drugih istraživača bila da serumska HER2 pozitivnost ujedno znači i histološku pozitivnost, serumska koncentracija HER2/ECD je na kraju izdvojena kao zaseban rizični čimbenik lošijeg ukupnog preživljenja, vremena do progresije bolesti i vremena bez znakova bolesti u bolesnica s rakom dojke. Uloga serumske koncentracije HER2/ECD kao zasebnog prognostičkog čimbenika potvrđena je u istraživanju Sorensena i suradnika iz 2010. godine u bolesnica s rakom dojke nakon provedenog liječenja trastuzumabom, s obzirom da se nije dokazala izvorno pretpostavljena histološka HER2/neu i serumska HER2/ECD pozitivnost. Sama povišena serumska koncentracija HER2/ECD nakon liječenja je u navedenom istraživanju bila dobar prediktivni čimbenik ukupnog preživljenja.<sup>clxii</sup> Moguće objašnjenje neovisnosti serumske i histološke HER2 pozitivnosti leži u interindividualnim genetskim razlikama u aktivnosti metaloproteaza koje su dokazane u istraživanju Pearcea i suradnika 2005. godine, a koje su suštinski odgovorne za porast serumske koncentracije HER2/ECD.<sup>clxiii</sup> U rezultatima isprva objavljenih istraživanja, poput studije Forniera i suradnika iz 2005. godine, smatralo se HER2 pozitivnima

bolesnice s metastatskim rakom dojke u kojih je serumska kocentracija HER2/ECD bila >15 ng/ml.<sup>clxiv</sup> U naknadnim istraživanjima drugi autori su, poput Ludovinija i suradnika 2008. godine, jednostavno translatali graničnu vrijednost koja je utvrđena u bolesnica s metastatskim rakom dojke i na bolesnice s lokalno uznapredovalom bolešću (kliničkog stadija III).<sup>clxv</sup>

***Serumska koncentracija HER2/ECD u zdravih žena i bolesnica s ranim rakom dojke je različita.***

Sukladno prethodno spomenutom istraživanju Esteve i suradnika u kojem se ukazalo na korelaciju pada serumske koncentracije HER2/ECD i radiološki potvrđenog smanjenja ukupne tumorske mase u bolesnica s metastatskim rakom dojke, vjerojatno je da na porast serumske koncentracije HER2/ECD osim genetski uvjetovanih različitosti u enzimskoj aktivnosti metaloproteaza ipak utječe i ukupna tumorska masa. Samim time nije vjerojatno za pretpostaviti da ista pravila vrijede i za bolesnice s lokaliziranim tumorima dojke, vrlo male ukupne mase. Moguće je bilo pretpostaviti ili da je sama serumska HER2 pozitivnost iznimno varijabilna u ovih bolesnica te da nema nikakvog kliničkog značaja, ili da će se moći pronaći nižu graničnu vrijednost u bolesnica s lokaliziranim tumorima dojke i potom ispitati njezinu prognostičku i/ili prediktivnu ulogu. S obzirom da je HER2/neu receptor izražen na praktično svim epitelnim stanicama normalnih zdravih tkiva te da ima važnu fiziološku ulogu u procesima reparacije tkiva, kao što imaju i same tkivne metaloproteaze, nije bilo vjerojatno niti pretpostaviti da je serumska koncentracija njegove vanstanične domene u zdravih žena jednaka nuli, odnosno ispod razine detekcije vrlo osjetljivom i specifičnom ELISA metodom. Prvotna pretpostavka bila je zapravo da je serumska koncentracija HER2/ECD u zdravih žena manja od koncentracije u bolesnica s rakom dojke, uz i dalje otvoreno pitanje je li dotična koncentracija u bolesnica s ranim rakom dojke jednaka ili manja od koncentracije u bolesnica s metastatskom bolešću. Uzeli smo uzorke krvi 41 bolesnice s tumorom dojke kliničkog stadija I i II (od čega je 66% bolesnica imalo tumore T1N0 a 34% T1N1) te usporedili serumsku koncentraciju HER2/ECD s uzorcima krvi dobivenih od 52 zdrave žene odgovarajućih demografskih osobina. Pritom smo uzeli veći broj uzoraka od zdravih žena, kako bismo pojačali statističku

snagu istraživanja u smislu veće negativne prediktivne vrijednosti testa. Usporedbu smo učinili t-testom nakon provjere normalnosti distribucije uzoraka. Ispostavilo se da postoji statistički značajna razlika između serumskih koncentracija HER2/ECD u zdravih žena i serumske koncentracije HER2/ECD bolesnica s ranim rakom dojke. Naime, u zdravih žena srednja je serumska koncentracija HER2/ECD iznosila 5,78 ng/ml, a u bolesnica s karcinomom je iznosila 8,62 ng/ml (SD  $\pm$ 3,99,  $p=0,000061$ ). Obje su srednje koncentracije bile niže od granične vrijednosti za koja vrijedi za bolesnice s metastatskim rakom dojke, a što je bilo u skladu s našim inicijalnim pretpostavkama.

***Određivanje serumske koncentracije HER2/ECD ima dijagnostičku vrijednost u bolesnica s ranim rakom dojke.***

Nakon što smo ustanovili da postoji objektivna razlika u serumskim koncentracijama HER2/ECD u zdravih i bolesnih žena, ispitali smo i moguću dijagnostičku vrijednost testa. U svrhu ispitivanja dijagnostičke vrijednosti testa korišten je ROC (eng. relative operating characteristic) dijagram, s površinom ispod krivulje kao mjerilom dijagnostičke vrijednosti testa. Kao najbolja dijagnostička granična vrijednost izračunata je serumska koncentracija HER2/ECD od 7,7 ng/ml. Površina ispod krivulje pritom je iznosila 0,739, uz osjetljivost testa od 76,92% i specifičnost od 72,92%, te pozitivnu prediktivnu vrijednost od 69,77% i negativnu prediktivnu vrijednost od 79,55%. Postavivši graničnu serumsku koncentraciju HER2/ECD kao dijagnostičku, ispravno se klasificira 74,71% bolesnica. Imajući na umu osjetljivost i specifičnost drugih rutinskih dijagnostičkih metoda poput citološke analize aspirata tumora čija se osjetljivost i specifičnost kreću u rasponu od oko 60-80%, ili ugljikohidratnih tumorskih biljega poput CA15-3 ili CA27.29 koji se uopće ne koriste u dijagnostici raka dojke upravo zbog još niže specifičnosti i osjetljivosti, dobiveni rezultat ukazuje na mogućnost korištenja ovog testa prilikom rutinskog probira zdravih žena u slučaju suspektnog mamografskog ili ultrazvučnog nalaza za odluku o potrebi citološke ili (još bolje) histološke verifikacije. Do ovog istraživanja nije još nigdje u svijetu dokazana dijagnostička vrijednost serumske koncentracije HER2/ECD te je, naravno, prije rutinske uporabe ovog testa za dijagnostiku ranog raka dojke potrebno provesti

validaciju metode u našim laboratorijima. S obzirom na potreban broj uzoraka te brzinu mogućnosti njihovog prikupljanja, postupak validacije je još u tijeku.

