

# Ekspresija autokrinog hormona rasta, receptora hormona rasta, plakoglobina i NEDD9 u duktalnom invazivnom karcinomu dojke s i bez metastaza

---

Štajduhar, Emil

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:109527>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Štajduhar, Emil (2012) *Ekspresija autokrinog hormona rasta, receptora hormona rasta, plakoglobina i NEDD9 u duktalnom invazivnom karcinomu dojke s i bez metastaza. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.***

<http://medlib.mef.hr/1633>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Emil Štajduhar**

**Ekspresija autokrinog hormona rasta,  
receptora hormona rasta, plakoglobina i  
NEDD9 u duktalnom invazivnom karcinomu  
dojke s i bez metastaza**

**DISERTACIJA**

**ZAGREB, 2012.**

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu.

Voditelj: Prof. dr. sci. Božo Krušlin

Zahvaljujem od sveg srca profesoru Boži Krušlinu na njegovoj svesrdnoj pomoći i vodstvu tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem od sveg srca profesoru Krešimiru Paveliću i dr Sandri Kraljević Pavelić na poticanju i korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem, također, od sveg srca kolegicama dr. Tanji Leniček i dr. Petri Radulović na pomoći u izradi ovog rada.

Rad posvećujem svojoj dragoj obitelji

*„Oni koji malo znaju zrače sigurnošću i samopouzdanjem,  
One koji puno znaju razdire sumnja“*

B. Russel

**POPIS KRATICA**

- LOH - *engl.* loss of heterozygosity  
HER2 - *engl.* human epidermal growth factor receptor 2  
MR - magnetska rezonancija  
PET- pozitron emisijska tomografija  
CT- kompjuterizirana tomografija  
NPI- Nottinghamski prognostički indeks  
ER - estrogenski receptori  
PR - progesteronski receptori  
NOS - *engl.* not otherwise specified  
ECM - ekstracelularni matriks  
MMP - matriks metaloproteinaze  
EMT - epitelijalno mezenhimalna tranzicija  
HR - hormon rasta  
RHR - receptor hormona rasta  
RT-PCR - *engl.* reverse transcription polymerase chain reaction  
HE - hemalaun eozin  
LSAB - vizualizacijski kit u imunohistokemijskoj analizi  
IGF I - *engl.* insulin like growth factor  
MET - mezenhimalno epitelijalna tranzicija  
DFC - *engl.* dense fibrillar components

# Sadržaj

## 1. UVOD

1.1. Epidemiologija karcinoma dojke .....	1
1.2. Čimbenici rizika karcinoma dojke .....	2
1.3. Etiološki čimbenici karcinoma dojke .....	2
1.4. Dijagnostički postupci u otkrivanju karcinoma dojke .....	3
1.5. Prognostički čimbenici karcinoma dojke .....	4
1.5.1. Histološki tip tumora .....	4
1.5.2. Stanje regionalnih limfnih čvorova .....	5
1.5.3. Histološki gradus tumora .....	5
1.5.4. Status hormonskih receptora .....	6
1.5.5. Status proteina HER2 .....	6
1.5.6. Ki-67 .....	7
1.5.7. Ostali prognostički čimbenici .....	8
1.6. Duktalni invazivni karcinom .....	9
1.7. Žlijezde dojke – stroma i epitel .....	10
1.8. Epitelijalno mezenhimalana tranzicija (EMT) .....	11
1.9. Međustanične veze .....	11
1.10. E-kadherin .....	12
1.11. Hormon rasta (HR).....	12
1.12. Receptor za hormon rasta (RHR).....	13
1.13. Plakoglobin (gama katenin) .....	14
1.14. NEDD9 .....	14
1.15. Metastaziranje .....	15

2. HIPOTEZA .....	17
-------------------	----

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	18
-------------------------------	----

4. MATERIJAL I METODE .....	19
-----------------------------	----

4.1. Materijal .....	19
4.2. Metode .....	20
4.2.1. Histološka analiza .....	20
4.2.2. Imunohistokemijska analiza .....	20
4.2.3. Statistička analiza .....	21

5. REZULTATI .....	22
--------------------	----

5.1. Statistička analiza rezultata .....	42
6. RASPRAVA .....	44
7. ZAKLJUČCI .....	49
8. SAŽETAK .....	51
9. SUMMARY .....	52
10. POPIS LITERATURE .....	53
11. ŽIVOTOPIS .....	61

# **1. UVOD**



## 1.1. Epidemiologija karcinoma dojke

Karcinom dojke najčešća je zloćudna bolest u žena, s učestalošću od oko 110 slučajeva na 100 000 žena godišnje. Stopa smrtnosti iznosi 24 slučaja na 100 000 žena godišnje, s tendencijom porasta. Procjenjuje se da se u svijetu godišnje otkrije oko milijun novih slučajeva raka dojke. U posljednjih tridesetak godina stopa smrtnosti se smanjuje; na primjer, u Engleskoj za 30%. Ovaj se trend pojašnjava i pripisuje uvođenju programa ranog otkrivanja karcinoma dojke - mamografskom probiru, adjuvantnoj sistemske terapiji, te uvođenju personalizirane kemo- i hormonske terapije. Rak dojke ima najveću incidenciju u dobnoj skupini od 45 do 55 godina starosti. Vrlo rijetko obolijevaju žene mlađe od 30 godina. Učestalost raste s dobi i to do 55. godine starosti, potom ima tendenciju snižavanja (1,2,3). Prema podacima Registra za rak Hrvatske i Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u Hrvatskoj je rak dojke najčešći zloćudni tumor u žena i drugi najčešći tumor u populaciji općenito (4). U skupini žena u dobi od 35 do 60 godina starosti rak dojke uzrokuje veću smrtnost u odnosu na sve ostale bolesti zajedno (4).

Razlike u pojavi raka dojke između pojedinih zemalja, kontinenata i rasa su vrlo značajne. Najveće stope novooboljelih od karcinoma dojke evidentirane su u Sjevernoj Americi i sjeverozapadnim dijelovima Europe, dok su najniže stope pojavljivanja u zemljama Azije. Postoji i razlika u incidenciji između pojedinih etničkih skupina i rasa. Najveće stope obolijevanja vide se u bjelkinja, poglavito u dobi iznad 45 godina. Veći rizik za oboljevanje od karcinoma dojke imaju neudane u odnosu na udane te žene višeg socijalnog statusa u odnosu na one nižeg statusa (1,2,3).

Pojavnost karcinoma dojke dosegla je svoj vrhunac kasnih osamdesetih godina, nakon čega se stopa ustalila. S druge strane, mortalitet se u razdoblju od 1995 - 1998. godine snižavao stopom od 3,4% godišnje. Ovo smanjenje stope smrtnosti može se pripisati uspješnim rezultatima provedenih probirnih mamografskih sistematskih pregleda, kao i primjeni adjuvantne terapije selektivnim modulatorom estrogenskih receptora tj. tamoksifenom, te polikemoterapijom (5-7). Karcinom dojke je heterogena bolest, a njeni klinički znaci i simptomi uvelike ovise o tome da li je bolest zahvatila samo dojku, ili je metastazirala u okolna tkiva ili pak u udaljena tkiva i organe.

## 1.2. Čimbenici rizika karcinoma dojke

Do sada su poznati čimbenici rizika za nastanak raka dojke uključivali dob, izlaganje hormonskoj aktivnosti i nasljeđe. Produženo vrijeme izlaganja hormonskoj aktivnosti uključuje pojavu prve menstruacije u ranoj dobi, pojavu menopauze u kasnijoj dobi, te nadomjesnu terapiju hormonima (8). Rizik se povećava u osoba s većim brojem bliskih rođaka koji su bolovali od raka dojke, što ukazuje na ulogu nasljednih čimbenika. Pretilost u postmenopauzi, također je jedan od čimbenika rizika. Suprotno tome, incidenciju smanjuju trudnoća u ranijoj dobi, produljeno vrijeme laktacije i tjelesna aktivnost (9). Zdrava prehrana i prehrambene navike, također se dovode u vezu s pojavom karcinoma dojke, osobito u posljednje vrijeme. Potencijalno odgovorni čimbenici okoliša koji se najčešće navode su stres te pušenje. Izrazito „guste“ (bujne) dojke na mamografskoj snimci povezane su s dvostruko većim rizikom od nastanka karcinoma (10).