***Povišena serumska koncentracija HER2/ECD u bolesnica s ranim rakom dojke povezana je s ostalim histološkim rizičnim čimbenicima lošijeg preživljenja, no nije povezana s histološkom HER2/neu pozitivnošću već je zaseban rizični čimbenik.***

Nakon utvrđivanja potencijalne dijagnostičke vrijednosti testa, ispitano je ima li određivanje serumske koncentracije HER2/ECD i prognostičko značenje u bolesnica s ranim rakom dojke. Uzevši u obzir dobivenu dijagnostičku graničnu vrijednost serumske koncentracije HER2/ECD od 7,7 ng/ml, bolesnice su svrstane u dvije skupine: u skupinu s koncentracijom HER2/ECD u serumu većom ili jednakom 7,7 ng/ml koje su smatrane pozitivnima, te u skupinu s koncentracijom HER2/ECD u serumu manjom od 7,7 ng/ml koje su smatrane negativnima. Određeni su ostali poznati histološki čimbenici rizika lošijeg preživljenja bolesnica s rakom dojke poput hormonskih receptora, proliferacijskog indeksa Ki67, broja tumorom zahvaćenih pazušnih limfnih čvorova, histološkog gradusa tumora te je na osnovi TNM klasifikacije određen klinički stadij bolesti. Kendallovim testom korelirani su poznati histološki rizični čimbenici lošijeg preživljenja s povišenom serumskom koncentracijom HER2/ECD ( $\geq 7,7$  ng/ml), i ustanovljena je povezanost tako doznačene serumske HER2 pozitivnosti i većeg gradusa tumora, većeg proliferacijskog indeksa Ki67, te ekspresije estrogenskih receptora i progesteronskih receptora. Pritom je najjača korelacija bila između serumske HER2 pozitivnosti i pojačane ekspresije progesteronskih receptora (koeficijent korelacije +0,47). Serumska HER2 pozitivnost nije korelirala s histološkom HER2 pozitivnošću, kao niti s kliničkim stadijem bolesti. Korelacija između serumske i tkivne HER2 pozitivnosti predmet je rasprave u znanstvenim krugovima u posljednjih nekoliko godina, s obzirom da do danas nije izviješćeno o nedvojbenoj povezanosti ovih dvaju varijabli. Rezultati dosadašnjih znanstvenih istraživanja su po tom pitanju nekonzistentni i kontradiktorni. Serumska koncentracija HER2/ECD iznad 15 ng/ml je

dobro korelirala s lošijim preživljenjem bolesnica s metastatskim rakom dojke, kao što je ranije rečeno, te su bolesnice s povišenom serumskom koncentracijom HER2/ECD bez provjere biopsijama pojedinih metastatskih sjela smatrane HER2 pozitivnima. U prilog takvom mišljenju su bili i rezultati naknadnih kliničkih studija u kojima je dokazana češća regresija raka dojke u bolesnica s metastatskom bolešću i s povećanom serumskom koncentracijom HER2/ECD ukoliko su bile liječene trastuzumabom, a pri čemu je uočen i pad serumske koncentracije HER2/ECD koji je dobro korelirao s ukupnom masom tumora. Serumskaja koncentracija HER2/ECD se tako počela koristiti i kao tumorski biljeg za praćenje učinka liječenja trastuzumabom, a njezino korištenje u tu svrhu su čak odobrila regulatorna tijela u Sjedinjenim Američkim Državama (Food and Drug Administration). Sukladno rezultatima ovog istraživanja nije dokazana pozitivna korelacija između pojačane tkivne ekspresije HER2/neu i povišene serumske koncentracije HER2/ECD, čime se HER2/ECD ponovno (a ovaj puta i u bolesnica s ranim rakom dojke kliničkog stadija I i II) etablira kao zaseban rizični čimbenik koji dobro korelira s drugim poznatim rizičnim čimbenicima lošijeg preživljenja bolesnica s rakom dojke *per se*. Ovakav nalaz potvrđuje da serumsku HER2 pozitivnost ne bi trebalo shvaćati isključivo kao odrednicu histološke HER2 pozitivnosti, kao što su sugerirala prethodna istraživanja, već kao zaseban čimbenik rizika u bolesnica s rakom dojke. Samim time otvara se mogućnost postojanja serumski pozitivnih a histološki negativnih bolesnica, pri čemu ostaje otvoreno pitanje jesu li one doista HER2 pozitivne ili ne. Ako uzmemo u obzir da mogu postojati bolesnice s relativno niskom aktivnošću metaloproteaza, velika je vjerojatnost da će one biti histološki pozitivne a serumski negativne, dok će bolesnice s visokom aktivnošću metaloproteaza biti serumski pozitivne a histološki negativne. Sukladno rezultatima prethodno spomenutih istraživanja Cooka i suradnika te Esteve i suradnika o učinkovitosti trastuzumaba u samo serumski HER2 pozitivnih bolesnica s metastatskim rakom dojke, možemo pretpostaviti da i samo serumski pozitivne bolesnice treba također liječiti trastuzumabom. Napominjem da dobiveni rezultati, analogijom studija provedenih na bolesnicama s metastatskom bolešću, ne isključuju mogućnost da su samo serumski HER2 pozitivne bolesnice s ranim rakom dojke jednako tako doista pozitivne kako u prognostičkom tako i u terapijskom smislu, bez obzira na nerazjašnjenu molekularnu osnovu ovih pretpostavki. Ulogu trastuzumaba u liječenju serumski pozitivnih a

histološki negativnih bolesnica s ranim rakom dojke potrebno dodatno razjasniti naknadnim kliničkim studijama, kao što je već učinjeno u bolesnica s metastatskom bolešću.

***Povišena serumska koncentracija HER2/ECD povezana je s pojačanom ekspresijom progesteronskih receptora.***

Već nekoliko godina, od otkrića uloge receptora za epidermalne čimbenike rasta u karcinogenezi tumora dojke, u kliničkoj je onkološkoj praksi prognostički i terapijski prepoznato nekoliko različitih podvrsta raka dojke. Općenito se bolesnice s tumorima koji prekomjerno izražavaju hormonske receptore smatraju bolesnicama s boljom prognozom, dok je HER2/neu pozitivnost tumora prihvaćena kao čimbenik rizika lošije prognoze. Tijekom posljednjih nekoliko godina posebna se pozornost pridaje hormonski pozitivnim premenopauzalnim bolesnicama, koje su prepoznate kao bolesnice s lošom prognozom, što se tumači velikom količinom endogenih ženskih spolnih hormona. Otkrivanjem detalja ljudskog genoma i razvrstavanjem malignih tumora dojke prema skupinama mutiranih gena, ispostavilo se da se na osnovi skupina genetskih mutacija tumori dojke mogu klasificirati u nekoliko podvrsta, koje u kliničkoj praksi prilično dobro koreliraju s poznatim histološkim podvrstama. Primarno zbog skupoće, ali i zbog složenosti tehnike te relativno rijetkih terapijskih promašaja ukoliko se u svakodnevnoj praksi služimo kliničko-histološkom stratifikacijom rizika, genetičko profiliranje tumora dojke još uvijek nije ušlo u rutinsku uporabu pri odabiru modaliteta liječenja.

Zanemarimo li nekadašnje dogmatske postavke, te uzmemo li u obzir da povezanost serumske HER2 pozitivnosti i ekspresije hormonskih receptora u do sada provedenim kliničkim istraživanjima u bolesnica s metastatskim rakom dojke ipak nije histološki provjerena, nameće se kao moguće (iako vjerojatno rijetko na osnovi kliničkih iskustava) postojanje istovremene histološke hormonske i serumske HER2 pozitivnosti raka dojke. Korelacija pojačane ekspresije hormonskih receptora i receptora za epidermalne čimbenike rasta je u posljednjih nekoliko godina uočena u brojnim pretkliničkim istraživanjima, a otkriveno je i da su medijatorske interakcije između receptorskih signalnih puteva vjerojatni podležeći molekularni mehanizam rezistencije na hormonsku terapiju ili terapiju lapatinibom. Naime, Schiff i suradnici su 2004.