## 1.3. Etiološki čimbenici karcinoma dojke

Još uvijek nisu u potpunosti poznati čimbenici odgovorni za nastanak karcinoma dojke, kao uostalom niti većine drugih zloćudnih tumora. U etiološke čimbenike karcinoma dojke spadaju genetski i epigenetski čimbenici, odnosno - nakupljanje mutacija u određenim genima te endokrini i egzogeni čimbenici. Onkogeni i tumor supresorski geni povezuju se s razvojem različitih vrsta karcinoma. Geni koji su uključeni u nasljedni, obiteljski karcinom dojke su BRCA1, BRCA2, PT53, PTEN i STK11/LKB1. Oba gena BRCA su tumor supresorski geni. Važni su regulatori staničnog ciklusa i smrti stanice, što uključuje zastoj staničnog ciklusa, popravak DNK i apoptozu. Gubitak heterozigotnosti (LOH, od engl. loss of heterozygosity) rezultira poremećajem funkcije tumor supresorskih gena, ponajčešće TP53. Osobe s nasljeđenim mutacijama u genima BRCA1 i BRCA2 imaju veći rizik za nastanak raka dojke i jajnika, u usporedbi s preostalom populacijom (11). Amplifikacija onkogeni, kao što su HER2, c-myc i ciklin D1 predstavljaju važne genetičke čimbenike, nerijetko prisutne u karcinomima dojke (12, 13).

Valja naglasiti da je u obiteljskoj anamnezi vrlo bitan podatak o pojavi raka dojke među ženskim srodnicima u prvom naraštaju, što se odnosi na majku, kćeri i sestre. Najveći rizik za pojavu raka dojke postoji u žena čije su majke imale obostrani rak dojke prije menopauze. One imaju čak devet puta veći rizik od ostalih, odnosno 50% šanse da obole

od raka dojke. Također, povećan rizik za pojavu raka imaju žene koje su već imale rak dojke u istoj ili drugoj dojci (10, 11).

U skupini egzogenih čimbenika okoliša koji se smatraju potencijalno odgovornim za nastanak karcinoma dojke su pušenje, uzimanje prekomjernih količina alkohola, prehrana bogata mastima, stres i izloženost ionizacijskom zračenju. Poznato je da pušenje cigareta ima nepovoljan učinak na sve stanice. Nikotinski produkti sudjeluju u oksidativnim procesima stanice u kojima nastaju slobodni radikali, za koje se danas zna da su odgovorni za oštećenje, smrt i zloćudnu preobrazbu stanica. Žene pušači, osobito one koje puše u mlađoj životnoj dobi, prije menopauze, imaju veći rizik za pojavu raka dojke (1,3). Neki radovi pokazuju povezanost uživanja prekomjernih količina alkohola s povećanim rizikom za pojavu raka dojke, dok je umjerena konzumacija alkohola dopuštena zbog zaštitnog djelovanja na kardiovaskularni sustav (3). Zdrava prehrana i prehranske navike također se dovode u vezu s pojavom raka dojke. Smatra se da uravnotežena prehrana bogata vitaminima, poglavito A i C, s dovoljno sirovog povrća i voća, smanjuje rizik od nastanka karcinoma dojke. Mediteranska prehrana u kojoj se svakodnevno koristi maslinovo ulje smatra se optimalnim načinom prehrane. Stres je također jedan od predisponirajućih faktora za nastanak karcinoma dojke, no kako je stres teško mjeriti, u literaturi o tome zasad ne postoje decidirani podaci.

Uz sve dosadašnje spoznaje o potencijalnim čimbenicima rizika koji dovode do pojave raka dojke, postoji velik broj oboljelih, kod kojih se pojava karcinoma dojke ne može povezati niti s jednim od njih (2,3).

#### **1.4. Dijagnostički postupci u otkrivanju karcinoma dojke**

Mamografija je najznačajnija i najučinkovitija neinvazivna metoda, posebice u dijagnostici klinički okultnog (nepalpabilnog) karcinoma dojke (14). Uz ovu se metodu u dijagnostici karcinoma dojke koriste ultrazvučne metode, uz obojeni dopler, te druge radiološke metode kao što je magnetska rezonancija (MR), obično uz primjenu kontrastnog sredstva. Glavne indikacije za MR dojke su: diferencijacija između benignih i malignih lezija dojke (uz obaveznu primjenu paramagnetnog kontrastnog sredstva), utvrđivanje eventualne multifokalnosti karcinoma u dojci ili proširenosti u drugu dojku, utvrđivanje invazivnog duktalnog karcinoma manjeg od 5 mm promjera, te probir karcinoma dojke u visokorizičnim skupinama žena (15). U najnovije vrijeme značajnu

ulogu u dijagnostici, kao i u utvrđivanju proširenosti bolesti, ima PET- pozitron emisijska tomografija, odnosno kombinacija kompjuterizirane tomografije i pozitron emisijske tomografije PET-CT (16). Od drugih se dijagnostičkih metoda najčešće koriste citopunkcija vođena ultrazvučnom sondom, sterotaksijska biopsija širokom iglom kao i stereotaksijska vakuum biopsija. Koriste se i kirurške metode postavljanja dijagnoze karcinoma dojke, kao što su otvorena ekscizijska biopsija uz mamografsku markaciju ili ultrazvučnu markaciju. Za praćenje i utvrđivanje proširenosti bolesti koristi se imunoscintigrafija ili scintigrafija obilježenim protutijelima, metode kojima se pomoću specifičnog, radionuklidom obilježenog protutijela ili njegovih funkcionalnih fragmenata prikazuje raspodjela određenog ciljnog antigena u tijelu.

Evaluacija bolesnika s karcinomom dojke, odnosno općeg statusa bolesti uključuje prije svega patohistološku analizu tumora i utvrđivanje proširenosti bolesti. Određuje se histološki gradus, veličina tumora, status aksilarnih limfnih čvorova, status hormonskih receptora, kao i onkogen HER2, te Ki-67 (17). Klinička evaluacija uključuje, prije svega slikovne metode, od konvencionalnog rentgenograma srca i pluća, UZV pretrage abdomena, scintigrafije kostiju a, kada je indicirano, i kompjuteriziranu tomografiju(CT), te magnetsku rezonanciju.

## **1.5. Prognostički čimbenici karcinoma dojke**

### **1.5.1. Histološki tip tumora**

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je, obzirom na histološki tip tumora, predložila detaljnu klasifikaciju zloćudnih tumora dojke (18).

1. Invazivni duktalni karcinom
2. Invazivni lobularni karcinom
3. Tubularni karcinom
4. Invazivni kribriformni karcinom
5. Medularni karcinom
6. Mucinozni karcinom
7. Invazivni papilarni karcinom
8. Invazivni mikropapilarni karcinom
9. Apokrini karcinom
10. Metaplastični karcinomi
11. Karcinom bogat lipidima

12. Sekretorni karcinom
13. Onkocitni karcinom
14. Adenoidno-cistični karcinom
15. Karcinom acinarnih stanica
16. Karcinom svijetlih stanica- bogat glikogenom
17. Sebacealni karcinom
18. Inflamatorni karcinom
19. Neuroendokrini tumori

### **1.5.2. Stanje regionalnih limfnih čvorova**

Evaluacija i histološka analiza aksilarnih limfnih čvorova vrlo je važna odrednica za procjenu, terapiju i preživljavanje bolesnika. Preporuka je da se u analizu uključi 10 aksilarnih limfnih čvorova (19). Broj zahvaćenih čvorova kategorizira se u tri skupine:

- N0 limfni čvorovi nisu zahvaćeni
- N1 zahvaćeno 1 do 3 limfna čvora
- N2 zahvaćeno 4 i više limfnih čvorova.

### **1.5.3. Histološki gradus tumora**

Svaki patohistološki nalaz, osim histološkog tipa tumora, mora imati određen i gradus tumora koji se primjenjuje za histološko graduiranje tumora. Koristi se metoda Scarff-Bloom-Richardson koju preporučuje i Svjetska zdravstvena organizacija, odnosno, njezina modifikacija po Elstonu i Ellisu (tzv. Nottinghamska metoda) (20). Analiziraju se tri osobine tumora, koje se graduiraju od 1 do 3: 1. formiranje tubula, 2. nuklearni polimorfizam i 3. broj mitoza. Histološki gradus izračunava se iz zbroja bodova iz čega proizlaze gradusi:

- G1 (dobro diferencirani) - 3 do 5 bodova
- G2 (umjereno diferencirani) – 6 do 7 bodova
- G3 (slabo diferencirani)– 8 do 9 bodova

Iz vrijednosti histološkog gradusa, veličine tumora i zahvaćenosti limfnih čvorova, odnosno umnoškom, izračunava se Notinghamski prognostički indeks (NPI), prema slijedećoj formuli:

promjer tumora (cm) x 0,2 + status limfnih čvorova (1-3) + histološki gradus tumora (1-3). Ako je vrijednost indeksa <3,4 onda je prognoza dobra, uz vrijednost 3,4-5,4 je osrednja, te loša uz indeks veći od 5,4 pri čemu je 15-godišnje preživljenje u prvom slučaju oko 80%, u drugoj skupini 42% i u trećoj oko 13% (20).

#### **1.5.4. Status hormonskih receptora**

Estrogenski i progesteronski receptori (ER i PR) su nestabilni, termolabilni proteini koji se nalaze u jezgrama tumorskih stanica, ali i u normalnim epitelnim stanicama. Ekspresija ER i PR se određuje imunohistokemijski, a intenzitet reakcije se određuje semikvantitativno. Korištenjem mikroskopije, interpretira se obojenje u području najveće imunoreaktivnosti (tzv. „hot spot“ područje), na 300 pregledanih stanica. Rezultati se razvrstavaju u četiri skupine:

- 0 - negativna reakcija (pozitivna nuklearna reakcija do 5% tumorskih stanica)
- 1 - slabo pozitivna (5% do 10% tumorskih stanica)
- 2 - umjereno pozitivna reakcija (više od 10 do 50% tumorskih stanica)
- 3 - jako pozitivna reakcija (> 50% tumorskih stanica)

Status ER i PR nije važan samo kao prognostički, nego i kao prediktivni čimbenik za odgovor na hormonsku terapiju (21).

#### **1.5.5. Status proteina HER2**

U karcinomima dojke pojačana je ekspresija dva onkogeni iz skupine čimbenika rasta tipa I. To su receptor za epidermalni čimbenik rasta, EGFR (od engl. epidermal growth factor receptor) (ili HER1) i HER2/neu. Amplifikacija ovih gena koja dovodi do pojačanog stvaranja njihovih proteinskih produkata povezana je s agresivnijim kliničkim tijekom, većim rizikom za pojavu metastaza, bržim rastom tumora i progresijom bolesti. Receptor HER2 je transmembranski glikoprotein čija je ekspresija pojačana u 15 – 40% slučajeva duktalnih invazivnih karcinoma. Češće je amplificiran u slabije diferenciranim

karcinomima. Procjena statusa proteina HER2 provodi se najčešće imunohistokemijski (Hercep Test) ili metodama hibridizacije *in situ* (CISH i FISH) (22).

Postoje različite interpretacije rezultata bojenja u analizi proteina HER2, no najčešće se koristi metoda „skoriranja“, koja se primjenjuje samo u invazivnoj komponenti tumora:

0 - nema membranskog bojanja ili je prisutno u <10% stanica tumora

1+ - slabo/jedva vidljivo membransko bojanje prisutno u >10% stanica tumora (djelomično obojenje membrane)

2+ - slabo/umjereno, kompletno membransko bojanje u >10% stanica tumora

3+ - jako, potpuno membransko bojanje koje se nalazi u >10% stanica tumora.

Prekomjernom ekspresijom proteina HER2 smatra se samo nalaz intenziteta 3+ što odgovara difuznom, jako pozitivnom membranskom bojanju. Bolesnice čiji tumori pokazuju ovakvu sliku kandidati su za terapiju Herceptinom. Bolesnice s karcinomom koji pokazuju ekspresiju proteina HER2 intenziteta 2+ su također potencijalni kandidati za liječenje Herceptinom. Manji broj ovih tumora (20-30%) također pokazuje amplifikaciju gena za HER2. Stoga se prije početka liječenja za sve slučajeve karcinoma u kojih je ekspresija proteina HER2 2+ dodatno obavezno primjenjuje jedna od metoda koje se temelje na hibridizaciji *in situ* (CISH ili FISH), kako bi se i iz ove skupine izdvojile one bolesnice kod kojih se očekuje korist od imunoterapije Herceptinom. Niska vrijednost ekspresije HER2 proteina, iako nedovoljna za imunoterapiju, mogla bi imati vrijednost kao prognostički čimbenik. Naime, ukoliko bolesnice s tumorom visokog gradusa imaju negativnu reakciju na HER2 onda se ne očekuje reakcija na liječenje Herceptinom što onda zahtijeva druge, agresivnije načine liječenja. Prognostička vrijednost EGFR (HER1) je slabije istražena i još uvijek je predmet kliničkih ispitivanja.

### **1.5.6. Ki-67**

Izbor adjuvantne sistemske terapije temelji se na ciljanom liječenju, sukladno St. Gallenskom konsenzusu. Uz već tradicionalne parametre, preporuka je koristiti metode utvrđivanja biljega proliferacije, poglavito Ki-67. Ovaj je biljeg opisan početkom osamdesetih godina prošlog stoljeća pomoću mišjih monoklonalnih protutijela protiv nuklearnog antigena porijeklom stanične linije Hodgkinove bolesti (23). Naziv je dobio prema mjestu rada autora Ki od Kiel, Njemačka, a broj dolazi od broja klona (23).

Antigen Ki-67, nehistski protein velike molekularne mase (359/320 kDa), smatra se najpouzdanijim biljekom stanične proliferacije. Stoga se primjenjuje kao prognostički

biljeg i predskazatelj vremena povratka bolesti, u bolesnica s karcinomom dojke. Dodatno, ovaj je biljeg korišten kao prognostički čimbenik odgovora na terapiju u različitim tipovima zloćudnih tumora, kao što su karcinom dojke i sarkomi. U stanici je prisutan u svim fazama staničnog ciklusa, osim u fazi G0. Tijekom mitoze dolazi do fosforilacije i defosforilacije ovog proteina (24). Poznato je da se Ki-67 nalazi u jezgri, u zoni koja se naziva gustom fibrilarnom komponentom jezgrice (engl. DFC: dense fibrillary component). Zastupljenost Ki-67 u određenim fazama staničnog ciklusa regulira osjetljiv molekularno-genetički kompleks različitih proteina koji su uključeni u njegovu sintezu i razgradnju. Nedavno je identificiran kompleks proteaza, nazvan proteasomom, koji sudjeluje u brzom razgradnji Ki-67 (25). Funkcija Ki-67 nije potpuno razjašnjena. Nesumnjivo je da je Ki-67 presudan u procesu stanične proliferacije, što je dokazano inhibicijom proliferacije nakon uklanjanja proteina Ki-67. Stoga se u dijagnostičkoj histopatologiji i staničnoj biologiji ovaj biljeg koristi za određivanje i praćenje rasta i dijeljenja zdravih i tumorskih stanica. Danas se smatra da je protein Ki-67 pouzdaniji biljeg proliferacije od mitotskog indeksa, jer se uz pomoć Ki-67 bilježe stanice u svim fazama staničnog ciklusa, osim u G0 fazi, dok se mitotskim indeksom otkrivaju stanice samo u M-fazi staničnog ciklusa.

Budući da protein Ki-67 sadržava domenu jednaku proteinima koji reguliraju stanični ciklus (DUN1 i RAD53), smatra se da Ki-67 ima slično djelovanje. Tijekom rane G1-faze, Ki-67 je smješten u ekstranukleolarnim područjima koja sadrže centromernu i satelitsku DNK, pa su neki autori temeljem ovog saznanja pretpostavili da Ki-67 sudjeluje u procesu organizacije DNK. Budući da je dokazano da Ki-67 ima sposobnost vezanja za RNK i DNK, te da ulazi u kompleksne interakcije s drugim proteinima, pretpostavlja se da Ki-67 ima strukturalnu ulogu unutar jezgrice. Lokalizacija Ki-67 unutar zone DFC, u kojoj se odvija kasna faza sinteze ribosomalne RNK, upozorava na važnost Ki-67 u sintezi ribosoma tijekom diobe stanice (25).

### **1.5.7. Ostali prognostički čimbenici: multicentričnost i bilateralnost**

Tumori dojke najčešće se pojavljuju kao pojedinačne palpabilne torbe. Mogu se, međutim, pojaviti i u obliku nekoliko međusobno odvojenih žarišta u istom ili različitim kvadrantima dojke, odnosno jednoj ili obje dojke. Ponekad se tumori dojke javljaju kao nepalpabilne, slabo ograničene mase (3, 18). Multicentrično se, najčešće, pojavljuje lobularni karcinom iako se ovaj način rasta tumora može vidjeti i u duktalnom invazivnog



karcinoma što utječe na opseg i vrstu kirurškog zahvata (3, 17). U nekim je radovima pokazan veći rizik od lokalnog recidiva, u multicentričnih oblika karcinoma dojke (18). Ako se u obzir uzme ukupan promjer tumora, solitarni i multicentrični tumori podjednako često invadiraju u limfne čvorove. Noviji radovi pokazuju da su multicentrični tumori povezani s kraćim preživljavanjem u odnosu na pojedinačne tumore jednakog volumena. Dogovorno je prihvaćeno da se kod multicentričnih tumora za promjer tumora uzima promjer najvećeg žarišta, što se kasnije koristi u klasifikaciji TNM, odnosno stupnjevanju bolesti (18).