godine prvi ukazali na povezanost unutarstaničnih genomskih (nuklearnih) i negenomskih (membranskih i citoplazmatskih) signalnih puteva estrogenskih receptora i HER2 receptora te pretpostavili da je potrebno istovremeno primjenjivati hormonsku terapiju i trastuzumab kako bi se spriječio razvoj rezistencije raka dojke na hormonsku ili anti-HER2 terapiju.<sup>clxvi</sup> Arpino i suradnici su u opservacijskoj studiji 2005. godine, očekujući povezanost pojačane ekspresije estrogenskih receptora i HER1 i HER2 pozitiviteta, uočili povezanost izostanka ekspresije progesteronskih receptora u hormonski ovisnih tumora dojke s aberantnim signalnim provođenjem na receptorima epidermalnih čimbenika rasta te posljedično pojačanje ekspresije HER1 i (nešto rjeđe) HER2/neu receptora, a što je u konačnici bilo povezano s rezistencijom na tamoksifen.<sup>clxvii</sup> Kent Osborne i suradnici su 2005. godine ukazali na pojačanje ekspresije HER2/neu receptora u podlozi *de novo* i stečene rezistencije na hormonsku terapiju tamoksifenom inicijalno hormonski ovisnih tumora. Naime, u njihovom istraživanju je pod utjecajem tamoksifena dolazilo do smanjenja ekspresije estrogenskih receptora, a što je u tumora koji nisu izražavali progesteronske receptore dovelo do pojačanja ekspresije HER2/neu receptora, pri čemu je tamoksifen dobio djelomični učinak na pojačanje proliferacije tumorskih stanica te posljedično utjecao na progresiju bolesti. Sukladno tome, jasan je i jači učinak deprivacije estrogena inhibitorima aromataze, kao i istovremena primjena anti-HER2 terapije za mogućnost prevencije rezistencije na hormonsku terapiju. Klinička studija je još uvijek u tijeku.<sup>clxviii</sup> Bartsch i suradnici su 2007. godine dokazali da fulvestrant zbog inhibicije komunikacije unutarstaničnih signalnih puteva progesteronskih receptora i HER2/neu receptora ima jači učinak od drugih vrsta hormonske terapije, odnosno da mu je učinak postojan i nakon smanjenja ekspresije hormonskih receptora i posljedičnog pojačanja ekspresije HER2/neu.<sup>clxix</sup> Finn i suradnici su 2009. godine dokazali da HER2 pozitivne bolesnice nemaju koristi od terapije lapatinibom ako su i PR pozitivne, te da učinkovitost terapije lapatinibom značajno ovisi o kvantitativnoj izraženosti progesteronskih receptora. Ovo je istraživanje prvo koje je u kliničkim uvjetima ukazalo na povezanost unutarstaničnih signalnih puteva HER2/neu receptora i progesteronskih receptora u podlozi rezistencije na anti-HER2 terapiju.<sup>clxx</sup> Uočeni su i potencijalni molekularni mehanizmi u podlozi unutarstanične interakcije između hormonskih i HER2 receptora, ali stoji činjenica da su podaci do sada objavljenih istraživanja o izmjenama statusa pod utjecajem hormonske

ili biološke terapije te o komunikaciji estrogenskih, progesteronskih, HER1 i HER2/neu receptora često kontradiktorni ili nedovoljno usuglašeni.<sup>clxxi</sup>

U svjetlu zasebnosti serumske i histološke HER2 pozitivnosti, ovo je istraživanje zapravo prvo kliničko istraživanje koje potvrđuje povezanost hormonske ovisnosti i serumske HER2/ECD pozitivnosti u bolesnica s rakom dojke. Ove spoznaje će nedvojbeno u budućnosti igrati ulogu u izmjenama terapijskih modaliteta bolesnica s rakom dojke.

***Bolesnice s ranim rakom dojke i serumskom koncentracijom HER2/ECD <7,7 ng/ml vjerojatno imaju bolje ukupno preživljenje.***

Utjecaj povišene serumske koncentracije HER2/ECD na lošije ukupno preživljenje, preživljenje do progresije bolesti te vrijeme bez znakova bolesti dokazan je u više kliničkih studija u bolesnica s metastatskom bolešću, kao i u bolesnica s lokalno uznapredovalom bolešću. Primjena granične vrijednosti od 15 ng/ml koja vrijedi za navedene bolesnice nije polučila značajnu razliku u preživljenju u bolesnica s ranim rakom dojke. Analogijom inicijalno potvrđene pretpostavke da bi serumska koncentracija HER2/ECD u zdravih žena trebala biti manja od koncentracije u bolesnica s tumorom, no i da bi serumska koncentracija u bolesnica s ranim rakom dojke trebala biti manja od koncentracije u bolesnica s metastatskom bolešću (prvenstveno zbog manje ukupne mase tumora), ispitali smo utjecaj različitih graničnih vrijednosti na preživljenje te dobili najbolju razliku upravo kod već ranije prepoznate granične dijagnostičke koncentracije od 7,7 ng/ml. Učinjenom Kaplan-Meier analizom procjene preživljenja uočeno je gotovo dvostruko duže vrijeme bez znakova bolesti u bolesnica sa serumskom koncentracijom HER2/ECD <7,7 ng/ml (22,8 mjeseci) u usporedbi s bolesnicama s koncentracijom HER2/ECD većom ili jednakom 7,7 ng/ml (13,5 mjeseci) nakon dvogodišnjeg praćenja. Razlika između navedenih skupina nije bila statistički značajna (Log-rank p=0,369) zbog premalog uzorka i/ili prekratkog praćenja. Izostanak statističke značajnosti je razumljiv jer istraživanje nije u početku bilo niti osmišljeno kao istraživanje dovoljne statističke snage za procjenu razlike u ukupnom preživljenju, no zbog jasnog trenda razlike u preživljenju moguće je da će se daljnjim praćenjem bolesnica uključenih u istraživanje postići statistički značajna razlika. Praćenje



bolesnica je još uvijek u tijeku te ćemo izvijestiti o razlici nakon medijana praćenja od pet godina.

***U bolesnica s ranim rakom dojke otkrivenih tijekom rutinskog probira niti serumska niti histološka HER2 pozitivnost nisu povezane s kliničkim stadijem bolesti.***

Rutinski mamografski probir se pokazao dobrim za prepoznavanje bolesnica u najranijim kliničkim stadijima bolesti kao najbolja mjera sekundarne prevencije raka dojke, što posljedično dovodi do porasta ukupnog preživljenja. Na klinički stadij bolesti zasebno utječu zahvaćenost pazušnih limfnih čvorova (koja je najvažniji prognostički čimbenik raka dojke) i veličina primarnog tumora, dok su svi ostali epidemiološki, histološki i molekularni čimbenici rizika značajni za uočavanje bolesnica visokog rizika među bolesnicama s niskim kliničkim stadijem bolesti, kako bi se planiralo adekvatno liječenje. Izostanak korelacije serumske HER2/ECD i tkivne HER2/neu pozitivnosti s kliničkim stadijem bolesti se može jednostavno objasniti upravo činjenicom da su bolesnice otkrivene tijekom rutinskog probira raka dojke, što je omogućilo njihovo otkrivanje u najranijim mogućim kliničkim stadijima bolesti, te je samim time u bolesnica pronađen čitav spektar primarnih tumora različitih histoloških osobina koji nemaju nužno veze s veličinom i lokoregionalnom diseminacijom bolesti.

Sukladno rezultatima ovog istraživanja, definitivno možemo reći da je serumska koncentracija HER2/ECD u zdravih žena i bolesnica s ranim rakom dojke različita. Međutim, granična vrijednost treba biti niža od granične vrijednosti za bolesnice s metastatskom ili lokalno uznapredovalom bolešću. Pomicanjem granične vrijednosti na 7,7 ng/ml, test dobija i dobru dijagnostičku vrijednost, čime serumska koncentracija HER2/ECD može postati i dio složenog mozaika procjene potrebe adjuvantnog liječenja bolesnica s ranim rakom dojke. Serumska koncentracija HER2/ECD nije odrednica histološke pozitivnosti, već zaseban rizični čimbenik lošije prognoze koji je povezan s ostalim histološkim rizičnim čimbenicima lošijeg preživljenja. Povezanost serumske HER2 pozitivnosti s hormonskom ovisnošću tumora dojke je predmet brojnih istraživanja koja su u tijeku.