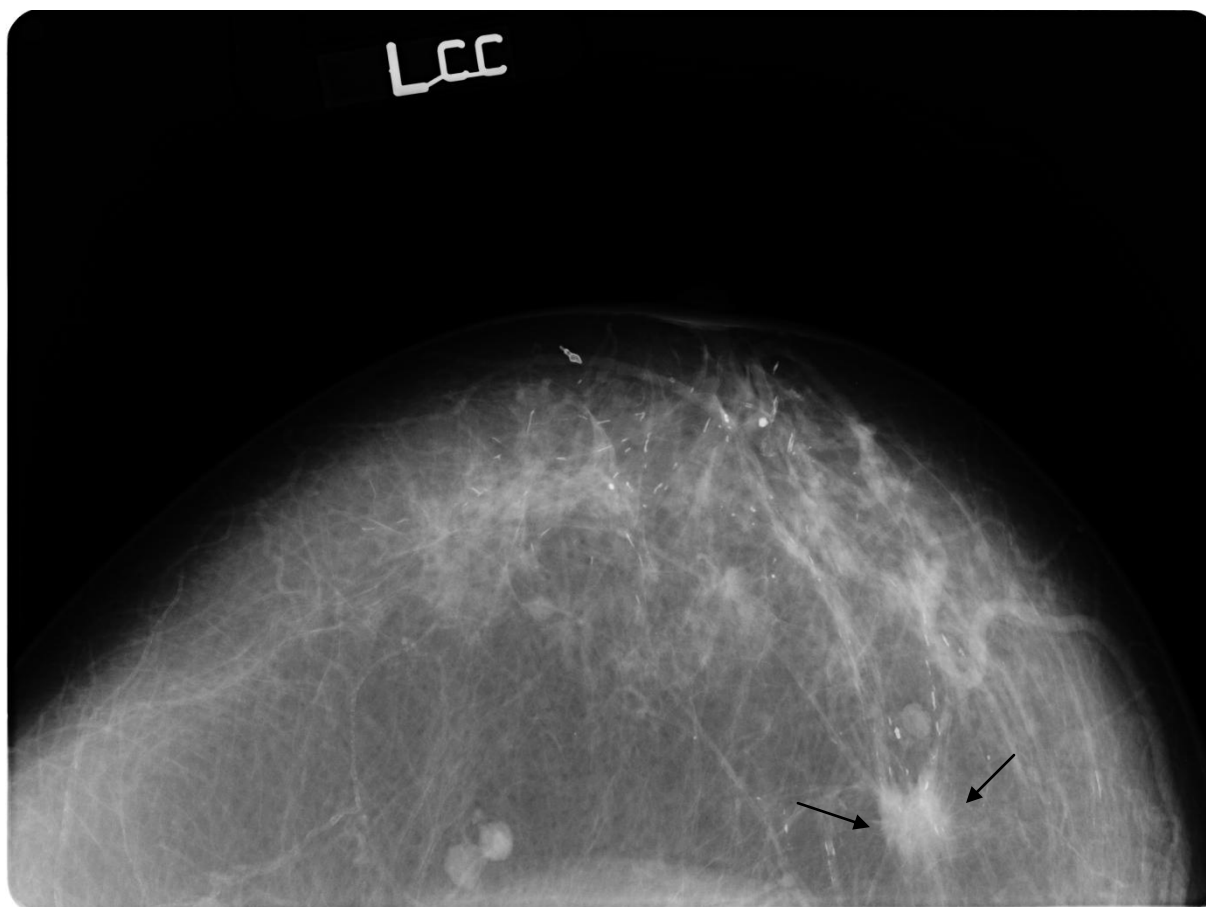
Istodobna pojava tumora u obje dojke nalazi se u otprilike 0,2-2 % svih karcinoma, najčešće kod lobularnog tipa. Može se međutim, naći i u drugim histološkim tipovima karcinoma dojke. Kod bilateralnih tumora nije isključena mogućnost istodobne pojave dva različita histološka tipa karcinoma u obje dojke. Pojava karcinoma u drugoj dojci ovisi o veličini tumora, kliničkom stadiju bolesti i stupnju diferencijacije. Godišnji rizik za pojavu raka u drugoj dojci nakon mastektomije zbog karcinoma iznosi približno 1% (18).

## 1.6. Duktalni invazivni karcinom

Duktalni invazivni karcinom je najčešći histološki tip karcinoma dojki i čini 65 – 80% svih karcinoma dojke. Radi se o heterogenoj skupini tumora, a prema definiciji se radi o karcinomu čija histološka slika ne odgovara niti jednom posebnom tipu karcinoma. Neki mu autori, stoga dodaju oznaku „NOS“ (od engl. not otherwise specified) (26, 27). Da bi se tumor klasificirao kao duktalni invazivni karcinom (NOS), najmanje 90% ukupne mase mora imati histološke osobine ovog tipa tumora. Najčešće se manifestira kao palpabilan čvorić ili se nađe slučajno na mamografskom pregledu žena. i Tumori su makroskopski, na prerezu, heterogenog izgleda, izrazito nejasnih rubova, neoštro ograničeni od okolnog tkiva, zvjezdoliki, ponekad pokazuju bolju ograničenost, reznjati, a mogu sadržavati žarišta ovapnjenja. Obično su sivobijele boje. Na opip su čvrste konzistencije, odatle i stari naziv: *scirozni karcinom* (od grč. skirrhos – tvrd poput kamena).

U nepalpabilnoj, ranoj fazi, kada se dijagnosticiraju dijagnostičkom mamografijom, tumori su veliki nekoliko milimetara. U uznapredovalim fazama bolesti mogu narasti do promjera od 10 cm. Na mamografskoj su snimci vidljivi kao homogena zasjenjenja

različite veličine, (s obzirom na stadij bolesti), izrazito neoštiri kontura prema okolnom zdravom tkivu, s trnastim izdancima, poput čička (Slika 1).



Slika 1. Mamografski prikaz duktalnog invazivnog karcinoma dojke

### 1.7. Žlijezde dojke – stroma i epitel

Žlijezde dojke čini stromalne i epitelne stanice koje međusobno komuniciraju preko ekstracelularnog matriksa (ECM). Međudjelovanje između epitela i strome vrlo je važno i za pravilno strukturiranje i funkcioniranje normalne mliječne žlijezde. Narušavanje „komunikacije“ epitela i strome može potaknuti nastanak ili potaknuti napredovanje karcinoma dojke. Zanimljivo je da mliječno žljezdano tkivo tijekom svog razvojnog ciklusa pokazuje mnoge osobine koje su svojstvene za karcinom dojke. Štoviše, mnogi čimbenici koji su uključeni u nastanak karcinoma dojke također su neophodni u razvitku žljezdanog tkiva dojki (28).

Publicirani su mnogi radovi u kojima se analiziraju različiti čimbenici koji se nalaze i u stromalnoj i u epitelnoj komponenti, u smislu njihove prisutnosti, bilo pojačane bilo oslabljene, a također i odnos tih čimbenika u karcinomima dojki, te njihov odnos i pojavljivanje u normalnom tkivu dojki ili u benignim promjenama dojki, npr. fibroadenomu

Neke od poznatijih proteaza koje igraju ulogu u invaziji tumora su aktivator plazminogen urokinaza (uPA), ili matriks metaloproteinaze (MMPs). Ovi potonje predstavljaju veliku obitelj enzima koji razgrađuju ekstracelularni matriks, uključujući kolagenaze, gelatinaze, stromalizine, od kojih je većina povezana s angiogenezom i metastaziranjem tumora (29).