## 7. ZAKLJUČAK

Serumska koncentracija HER2/ECD  $\geq 7,7$  ng/ml u trenutku postavljanja dijagnoze raka dojke u kliničkom stadiju I ili II sugerira lošiju prognozu, s obzirom da je njezina pozitivnost podudarna s ostalim poznatim čimbenicima rizika.

Nadalje, moguće je da određivanje serumske koncentracije HER2/ECD ima i dijagnostičku vrijednost u žena sa suspektnim promjenama ranog stadija otkrivenim rutinskim probirom.

Serumska koncentracija HER2/ECD zaseban je čimbenik rizika u bolesnica s ranim rakom dojke i ne treba se koristiti kao mjerilo histološke HER2/neu pozitivnosti.

Korelaciju serumske koncentracije HER2/ECD sa statusom hormonskih receptora treba ispitati u bolesnica s metastatskom bolešću biopsijama metastaza, s obzirom da može imati implikacije na daljnji tijek liječenja.

Neophodno je razjasniti interakciju signalizacije između HER2 receptora i hormonskih receptora.

Potrebno je dodatno evaluirati prognostički značaj serumske koncentracije HER2/ECD u bolesnica s ranim rakom dojke, ali koristeći graničnu vrijednost od 7,7 ng/ml u bolesnica s karcinomom kliničkog stadija I i II.

## 8. SAŽETAK

### *Prikaz problema*

Pojačana ekspresija HER2 receptora je dobro poznat rizični čimbenik lošije prognoze u bolesnica s metastatskim i lokaliziranim rakom dojke. HER2 pozitivnost se može odrediti iz tumorskog tkiva imunohistokemijskim bojenjem ili fluorescentnom in situ hibridizacijom, ili iz seruma mjerenjem koncentracije vanstanične domene HER2 receptora. Serumna koncentracija HER2/ECD dobro korelira s lošijom prognozom u bolesnica s metastatskom i lokalno uznapredovalom bolešću (klinički stadij III) ukoliko je izmjerena koncentracija iznad 15 ng/ml, ali ne postoje konzistentni podaci za bolesnice s lokaliziranim tumorima kliničkog stadija I i II.

### *Dizajn istraživanja i rezultati*

U istraživanje je uključena 41 bolesnica s rakom dojke kliničkog stadija I i II, te 52 zdrave žene odgovarajućih demografskih osobina. Serumna koncentracija HER2/ECD određena je prije kirurškog zahvata i korelirana s histološkom izraženošću HER2/neu, proliferacijskim indeksom Ki67, statusom hormonskih receptora i kliničkim stadijem bolesti, te uspoređena sa serumskom koncentracijom u zdravih kontrola.

Srednja koncentracija HER2/ECD u bolesnica bila je 8,62 ng/ml, u kontrola 5,78 ng/ml, a razlika je bila statistički značajna ( $p=0,000061$ ). Kao najbolja „cut-off“ vrijednost izračunata je koncentracija od 7,7 ng/ml, s osjetljivošću od 76,92% i specifičnošću od 72,92%. Pozitivna prediktivna vrijednost testa bila je 69,77%, a negativna prediktivna vrijednost testa 79,55%, sa 74,71% ispravno svrstanih bolesnica. Serumna koncentracija HER2/ECD pozitivno je korelirala sa statusom hormonskih receptora, dok nije uočena korelacija s histološkom ekspresijom HER2/neu.

### *Zaključak*

Serumska koncentracija HER2/ECD od  $\geq 7,7$  ng/ml možda ima vrijednost u dijagnostici raka dojke kliničkog stadija I i II. Zaseban je loš prognostički čimbenik kod bolesnica s lokaliziranim rakom dojke i ne treba se koristiti kao mjerilo histološke HER2 pozitivnosti. Potrebno je dodatno istražiti korelaciju s ekspresijom hormonskih

receptora, kao i povezanost unutarstanične signalizacije hormonskih i HER2 receptora, obzirom da može imati terapijske implikacije.

### **8.1 Ključne riječi**

Rak dojke, HER2/ECD, tumorski biljezi.

## 9. SUMMARY

### *Scope of the problem*

HER2 overexpression is well established risk factor of worse prognosis in metastatic and early breast cancer. HER2 positivity can be determined from tumor tissue by immunohistochemical staining or by fluorescent in situ hybridization, or from serum by measuring concentration of HER2 receptor extracellular domain (HER2/ECD). HER2/ECD correlates well with worse prognosis in metastatic and locally advanced (stage III) disease if serum concentration is  $>15$  ng/ml, but there is no consistent data for patients with early breast cancer.

### *Study design and results*

41 patients with stage I and II breast cancer and 52 healthy controls were included into the study. HER2/ECD was determined before surgery and correlated with HER2/neu overexpression, Ki67, hormone receptor status and disease stage, and compared with value in healthy controls. Mean serum HER2/ECD concentration in patients was 8.62 ng/ml and 5.78 ng/ml in controls, and the difference was statistically significant ( $p=0.000061$ ). The best diagnostic cut-off value was 7.7 ng/ml, with 76.92% sensitivity and 72.92% specificity. Positive predictive value of the test was 69.77% and negative predictive value was 79.55%, with 74.71% of patients correctly classified. Serum HER2/ECD correlated with hormone receptors status, and no correlation with histological overexpression has been observed.

### *Conclusion*

Serum HER2/ECD concentration of  $\geq 7.7$  ng/ml has possible diagnostic value in stage I and II breast cancer. It should not be used as a determinant of HER2 positivity. Prognostic significance of HER2/ECD in early breast cancer, its correlation with hormone receptor status, and interconnection between hormone receptors and HER2 receptor signaling should be further analyzed, since it may have therapeutic implications.

## **9.1 Keywords**

Breast cancer, HER2 ECD, tumor markers

## 10. LITERATURA

---

<sup>i</sup> Cancer Facts and Figures. American Cancer Society 2008, posljednji puta pristupljeno 29.6.2011., dostupno na

<http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf>.

<sup>ii</sup> Registar za rak. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2008, posljednji puta pristupljeno 29.6.2011., dostupno na <http://www.hzjz.hr/rak/novo.htm>.

<sup>iii</sup> Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985;312(3):146-151.

<sup>iv</sup> Haberthur F, Feichter GE, Torhorst JK. Sarcoma of the breast: what is the contribution of immunohistochemistry and flow cytometry? *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1993;53(11):811-813.

<sup>v</sup> Burstein HJ, Harris JR, Morrow M. Malignant tumors of the breast. U: De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, ur. *Cancer: principles and practice of oncology*. 8. izdanje. Philadelphia: Lippincot, Williams and Wilkins 2008:1606-1654.

<sup>vi</sup> Devilee P, Tavassoli FA. World Health Organization: Tumours of the breast and female genital organs. Oxford (Oxfordshire), Oxford University Press 2003. ISBN 92-832-2412-4.

<sup>vii</sup> Elston, CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19(5):403-410.

<sup>viii</sup> Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):966-978.

<sup>ix</sup> Malzahn K, Mitze M, Thoenes M, Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch* 1998;433(2):119-129.

<sup>x</sup> Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000;406(6797):747-752.