### **1.8. Epitelno - mezenhimalna tranzicija (EMT)**

U slabije diferenciranim karcinomima većeg malignog potencijala, stanice gube svoje epitelne karakteristike i stječu mezenhimalne morfološke osobine, praćene promjenama ekspresije gena. Ovakva promjena fenotipa poznata je kao epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT), a dešava se kao posljedica smanjene ekspresije plakoglobina, posredovane autokrinim djelovanjem hormona rasta (HR). EMT posjeduje značajnu ulogu u mnogim biološkim procesima (30). U procesu EMT se, kao aktivator, pokazao i protein NEDD9. NEDD9/HEF1/Cas-L je član skupine obitelji proteina Cas a pokazan je kao metastatski biljeg mnogih tipova karcinoma (30, 31). U novijim je istraživanjima, ekspresija NEDD9 u nekim tumorima povezana s agresivnijim ponašanjem. Između ostalog, pospješuje invaziju trostruko („triple“) negativnih karcinoma dojke najčešće evidentno praćeno EMT, no mehanizmi su još uvijek nejasni (31).

### **1.9. Međustanične veze**

Za održavanje međustaničnih veza te normalne biologije stanica važno je funkcioniranje adherentnih mjesta. Adherentna mjesta predstavljaju specijalizirana područja plazma membrane povezane citoskeletalnim adhezivnim filamentima, pri čemu E-kadherini djeluju kao molekule adhezije, ovisne o ionima kalcija . Zamijećene su mutacije gena za E-kadherin te alfa, beta i gama katenine (plakoglobin) u stanicama različitih tumora. Katenini povezuju kadherine u aktinske filamente i tako učvršćuju i stabiliziraju međustanične veze. Drugi član obitelji kadherina, N-kadherin, promiče

migraciju, invazivnost i metastaziranje. Kada je E-kadherin dovoljno aktivan, epitelne stanice, uključujući i stanice raka, ne mogu prekinuti, ili poremetiti međusobne veze. Smanjena aktivnost E-kadherina može predstavljati okidač za otpuštanje stanica raka iz primarnog sijela. Druga vrsta adhezivnih međustaničnih veza su dezmosomi čija prisutnost i stvaranje inhibiraju invazivnost stanica, a njihovo organiziranje također posreduje plakoglobin. Sve te promjene posredovane su receptorima HR bilo izravno, aktivacijom tirozin kinaze ili poticanjem inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 (IGF-1). S obzirom na navedeno, djelovanje antagonista tih receptora moglo bi imati značajno terapijsko i kliničko značenje, naročito u kontroli metastatskog karcinoma dojke (32).

### **1.10. E-kadherin**

E-kadherin je pripadnik obitelji kadherina u koju se ubraja više od 16 različitih molekula. Predstavlja transmembranski glikoprotein, ovisan o kalciju, s velikom izvanstaničnom domenom, koji je uključen u stvaranje međustaničnih veza u epitelnim tkivima. Značajna je njegova uloga medijatora u unutarstaničnim vezama, preko molekula aktina (33).

Molekule E-kadherina nalaze se pretežno u epitelnim tkivima i sudjeluju u procesu organogeneze i morfogeneze. Poremećaj njegove ekspresije, relokalizacija u citoplazmu, dovodi se u vezu s metastaziranjem (34).

Smanjena ekspresija E-kadherina nalazi se u slabije diferenciranim duktalnim invazivnim karcinomima i povezuje se s ranijom pojavom metastaza. Nije nađena povezanost između ekspresije E-kadherina i proteina HER2 (35). Smanjenu ili aberantnu ekspresiju E-kadherina pokazivalo je 2/3 (66%) uzoraka karcinoma dojke u jednoj od studija provedenoj u Hrvatskoj na 50 bolesnica (36).

### **1.11. Hormon rasta (HR)**

Hormon rasta je protein koji sadrži 191 aminokiselinu u jednom lancu, relativne molekulske mase 22 000. Sintetizira ga prednji režanj hipofize. Nema ciljnu žlijezdu, već djeluje na sva tkiva organizma. Releasing hormon hormona rasta je glavni stimulator, a somatostatin glavni inhibitor sinteze i otpuštanja HR. Metabolički učinci HR su mnogostruki: pojačava sintezu proteina u svim stanicama tijela poticanjem transporta

aminokiselina kroz stanične membrane, poticanjem sinteze proteina u ribosomima, poticanjem transkripcije DNK i stvaranjem RNK, te smanjenjem katabolizma proteina. Dodatno, povećava mobilizaciju masnih kiselina iz masnog tkiva i povećava upotrebu masnih kiselina za oslobađanje energije uz istovremeno smanjenje iskorištavanja glukoze. Izražen je u normalnim i neoplastičnim stanicama (37,38,39). Za razliku od hormona rasta kojeg luče stanice hipofize i djeluje na druge stanice, autokrini hormon rasta djeluje na stanice u kojima i nastaje, uključujući tumorske stanice.

Autokrini hormon rasta ima regulatorne funkcije u embrionalnom razvoju, diferencijaciji i proliferaciji stanica, a ima ulogu i u razvoju i metastaziranju tumora. Uključen je u razvoj dojke za vrijeme puberteta. Stvaraju ga i stanice tumora.

Tijekom dediferencijacije karcinoma, stanice gube svoje epitelijalne osobine i stječu mezenhimalnu morfologiju (EMT), što je praćeno promjenama u ekspresiji nekih gena (29). Dokazano je da je posljedica toga, između ostalog, i autokrini produkcija HR. Primijećeno je da autokrini HR specifično snižava ekspresiju plakoglobina. Autokrini produkcija HR od strane stanica karcinoma dojke mijenja njihovu morfologiju i sposobnost širenja na kolagenom supstratu, odnosno - povećava njihovu sposobnost migracije i proboj kroz ekstracelularni matriks. Istovremeno se uočava povišena ekspresija gena HR u stanicama karcinoma dojke koje metastaziraju. Povećana invazivnost stanica karcinoma dojke povezuje se sa spomenutom smanjenom ekspresijom plakoglobina, a to je, među ostalim, praćeno relokalizacijom E-kadherina u citoplazmu.

Djelovanje autokrinog hormona rasta na stanice raka dojke dokazano snižava ekspresiju plakoglobina a sniženje ekspresije plakoglobina praćeno je relokalizacijom E-kadherina u citoplazmu. Ovo rezultira slabljenjem međustaničnih veza, konverzijom u mezenhimalni fenotip i olakšava invaziju i metastaziranje raka dojke (39,40,41,42)

## **1.12. Receptor za hormon rasta (RHR)**

Receptor za hormon rasta (RHR) je N-glikozirani površinski receptor, član superobitelji citokinskih receptora. Sva poznata djelovanja HR posredovana su RHR-om. Hormonom rasta inducirana homodimerizacija RHR-a uzrokuje aktiviranje receptor-pridružene citoplazmatske tirozin kinaze JAK-2. Ispoljenost RHR u karcinomu dojki i kulturama stanica dokazani su metodom obrnutog prepisivanja i lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR), hibridizacijom *in situ* i imunohistokemijski. Istraživanja su

pokazala da je ekspresija RHR izražena kod karcinoma dojke i pokazuje njegovu ulogu u signalnim putevima koji su uključeni u nastanak i napredovanje karcinoma dojke (43).

### **1.13. Plakoglobin (gama katenin)**

Plakoglobin je multifunkcionalni protein uključen u regulaciju transkripcije i adheziju stanica. Strukturalna homologija između plakoglobina i beta-katenina omogućuje kompetitivno vezanje za koaktivatore transkripcije. Plakoglobin regulira signalni put beta-katenin/Tcf (čimbenici Tcf poznati su kao induktori tumora u uvjetima pojačanog djelovanja beta-katenina, u mnogim vrstama tumora). Plakoglobin i beta-katenin se vežu na pričvrsta mjesta na Tcf-4, a plakoglobin inhibira vezanje Tcf-4 na DNK što je prisutno u prijelazu ranog stadija u invazivni stadij razvoja tumora.

Plakoglobin sudjeluje i u održavanju stabilnosti adherentnih mjesta, a regulira i organizaciju dezmosoma, adhezivnih međustaničnih spojeva čija je prisutnost inhibitorna u odnosu na staničnu invazivnost. (44,45,46).

### **1.14. NEDD9**

NEDD9/HEF1/Cas-L je član obitelji proteina Cas. U posljednjih nekoliko godina pokazao se kao važan čimbenik koji doprinosi razvitku različitih tipova karcinoma, a također i kao ključni regulator metastaziranja u nekim od tipova karcinoma (npr. melanoma, glioblastoma i drugim) (30, 31)

Nedavno je dokazana posebna uloga NEDD9 u karcinomu dojke, posebno u regulaciji onkogenih signalnih puteva neophodnih za progresiju tumora dojke (47). Proteinski slijed NEDD9 čine multiple protein-protein interakcijske domene koje posreduju interakciju s tzv. „downstream signaling“ partnerima. Nedavno je pokazano i da delecija NEDD9 značajno odgađa nastajanje primarnog tumora, te reducira širenje stanica tumora, kao i metastatsku progresiju na modelu tumora dojke miša. Učinak estrogena na djelovanje NEDD9 nije sasvim razjašnjen. Novija saznanja i otkrića o ulozi NEDD9 u progresiji tumora dojke pokazuju važnost istraživanja molekularnog odgovora NEDD9 na estrogen. Pokazano je da su razine 105-kDa NEDD9 fosfo-forme značajno povišene nakon

trodnevnog izlaganja estrogenu. Supresija širenja tumorskih stanica karcinoma dojke postignuta je antiestrogenom – tamoksifenom (48).

### **1.15. Metastaziranje**

Karcinom dojke jedan je od vodećih uzroka smrti od raka u žena, zbog izraženog metastatskog potencijala. Metastaziranje je složen proces s nekoliko koordiniranih događaja, što uključuje diseminaciju stanica iz primarnog tumora zbog gubitka međustaničnih kontakata, povećanje stanične pokretljivosti te produkciju proteaza što omogućuje invaziju u okolna tkiva, kao i ulazak u krvotok ili limfatički sustav. U novije je vrijeme došlo do značajnog napretka u razumijevanju procesa metastaziranja. Danas se smatra da stvaranje udaljenih metastaza zahtijeva nekoliko koraka, počevši od invazije tumorskih stanica kroz bazalnu membranu i stromu, ulaska u krvnu žilu, preživljavanja tumora u krvnoj struji, smještaja stanica tumora na određeno mjesto i stvaranja novih žarišta. Neke druge hipoteze također pokušavaju objasniti mehanizme metastaziranja. Prema jednoj od njih dva su bitna procesa uključena u metastaziranje: prvi se temelji na izdvajanju stanica iz primarnog tumora i diseminaciji u udaljena područja te drugi koji podrazumijeva metastaze kao paralelan, po svemu neovisan proces od primarnog tumora. Ovaj drugi mehanizam podrazumijeva postojanje stanica iz kojih se regrutiraju metastaze prije pojave primarnog tumora, što se možda događa u slučajevima postojanja metastaza u kojima se ne identificira primarni tumor. Taj tzv. koncept rezervoara matičnih stanica koje su prisutne tijekom cijelog života i sposobne su stvoriti brojne stanične linije, diferencirati se, pokazan je na sustavu matičnih stanica hematopoetskog tkiva. Postoje i drugi podaci koji govore o porijeklu većine tkiva iz matičnih stanica, a njihovom repopulacijom i diferencijacijom. Ove tkivno specifične stanice imaju sposobnost samoobnavljanja i stvaranja više diferenciranih progenitornih stanica.

U dojci se cikličke promjene, vezane uz razinu hormona i tijekom trudnoće, ponavljaju tijekom života. Tijekom navedenog perioda moguća su brojna genska oštećenja u tkivu dojke koja se mogu akumulirati u matičnim stanicama i stoga dovesti do razvoja zloćudnog tumora i njihovog metastaziranja. Glavna značajka matičnih stanica je njihova ekstremna osjetljivost na učinak hormona i citokina. Stoga se pretpostavlja da je populacija stanica sličnih matičnim u tkivu dojke uključena u inicijaciju pojave

metastatske bolesti, a pretpostavlja se da rak dojke nastaje iz stanica koje su mutirane i imaju sposobnost obnavljanja i diferencijacije *in situ*, kad dospiju u udaljene organe (19).

Najčešća mjesta metastaziranja su koža, limfni čvorovi, druga dojka, kosti, pluća, jetra i središnji živčani sustav (17).



## **2. HIPOTEZA**

## Hipoteza

Jedan od predloženih mehanizama nastanka metastaza raka dojke odvija se autokrino, putem izlučivanja hormona rasta koji onda pokreće kaskadu zbivanja čiji je rezultat metastaziranje i to je tipičan primjer nastanka metastaza iz primarnog žarišta. Djelovanje autokrinog hormona rasta na stanice raka dojke rezultira u smanjenju ekspresije plakoglobina i E-kadherina, što utječe na slabljenje međustaničnih veza i olakšava invaziju i metastaziranje stanica raka dojke.

Eksponencijalni rast tumora često je posljedica amplifikacije gena za čimbenike rasta. Autokrino izlučivanje nekih čimbenika rasta može izazvati velik broj molekularnih patofizioloških promjena koje se temelje na mehanizmima pozitivne povratne sprege, u različitim tumorima. Temeljem gore navedenog postavljena je hipoteza istraživanja da je ekspresija plakoglobina snižena u metastazirajućim karcinomima dojke u odnosu na nemetastazirajuće, a povišena je ekspresija hormona rasta, receptora hormona rasta i proteina NEDD9.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

## Ciljevi istraživanja

Autonomija dijeljenja zloćudnih stanica može biti posljedica više staničnih čimbenika: autokrino stvaranje vlastitih čimbenika rasta, amplifikacija ili mutacija receptora za čimbenike rasta, mutacija u molekulama koje sudjeluju u unutarstaničnom prijenosu proliferacijskih signala, te mutacija ili povećana aktivnost čimbenika koji neposredno sudjeluju u staničnom ciklusu.

### **Ciljevi ovog istraživanja jesu :**

1. Odrediti ekspresiju autokrinog hormona rasta, receptora za hormon rasta, plakoglobina i NEDD9 u karcinomima dojke bez metastaza i s metastazama, te u metastazama u limfnim čvorovima aksile;
2. Istraživane parametre usporediti s veličinom tumora te ekspresijom ER, PR i HER2, s ciljem utvrđivanja međusobne povezanosti;
3. Usporediti analizirane parametre s kliničkim obilježjima tumora.

## **4. MATERIYAL I METODE**

## Materijal i metode

### 4.1. Materijal

U istraživanju je korišten arhivski materijal uzoraka tkiva karcinoma dojki dobivenih nakon ekscizije ili mastektomije odnosno segmentektomije dojke, te aksilarnih limfnih čvorova s metastazama, nakon limfadenektomije. Histološka potvrda učinjena je na Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“. Karcinomi su otkriveni uglavnom mamografijom, bilo da su bili okultni ili nakon uočenih kliničkih simptoma, zatim ultrazvučnom dijagnostikom uz citološku potvrdu pod kontrolom UZV prije operativnog zahvata, na Zavodu za radiologiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u razdoblju od 01.01.2001. do 31.12.2011. godine. Veći dio uzoraka korišten u ovom radu proizašao je kao rezultat projekta organiziranog mamografskog probira u ranom otkrivanju raka dojke, mobilnom mamografijom, od 01.01.2002. do 31.12.2005., te organiziranim mamografskim probirom u sklopu nacionalnog projekta „MAMMA“ koji se, unazad 6 godina, provodi u Republici Hrvatskoj. Dio uzoraka dobiven je nakon mamografskog dijagnostičkog i ultrazvučnog postupka u ambulantnih bolesnica, izvan organiziranog projekta; bilo da su asimptomatske bolesnice dolazile na redovite kontrole, bilo da su se javile sa simptomima (kvržica ili konglomerat u dojci, hemoragični iscjedak iz mamile ili uvlačenja bradavice, odnosno neke od kombinacija navedenog).

Analizirano je ukupno 40 uzoraka tumora koji nisu metastazirali i 40 karcinoma dojke koji su metastazirali u limfne čvorove aksile, kao i 40 limfnih čvorova u aksilama koji su sadržavali metastazu primarnog karcinoma dojke. Analiziran je najčešći histološki tip karcinoma – duktalni invazivni karcinom. Kako bi istraživana skupina bila što homogenija, svi su analizirani uzorci pripadali G2-histološkom stupnju diferenciranosti.

Kontrolnu skupinu činilo je 20 uzoraka normalnog tkiva dojke dobivenog iz okolnog tkiva dojke koje nije bilo zahvaćeno karcinomom.

Određivani su: hormon rasta, receptor za hormon rasta, plakoglobin (gama katenin) i NEDD9. Za sve su tumore rutinski određeni status estrogenskih i progesteronskih receptora kao i status proteina HER2, a za većinu tumora i proliferacijska aktivnost pomoću Ki-67.

## 4.2. Metode

Uzorci dobiveni nakon operacije obrađeni su standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, te potom rezani na debljinu od 5 $\mu$ m, deparafinizirani i bojeni standardnom metodom hemalaun-eozin. Korištena je metoda LSAB, kao vizualizacijski sustav na Dako TechMate TM automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje, uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaze protokola MSIP.