- 
- <sup>xi</sup> Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Ac Sci USA* 2001;98(19):10869-10874.
- <sup>xii</sup> Grushko TA, Blackwood MA, Schumm PL, Hagos FG, Adeyanju MO, Feldman MD. Molecular-cytogenetic analysis of HER2/neu gene in BRCA1-associated breast cancer. *Cancer Res* 2002;62(5):1481-1488.
- <sup>xiii</sup> Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11(14):5175-5180.
- <sup>xiv</sup> 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(10):1321-1328.
- <sup>xv</sup> Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63(1):181-187.
- <sup>xvi</sup> Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison to nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1652-8.
- <sup>xvii</sup> Jatoi I, Hilsenbeck SG, Clark GM, Osborne CK. Significance of axillary lymph node metastasis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(8):2334-2340.
- <sup>xviii</sup> Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;366(9503):2087-2106.
- <sup>xix</sup> Edge SB, Byrd DR, Compton CC. *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th Edition. New York: Springer; 2010.
- <sup>xx</sup> McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992;326(26):1756-1761.
- <sup>xxi</sup> 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(1):10-26.
- <sup>xxii</sup> Esteban JM, Felder B, Ahn C, Simpson JF, Battifora H, Shively JE. Prognostic relevance of carcinoembryonic antigen and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Cancer* 1994;74(5):1575-1583.



- 
- <sup>xxiii</sup> Gaffney EV, Halpin DP, Blakemore WS. Relationship between low estrogen receptor values and other prognostic factors in primary breast tumors. *Surgery* 1995;117(3):241-246.
- <sup>xxiv</sup> Rosen PR, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1989;7(3):355-366.
- <sup>xxv</sup> Thurman SA, Schnitt SJ, Connolly JL, Gelman R, Silver B, Harris JR, i dr. Outcome after breast-conserving therapy for patients with stage I or II mucinous, medullary, or tubular breast carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59(1):152-159.
- <sup>xxvi</sup> Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, Vincent-Salomon A, Beuzeboc P, Dorval T, i dr. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer* 1996;77(1):113-120.
- <sup>xxvii</sup> Truong PT, Yong CM, Abnousi F, Lee J, Kader HA, Hayashi A, i dr. Lymphovascular invasion is associated with reduced locoregional control and survival in women with node-negative breast cancer treated with mastectomy and systemic therapy. *J Am Coll Surg* 2005;200(6):912-921.
- <sup>xxviii</sup> 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* 2010;17(4):269-275.
- <sup>xxix</sup> van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, i dr. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(25):1999-2009.
- <sup>xxx</sup> Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, i dr. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351(27):2817-2826.
- <sup>xxxi</sup> Estourgie SH, Nieweg OE, Olmos RA, Rutgers EJ, Kroon BB. Lymphatic drainage patterns from the breast. *Ann Surg* 2004;239(2):232-237.
- <sup>xxxii</sup> Vorobiof DA, Sitas F, Vorobiof G. Breast cancer incidence in South Africa. *J Clin Oncol* 2001;19(18 Suppl):125S-127S.

---

<sup>xxxiii</sup> Hendrick RE, Smith RA, Rutledge JH, i dr. Benefits of screening mammography in women aged 40–49; a new meta-analysis of randomized controlled trials. *Monogr Natl Cancer Inst* 1997;22:87.

<sup>xxxiv</sup> Brenner RJ. False-negative mammograms. Medical, legal, and risk management implications. *Radiol Clin North Am* (2000) 38:741–57.

<sup>xxxv</sup> Beam CA, Layde PM, Sullivan DC. Variability in the interpretation of screening mammograms by US radiologists. Findings from a national sample. *Arch Intern Med* (1996) 156:209–13.

<sup>xxxvi</sup> Taplin S, Rutter C, Elmore J, Seger D, White D, Brenner R. Accuracy of screening mammography using single versus independent double interpretation. *AJR Am J Roentgenol* (2000) 174:1257–62.

<sup>xxxvii</sup> Gilbert FJ, Astley SM, Gillan MG, Agbaje OF, i dr. Single reading with computer-aided detection for screening mammography. *N Engl J Med*. 2008;359:1675-84.

<sup>xxxviii</sup> Cady B. Breast cancer: An introduction to the problem. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2002 Mar;29(1):117-22, vii.

<sup>xxxix</sup> Krajina Z, Badžek S, Grah J. Da li je adjuvantna radioterapija uvijek potrebna nakon poštedne operacije raka dojke – s posebnim osvrtom na intraoperacijsku radioterapiju. U *Bolesti dojke: zbornik radova XII. znanstvenog sastanka "Bolesti dojke" održanog 3.10.2002. u Zagrebu*. Zagreb: Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Razred za medicinske znanosti, Odbor za tumore, 2002, 91-106.

<sup>xl</sup> Zašto i kako kombinirati adjuvantnu kemoterapiju i radioterapiju u bolesnica s karcinomom dojke? U *Bolesti dojke: zbornik radova XIV. znanstvenog sastanka "Bolesti dojke" održanog 3.10.2002. u Zagrebu*. Zagreb: Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Razred za medicinske znanosti, Odbor za tumore, 2004.

<sup>xli</sup> Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993, 7:812-821.

<sup>xlii</sup> Guo Y, Yang K, Harwalkar J, Nye JM, Mason DR, Garrett MD, Hitomi M, Stacey DW. Phosphorylation of cyclin D1 at Thr 286 during S phase leads to its proteasomal degradation and allows efficient DNA synthesis. *Oncogene* 2005, 24:2599-2612.

---

<sup>xliii</sup> Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; 31: 99–109.

<sup>xliv</sup> Clevers H. Wnt breakers in colon cancer. *Cancer Cell* 2004;5:5-6.

<sup>xlvi</sup> Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 2003;116:1175-86.

<sup>xlvi</sup> Ilyas M. Wnt signaling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol* 2005;205:130-44.

<sup>xlvi</sup> Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5522–7.

<sup>xlviii</sup> Wong NACS, Pignatelli M.  $\beta$ -catenin-A linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 2002;160:389–401.

<sup>xlix</sup> Howe LR, Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg AJ, Brown AMC.

Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1999;59:1572–7.

<sup>l</sup> Levy L, Neuveut C, Renard CA, Charneau P, Branchereau S, Gauthier F, Van Nhieu JT, Cherqui D, Petit-Bertron AF, Mathieu D, Buendia MA. Transcriptional activation of interleukin-8 by  $\beta$ -catenin-Tcf4. *J Biol Chem* 2002;277:42386–93.

<sup>li</sup> Rockman SP, Currie SA, Ciavarella M, Vincan E, Dow C, Thomas RJS, Phillips WA. Id2 is a target of the  $\beta$ -catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma. *J Biol Chem* 2001;276:45113–9.

<sup>lii</sup> Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. Target genes of  $\beta$ -catenin/T cell factor/lymphoid-enhancer-factor signalling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1603–8.

<sup>liii</sup> Willert J, Epping M, Pollack JR, Brown PO, Nusse R. A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biol* 2002;2:8.

<sup>liv</sup> Dihlmann S, Kloor M, Fallsehr C, von Knebel Doeberitz M. Regulation of AKT1 expression by  $\beta$ -catenin/Tcf/Lef signaling in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2005;26:1503–12.

- 
- <sup>lv</sup> He T-C, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPAR $\gamma$  is an APC-regulated target of Non-steroidal antiinflammatory drugs. *Cell* 1999;99:335–45.
- <sup>lvi</sup> Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, Feinstein E, Einat P, Ben-Ze'ev A. Nr-CAM is a target gene of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev* 2002;16:2058–72.
- <sup>lvii</sup> Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, Ben-Ze'ev A. L1, a novel target of  $\beta$ -catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* 2005;168:633–42.
- <sup>lviii</sup> Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PH, Birchmeier W, Behrens J. Negative feedback loop of wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 2002;22:1184–93.
- <sup>lix</sup> Boon EMJ, van der Neut R, van de Wetering M, Clevers H, Pals ST. Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase Met in colorectal cancer. *Cancer Res* 2002;62:5126–8.
- <sup>lx</sup> Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H.  $\beta$ -catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/Ephrin B. *Cell* 2002;111:251–63.
- <sup>lxi</sup> Shtutman M, Zhurinsky J, Oren M, Levina E, Ben-Ze'ev A. PML is a target gene of  $\beta$ -catenin and plakoglobin, and coactivates  $\beta$ -catenin-mediated transcription. *Cancer Res* 2002;62:5947–54.
- <sup>lxii</sup> Lin X, Perrimon N: Role of heparan sulfate proteoglycans in cell-cell signaling in *Drosophila*. *Matrix Biol* 2000; 19: 303–307.
- <sup>lxiii</sup> Ryo A, Nakamura M, Wulf G, Liou YC, Lu KP: Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 793–801.
- <sup>lxiv</sup> Jonsson M, Borg A, Nilbert M, Andersson T: Involvement of adenomatous polyposis coli (APC)/beta-catenin signalling in human breast cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 242–248.

- 
- <sup>lxv</sup> Abraham SC, Reynolds C, Lee JH, Montgomery EA, Baisden BL, Krasinskas AM, Wu TT: Fibromatosis of the breast and mutations involving the APC/beta-catenin pathway. *Hum Pathol* 2002; 33: 39–46.
- <sup>lxvi</sup> Roura S, Miravet S, Piedra J, García de Herreros A, Duñach M. Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1999;274:36734–40.
- <sup>lxvii</sup> Yin X, Giap C, Lazo JS, Prochownik EV (2003) Low molecular weight inhibitors of Myc/Max interaction and function. *Oncogene* 22:6151–6159
- <sup>lxviii</sup> Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005;9(1):59-71
- <sup>lxix</sup> Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Com* 2005;331:851–8.
- <sup>lxx</sup> Yu J, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B. Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14517–22.
- <sup>lxxi</sup> Roperch J-P, Lethrone F, Prieur S, Piouffre L, Israeli D, Tuynder M, Nemani M, Pasturaud P, Gendron M-C, Dausset J, Oren M, Amson RB, Telerman A. SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: identification of common effectors with p53 and p21Waf1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8070–3.
- <sup>lxxii</sup> Amson RB, Nemani M, Roperch JP, Israeli D, Bougueleret L, LeGall I, Medhioub M, Linares-Cruz G, Lethrone F, Pasturaud P, Piouffre L, Prieur S, Susini L, Alvaro V, Millasseau P, Guidicelli C, Bui H, Massart C, Cazes L, Dufour F, Bruzzoni-Giovanelli H, Owadi H, Hennion C, Charpak G, Dausset J, Calvo F, Oren M, Cohen D, Telerman A. Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3953–7.
- <sup>lxxiii</sup> Kohn KW, Pommier Y. Molecular interaction map of the p53 and mdm2 logic elements, which control the off-on switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Com* 2005;331:816–27.
- <sup>lxxiv</sup> Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N. Siah-1 mediates a novel  $\beta$ -catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell* 2001;7:927–36.

- 
- <sup>lxxv</sup> Børresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat.* 2003 Mar;21(3):292-300.
- <sup>lxxvi</sup> Nakayama K, Ronai Z. Siah new players in the cellular response to hypoxia. *Cell Cycle* 2004;3:1345–7.
- <sup>lxxvii</sup> Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 2004;9(Suppl 5):10-7.
- <sup>lxxviii</sup> Badzek S, Curić Z, Krajina Z, Plestina S, Golubić-Cepulić B, Radman I. Treatment of cancer-related anemia. *Coll Antropol.* 2008 Jun;32(2):615-22.
- <sup>lxxix</sup> Deng J, Miller SA, Wang H-Y, Xia W, Wen Y, Zhou BP, Li Y, Lin S-Y, Hung M-C.  $\beta$ -catenin interacts with and inhibits NF- $\kappa$ B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell* 2002;2:323–34.
- <sup>lxxx</sup> Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, Kuro-O M, Karlan B, Kaufman B, Koeffler HP, Rubinek T. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene.* 2008 Sep 1. [Epub ahead of print], dostupno na [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762812?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed\\_ResultsPanel.Pubmed\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762812?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum), posljednji pristup 29.6.2011.
- <sup>lxxxix</sup> Labbé E, Letamendia A, Attiasano L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signalling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8358–63.

- 
- <sup>lxxxii</sup> Palacios J, Robles-Frías MJ, Castilla MA, López-García MA, Benítez J. The molecular pathology of hereditary breast cancer. *Pathobiology*. 2008;75(2):85-94. Epub 2008 Jun 10.
- <sup>lxxxiii</sup> Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet*. 2008 Aug;124(1):31-42. Epub 2008 Jun 25.
- <sup>lxxxiv</sup> Ogba N, Chaplin LJ, Doughman YQ, Fujinaga K, Montano MM. HEXIM1 regulates 17beta-estradiol/estrogen receptor-alpha-mediated expression of cyclin D1 in mammary cells via modulation of P-TEFb. *Cancer Res*. 2008 Sep 1;68(17):7015-24.
- <sup>lxxxv</sup> Luna-Moré S, Weil B, Bautista D, Garrido E, Florez P, Martínez C. Bcl-2 protein in normal, hyperplastic and neoplastic breast tissues. A metabolite of the putative stem-cell subpopulation of the mammary gland. *Histol Histopathol*. 2004 Apr;19(2):457-63.
- <sup>lxxxvi</sup> Sunami E, Shinozaki M, Sim MS, Nguyen SL, Vu AT, Giuliano AE, Hoon DS. Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors. *Breast Cancer Res*. 2008;10(3):R46. Epub 2008 May 16.
- <sup>lxxxvii</sup> Lange CA, Sartorius CA, Abdel-Hafiz H, Spillman MA, Horwitz KB, Jacobsen BM. Progesterone receptor action: translating studies in breast cancer models to clinical insights. *Adv Exp Med Biol*. 2008;630:94-111.
- <sup>lxxxviii</sup> van Setten G, Schultz G. Transforming growth factor-alpha is a constant component of human tear fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994;232:523-6.
- <sup>lxxxix</sup> Michalsky MP, Lara-Marquez M, Chun L, Besner GE. Heparinbinding EGF-like growth factor is present in human amniotic fluid and breast milk. *J Pediatr Surg* 2002;37:1-6.
- <sup>xc</sup> Kamiya Y, Ohmura E, Murakami H, Shizume K, Tsushima T, Demura H, i dr. Transforming growth factor-alpha activity in effusions: comparison of radioimmunoassay and radioreceptorassay. *Life Sci* 1993;52:1381-6.
- <sup>xci</sup> Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *New Engl J Med* 2005;353:1652-4.

- 
- <sup>xcii</sup> Kurbel S. Are HER1/EGFR interactions with ligand free HER2 related to the effects of HER1-targeted drugs? *Med Hypotheses*. 2006;67(6):1355-7. Epub 2006 Aug 4.
- <sup>xciii</sup> Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235(4785):177–82.
- <sup>xciv</sup> Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Carney WP. The c-erbB-2 protein in oncogenesis: molecular structure to molecular epidemiology. *Crit Rev Oncog*. 1994;5:313-329.
- <sup>xcv</sup> Brandt-Rauf PW, Monaco R, Pincus MR. Conformation of the transmembrane domain of the epidermal growth factor receptor. *J Protein Chem* 1994;13(2):227–31.
- <sup>xcvi</sup> Gullick WJ, Bottomley AC, Lofts FJ, et al. Three dimensional structure of the transmembrane region of the proto-oncogenic and oncogenic forms of the neu protein. *EMBO J* 1992;11(1):43–8.
- <sup>xcvii</sup> Guerin M, Gabillot M, Mathieu MC, i dr. Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and non-inflammatory breast cancer: prognostic significance. *Int J Cancer* 1989;43(2):201–8.
- <sup>xcviii</sup> Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell* 1982;28(4):865–71.
- <sup>xcix</sup> Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986;319(6050):226–30.
- <sup>c</sup> Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, i dr. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985;230(4730):1132–9.
- <sup>ci</sup> Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res*. 1999;59:1196-1201.
- <sup>cii</sup> Fontana X, Ferrari P, Namer M i dr. C-erb-B2 gene amplification and serum level of c-erb-B2 oncoprotein at primary breast cancer diagnosis. *Anticancer Res* 1994;14:2099-2104.
- <sup>ciii</sup> Schwartz MK, Smith C, Schwartz DC, Dnistrian A, Neiman I. Monitoring therapy by serum HER2/neu. *Int J Biol Markers* 2000;15:324-329.