U analizu su uključeni samo oni tumori koji su imali navedene podatke: dob, vrsta operativnog zahvata, veličinu tumora, histološki tip tumora, histološki gradus, broj analiziranih i zavaćenih limfnih čvorova, status estrogenskih i progesteronskih receptora, te status proteina HER2.

### 4.2.1. Histološka analiza

Nakon standardnog hemalaun eozinskog bojenja (HE) histoloških preparata određivan je stupanj diferencijacije pomoću svjetlosnog mikroskopa, Olympus BX 51, pod povećanjem od 200 X.

### 4.2.2. Imunohistokemijska analiza

Provedena je imunohistokemijska analiza ekspresije plakoglobina, receptora za hormon rasta i hormona rasta, te NEDD9 metodom LSAB, kao vizualizacijskim sustavom na imunohistokemijskom automatskom bojaču tvrtke Dako TechMate TM, uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaze protokola MSIP. Protutijela protiv ER, PgR i HER2 nabavljena su od proizvođača Dako, Danska. Pored toga, su korištena monoklonska protutijela protiv hormona rasta (br. ABIN113503, poliklonalno zečje protutijelo, Dako, Danska), receptora hormona rasta (broj 113, klon 8D6, Novocastra, Engleska) te protiv  $\gamma$ -katenina (ab15153, Abcam, Velika Britanija) i NEDD9 (sab4200076, Abcam, Velika Britanija). Analizirane su reakcije imunoreaktivnosti u stromalnoj i epitelnoj komponenti tumora, kao i u stromalnoj i epitelnoj komponenti metastatskog tumora u limfnim čvorovima.

Koristeći svjetlosni mikroskop pri povećanju od 400X, na 1000 tumorskih stanica određuje se imunohistokemijska reakcija na mjestu najjače aktivnosti (tzv. „hot spot“). „Hot spot“ je određen pod malim povećanjem (40X) pregledavanjem čitavog odabranog prereza. Interpretira se obojenje imunohistokemijske reakcije. Rezultati imunohistokemijske reakcije određuju se semikvantitativno uzimajući u obzir intenzitet reakcije.

Intenzitet reakcije označen kao:

- „0“ predstavlja odsutnost reakcije,
- „1“ slabo izraženu reakciju, do 10% pozitivnih stanica,
- „2“ umjereno izraženu reakciju: više od 10-25% pozitivnih stanica te
- „3“ za jako izraženu reakciju, više od 25% pozitivnih stanica.

### **4.2.3 Statistička analiza**

#### **Statistička obrada podataka**

Statistička obradba podataka je provedena uz pomoć statističkih programa MedCalc (MedCalc Inc., Mariakerke, Belgija). Za analizu razlike ekspresije ispitivanih čimbenika, primjerice za razlike učestalosti NEDD9 određenog na epitelu i stromi kao i razlike učestalosti ispoljavanja NEDD9 između tumora koji nisu metastazirali i tumora koji su metastazirali, korišten je Chi-kvadrat test. Kada su utvrđene statistički značajne razlike analiza, post- hoc je učinjena s pomoću t-testa razlike proporcija. Rezultati su smatrani statistički značajnim uz  $p < 0,05$ .



## **5. REZULTATI**

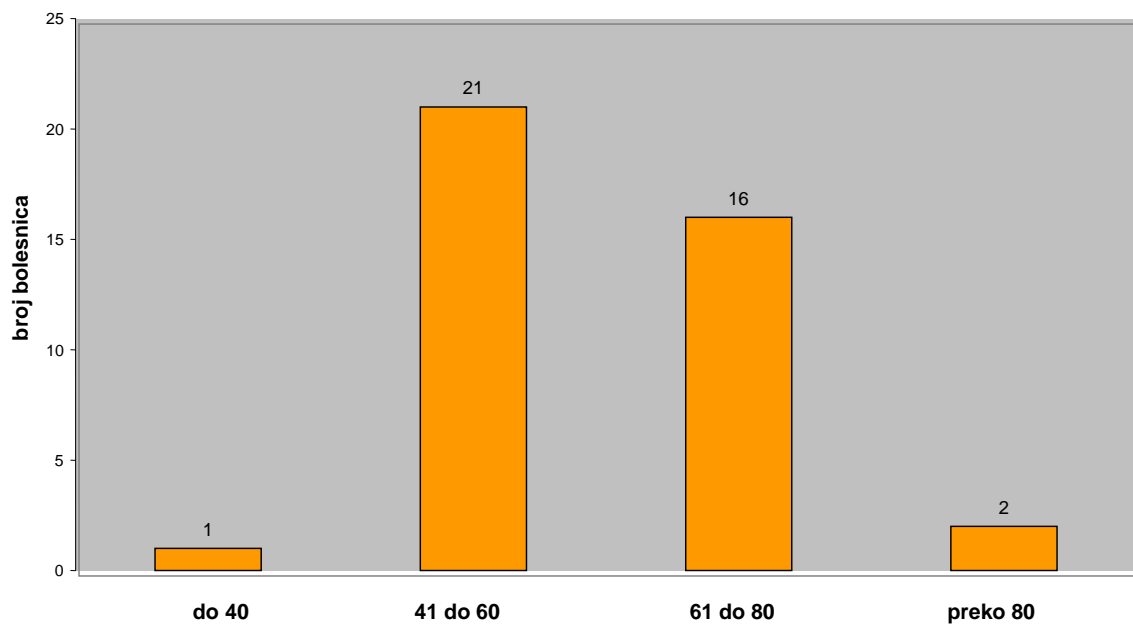
## Rezultati

Analizirano je 40 uzoraka dukalnog invazivnog karcinoma dojke, s metastazama i 40 uzoraka istog tipa karcinoma, bez dokazanih metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima. Svi analizirani uzorci bili su histološkog gradusa G2. Analizirano je i 40 uzoraka aksilarnih limfnih čvorova u kojima je dokazana prisutnost metastaza dukalnog invazivnog karcinoma dojke. Osim tumorskog tkiva, uzorci su sadržavali i okolno zdravo tkivo koje je poslužilo kao unutarnja kontrolna skupina. U tom smislu, analizirano je 20 uzoraka. Kliničkopatološka obilježja bolesnica s karcinomom dojke bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima prikazana su u tablici 1.

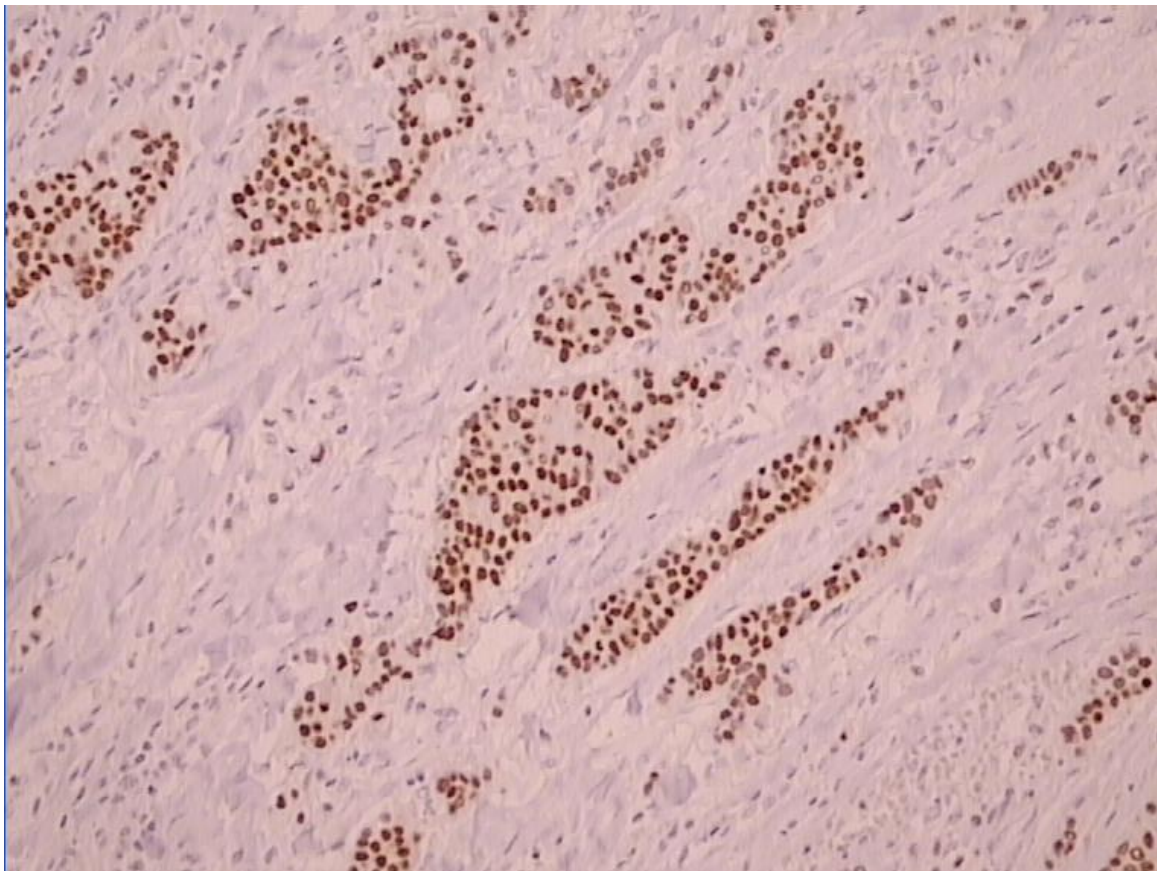
Najviše bolesnica bilo je dobne skupine od 41 do 60 godina (N=21), zatim od 60 do 80 godina (N=16), dvije preko 80 godina i jedna mlađa od 40 godina. Na slici 2. prikazana je dobna zastupljenost bolesnica bez metastaza karcinoma dojke. Većina bolesnica imala je tumor manji od 2 cm najvećeg promjera (70%). Na slikama 3 i 4 prikazana je ekspresija estrogenskih i progesteronskih receptora u tumoru bolesnica s duktalnim invazivnim karcinomom dojke, bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima.