- 
- <sup>civ</sup> Esteva FJ, Valero V, Booser D i dr. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:1800-1808.
- <sup>cv</sup> Wong W, Bajamonde A, Nelson B, Carney WP, Mass R. Baseline serum HER2 (sHER2) levels in the pivotal Herceptin breast cancer trial: a comparison of 2 ELISA methods. [Abstract 297] *Am Soc Clin Oncol* 2000.
- <sup>cvi</sup> Esteva FJ, Cheli CD, Fritsche H, i dr. Clinical utility of serum HER2/neu in monitoring and prediction of progression-free survival in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. *Breast Cancer Res.* 2005;7:R436–443.
- <sup>cvii</sup> Kostler WJ, Schwab B, Singer CF, i dr. Monitoring of serum Her-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:1618–1624.
- <sup>cviii</sup> Muller V, Witzel I, Luck HJ, i dr. Prognostic and predictive impact of the HER-2/neu extracellular domain (ECD) in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;86:9–18.
- <sup>cix</sup> Rouzier R, Pusztai L, Delaloge S i dr. Normograms to predict pathologic complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8331-8339.
- <sup>cx</sup> Guarneri V, Broglio K, Kau SW i dr. Prognostic Value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. *J Clin Oncol* 2006;24:1037-1044.
- <sup>cxii</sup> Amat S, Abrial C, Penault-Llorca F i dr. High prognostic significance of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study in 710 patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94:255-63.
- <sup>cxiii</sup> Mehta RR, McDermott JH, Hieken TJ, i dr. Plasma c-erbB-2 levels in breast cancer patients: prognostic significance in predicting response to chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998;16(7):2409–16.
- <sup>cxiii</sup> Saghatchian M, Guepratte S, Floiras JL, Paternostre B, Pichon MF. Correlation of serum erbB-2 concentration with initial clinico-biological presentation and patients' outcome in primary breast cancer. *Proc ASCO* 2001;20:62b.

- 
- <sup>cxiv</sup> Hayes DF, Yamauchi H, Broadwater G, i dr. Circulating HER-2/erbB-2/c-neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 8662. *Clin Cancer Res* 2001;7(9):2703–11.
- <sup>cxv</sup> Isola JJ, Holli K, Oksa H, Teramoto Y, Kallioniemi OP. Elevated erbB-2 oncoprotein levels in preoperative and follow-up serum samples define an aggressive disease course in patients with breast cancer. *Cancer* 1994;73(3):652–8.
- <sup>cxvi</sup> Molina R, Jo J, Filella X, i dr. C-erbB-2, CEA and CA 15.3 serum levels in the early diagnosis of recurrence of breast cancer patients. *Anticancer Res* 1999;19(4A):2551–5.
- <sup>cxvii</sup> Molina R, Jo J, Zanon G, i dr. Utility of C-erbB-2 in tissue and in serum in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients: comparison with carcinoembryonic antigen and CA 15.3. *Br J Cancer* 1996;74(7):1126–31.
- <sup>cxviii</sup> Colomer R, Montero S, Lluch A, i dr. Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2356–62.
- <sup>cxix</sup> Lüftner D, Henschke P, Flath B, Akrivakis C, Schnabel S, Prinz B, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K. Serum HER-2/neu as a prediction and monitoring parameter in a phase II study with weekly paclitaxel in metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* 2004 Mar-Apr;24(2B):895-906.
- <sup>cxx</sup> Harris LN, Liotcheva V, Broadwater G, i dr. Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1698–706.
- <sup>cxxi</sup> Lipton A, Ali SM, Leitzel K, i dr. Elevated serum her-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(6):1467–72.
- <sup>cxxii</sup> Cook GB, Neaman IE, Goldblatt JL, i dr. Clinical utility of serum HER-2/neu testing on the Bayer Immuno 1 automated system in breast cancer. *Anticancer Res* 2001;21(2B):1465–70.
- <sup>cxxiii</sup> Esteva FJ, Valero V, Booser D, i dr. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(7):1800–8.

- 
- <sup>cxxiv</sup> Mazouni C, Hall A, Broglio K, Fritsche H, Andre F, Esteva FJ, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Pusztai L, Cristofanilli M. Kinetics of serum HER-2/neu changes in patients with positive primary breast cancer after initiation of primary chemotherapy. *Cancer* 2007;109(3):496-501.
- <sup>cxxv</sup> Lüftner D, Lüke C, Possinger K. Serum HER-2/neu in the management of breast cancer patients. *Clin Biochem.* 2003 Jun;36(4):233-40.
- <sup>cxxvi</sup> Edgerton SM, Moore D 2nd, Merkel D, Thor AD. erbB-2 (HER-2) and breast cancer progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2003 Sep;11(3):214-21.
- <sup>cxxvii</sup> Braun S, Schlimok G, Heumos I, i dr. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* 2001;61(5):1890–5.
- <sup>cxxviii</sup> Olivotto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, Speers CH, Coldman AJ, Norris BD, et al. Population-Based Validation of the Prognostic Model ADJUVANT! for Early Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(12):2716-2725.
- <sup>cxxix</sup> Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, i dr. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(16):1233-1241.
- <sup>cxxx</sup> Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, i dr. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(16):1227-1232.
- <sup>cxxxi</sup> NCCN Breast Cancer Panel Members Version 2.2011 NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer Version 2. 2011, dostupno na [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp).
- <sup>cxxxii</sup> Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, i dr. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 2003;349(6):546-553.
- <sup>cxxxiii</sup> Hughes KS, Schnaper LA, Berry D, Cirrincione C, McCormick B, Shank B, i dr. Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women 70 years of age or older with early breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351(10):971-977.
- <sup>cxxxiv</sup> Kataja V, Castiglione M. Primary breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;20 Suppl 4:10-14.

- 
- <sup>cxxxv</sup> Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009;20(8):1319-1329.
- <sup>cxxxvi</sup> Recht A i dr. Sequencing of irradiation and chemotherapy for early-stage breast cancer. *Oncology* 1994;8:19-28.
- <sup>cxxxvii</sup> Recht A i dr. The sequencing of chemotherapy and radiation therapy after conservative surgery for early stage breast cancer. *JCRT. N Engl J Med* 1996;334:1356-1361.
- <sup>cxxxviii</sup> Rose MA i dr. Premenopausal breast cancer patients treated with conservative surgery, radiotherapy and adjuvant chemotherapy have a low risk of local failure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;17:711-717.
- <sup>cxxxix</sup> 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(9472):1687-1717.
- <sup>cxl</sup> Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirincione CT, Goldstein LJ, Martino S, i dr. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(6):976-983.
- <sup>cxli</sup> Mamounas EP, Bryant J, Lembersky B, Fehrenbacher L, Sedlacek SM, Fisher B, i dr. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *J Clin Oncol* 2005;23(16):3686-3696.
- <sup>cxlii</sup> Sparano JA, Wang M, Martino S, Jones V, Perez EA, Saphner T, et al. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 2008;358(16):1663-1671.
- <sup>cxliii</sup> Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, i dr. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1673-1684.
- <sup>cxliv</sup> Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, i dr. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354(8):809-820.

- 
- <sup>cxlv</sup> Brewster AM, Hortobagyi GN, Broglio KR, Kau SW, Santa-Maria CA, Arun B, i dr. Residual risk of breast cancer recurrence 5 years after adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(16):1179-1783.
- <sup>cxlvi</sup> Sant M, Allemani C, Capocaccia R, Hakulinen T, Aareleid T, Coebergh JW, i dr. Stage at diagnosis is a key explanation of differences in breast cancer survival across Europe. *Int J Cancer* 2003;106(3):416-422.
- <sup>cxlvii</sup> Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59(4):225-249.
- <sup>cxlviii</sup> Muss HB, Case LD, Richards F, 2nd, White DR, Cooper MR, Cruz JM, i dr. Interrupted versus continuous chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. The Piedmont Oncology Association. *N Engl J Med* 1991;325(19):1342-1348.
- <sup>cxlix</sup> Falkson G, Gelman RS, Pandya KJ, Osborne CK, Tormey D, Cummings FJ, i dr. Eastern Cooperative Oncology Group randomized trials of observation versus maintenance therapy for patients with metastatic breast cancer in complete remission following induction treatment. *J Clin Oncol* 1998;16(5):1669-1976.
- <sup>cl</sup> Carrick S, Parker S, Thornton CE, Ghersi D, Simes J, Wilcken N. Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2009(2):CD003372.
- <sup>cli</sup> Beslija S, Bonnetterre J, Burstein HJ, Cocquyt V, Gnant M, Heinemann V, i dr. Third consensus on medical treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2009;20(11):1771-1785.
- <sup>clii</sup> Cardoso F, Senkus-Konefka E, Fallowfield L, Costa A, Castiglione M. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 5:v15-19.
- <sup>cliii</sup> Zelek L, Barthier S, Riofrio M, Fizazi K, Rixe O, Delord JP, i dr. Weekly vinorelbine is an effective palliative regimen after failure with anthracyclines and taxanes in metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2001;92(9):2267-2272.
- <sup>cliv</sup> Vassilomanolakis M, Koumakis G, Demiri M, Missitzis J, Barbounis V, Efremidis AP. Vinorelbine and cisplatin for metastatic breast cancer: a salvage regimen in patients progressing after docetaxel and anthracycline treatment. *Cancer Invest* 2003;21(4):497-504.

- 
- <sup>clv</sup> Massacesi C, La Cesa A, Marcucci F, Pilone A, Rocchi MB, Zeponi L, i dr. Capecitabine and mitomycin C is an effective combination for anthracycline- and taxane-resistant metastatic breast cancer. *Oncology* 2006;70(4):294-300.
- <sup>clvi</sup> Maisano R, Caristi N, Mare M, Raffaele M, Iorfida M, Mafodda A, i dr. Mitomycin C plus capecitabine (mixe) in anthracycline- and taxane-pretreated metastatic breast cancer. A multicenter phase II study. *Anticancer Res* 2007;27(4C):2871-2875.
- <sup>clvii</sup> Benekli M, Yildiz R, Uner A, Er O, Yamac D, Alkis N, i dr. Gemcitabine plus capecitabine combination in metastatic breast cancer patients previously treated with anthracyclines and taxanes. *Oncology* 2007;72(5-6):308-313.
- <sup>clviii</sup> Oksuzoglu B, Abali H, Hayran M, Yildirim N, Budakoglu B, Zengin N. Capecitabine and cisplatin combination is an active and well-tolerated doublet in the treatment of metastatic breast carcinoma patients pretreated with anthracycline and taxanes. *Chemotherapy* 2008;54(5):352-356.
- <sup>clix</sup> Onyenadum A, Gogas H, Kosmidis P, Aravantinos G, Bafaloukos D, Bacoyiannis H, i dr. Mitoxantrone plus gemcitabine in pretreated patients with metastatic breast cancer. *J Chemother* 2006;18(2):192-198.
- <sup>clx</sup> Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, i dr. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783-792.
- <sup>clxi</sup> von Minckwitz G, du Bois A, Schmidt M, Maass N, Cufer T, de Jongh FE, i dr. Trastuzumab beyond progression in human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer: a german breast group 26/breast international group 03-05 study. *J Clin Oncol* 2009;27(12):1999-2006.
- <sup>clxii</sup> Sorensen BS, Mortensen LS, Andersen J, Nexø E. Circulating HER2 DNA after trastuzumab treatment predicts survival and response in breast cancer. *Anticancer Res* 2010;30(6):2463-8.
- <sup>clxiii</sup> Pearce E, Tregouet DA, Samnegård A, i dr. Haplotype effect of the matrix metalloproteinase-1 gene on risk of myocardial infarction. *Circ Res* 2005;97(10):1070-6.
- <sup>clxiv</sup> Fornier MN, Seidman AD, Schwartz MK, i dr. Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate. *Ann Oncol* 2005;16:234-239.

- 
- <sup>clxv</sup> Ludovini V, Gori S, Colozza M, i dr. Evaluation of serum HER2 extracellular domain in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival. *Annals of Oncology*. 2008;19:883-890.
- <sup>clxvi</sup> Schiff R, Massarweh S, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Kent Osborne C. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res*. 2004;10(1 Pt 2):331S-6S.
- <sup>clxvii</sup> Arpino G, Weiss H, Lee AV, i dr. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(17):1254-1261.
- <sup>clxviii</sup> Kent Osborne C, Shou J, Massarweh S, Schiff R. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(2 Pt 2):865s-70s.
- <sup>clxix</sup> Bartsch R, Wenzel C, Altorjai G, i dr. Her2 and progesterone receptor status are not predictive of response to fulvestrant treatment. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4435.
- <sup>clxx</sup> Finn RS, Press MF, Dering J, i dr. Estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and epidermal growth factor receptor expression and benefit from lapatinib in a randomized trial of paclitaxel with lapatinib or placebo as first-line treatment in HER2-negative or unknown metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(24):3908-3915.
- <sup>clxxi</sup> van de Ven S, Smit VTHBM, Dekker TJA, Nortier JWR, Kroep JR. Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Treat Rev [Internet]*, pristupljeno 26.12.2010. Dostupno na:  
[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6WC8-51S0D5W-1&\\_user=4758629&\\_coverDate=12%2F21%2F2010&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_origin=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&\\_view=c&\\_acct=C000050661&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=4758629&md5=46690b60516ee82d72473534eb9f589f&searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WC8-51S0D5W-1&_user=4758629&_coverDate=12%2F21%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000050661&_version=1&_urlVersion=0&_userid=4758629&md5=46690b60516ee82d72473534eb9f589f&searchtype=a).

---

## 11. ŽIVOTOPIS

Saša Badžek rođen je 10. studenog 1976. godine u Osijeku, gdje je 1994. godine završio Medicinsku školu, a 2000. godine diplomirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Studij medicine u Osijeku, s odličnim uspjehom. Za vrijeme akademskog obrazovanja pokazao je osobit interes za znanstveno-istraživačku i nastavnu djelatnost, te je bio demonstrator u Katedri za anatomiju i Katedri za patofiziologiju. Ujedno je bio tajnik lokalnog odbora Osijek međunarodne udruge studenata medicine te član Fakultetskog povjerenstva za znanstveno-istraživački rad. Dobitnik je Rektorove nagrade za izniman uspjeh na studiju, četiri međunarodne stipendije (stipendija vlade Južnog Tirola, Almae Matris Croaticae Alumni Quebec, Canadian-Croatian Congress i I medici di McGill Orchestra), te stipendije poglavarstva Grada Osijeka. Radio je u Odjelu za hitnu medicinu Montreal General Hospital, nakon čega je završio pripravnički staž pri Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, a nakon čega je obavio sekundarijat iz interne medicine u Sveučilišnoj klinici za endokrinologiju, dijabetes i



---

bolesti metabolizma Vuk Vrhovac u Zagrebu. Danas je zaposlen u Klinici za onkologiju KBC Zagreb, gdje radi kao specijalist interne medicine. Završio je stručni poslijediplomski studij Klinička onkologija te doktorski studij Biomedicina i zdravstvo pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.