**Tablica 1.** Kliničko- patološki podaci za bolesnice s tumorom bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima (N0, Mx).

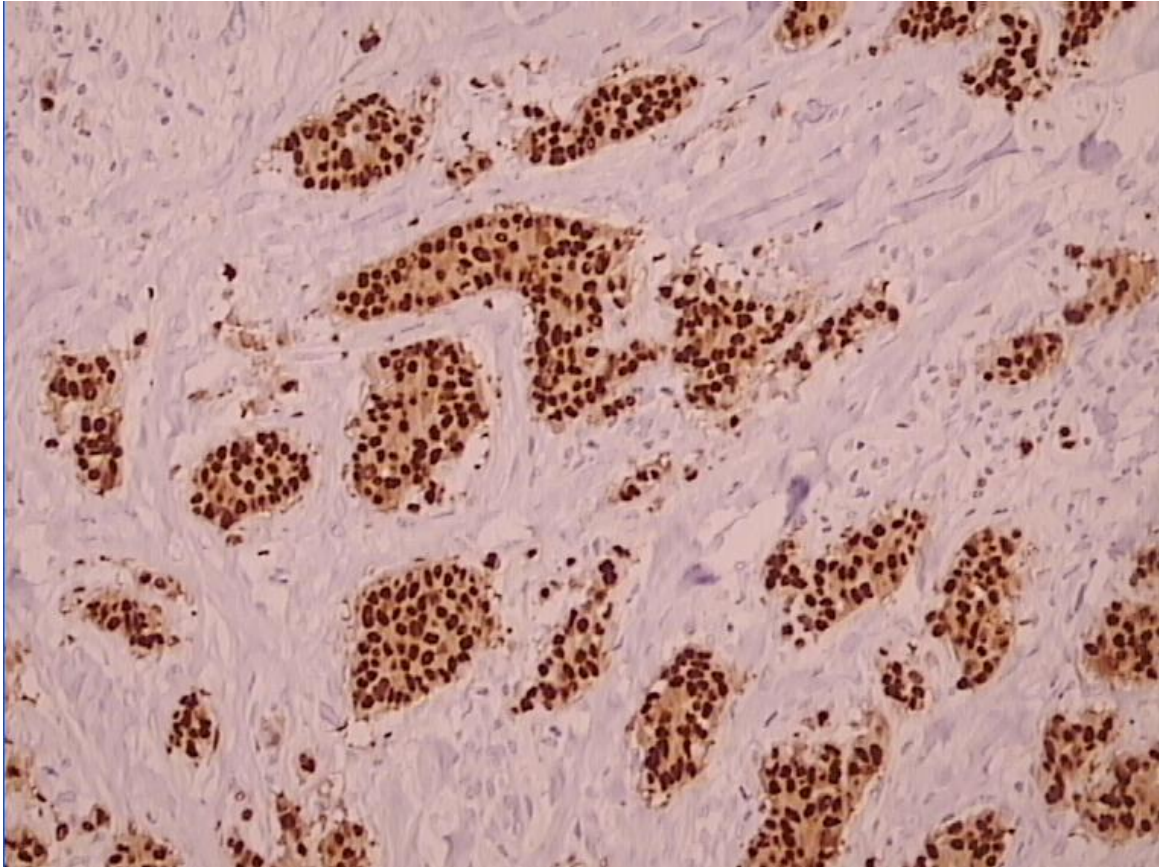
<b>Kliničko- patološki parametar</b>	<b>Broj (%)</b>
<b>Dob</b>	
do 40 godina	1 (2,5)
41 do 60 godina	21 (52,5)
61 do 80 godina	16 (40)
preko 81 godina	2 (5)
<b>Veličina tumora</b>	
≤ 2 cm	28 (70)
> 2 – 5 cm	12 (30)
<b>ER status</b>	
Odsustvo reakcije	9 (22,5)
Slabo izražena reakcija	0 (0)
Umjereno izražena	6 (15)
Jako izražena	25 (62,5)
<b>PR status</b>	
Odsustvo reakcije	10 (25,0)
Slabo izražena reakcija	0
Umjereno izražena	10 (25)
Jako izražena	20 (50)
<b>HER 2 status</b>	
Odsustvo reakcije	18 (45)
Slabo izražena	6 (15)
Umjereno izražena	7 (17,5)
Jako izražena	9 (22,5)



Slika 2. Dobna zastupljenost bolesnica s karcinomom dojke bez metastaza.



Slika 3. Pozitivna reakcija na estrogenske receptore u više od 90% stanica u bolesnice s duktalnim invazivnim karcinomom dojke bez metastaza (x200)



Slika 4. Pozitivna reakcija na progesteronske receptore u više od 90% stanica u bolesnice s duktalnim invazivnim karcinomom bez metastaza u limfne čvorove (x200)

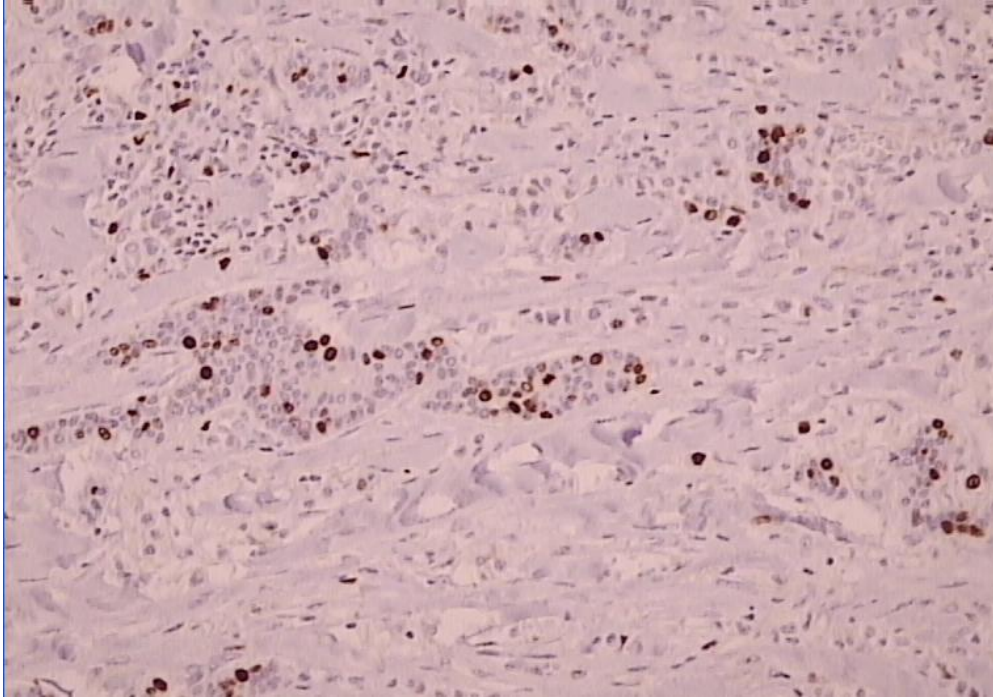
Kliničkopatološka obilježja bolesnica s metastazama u regionalne aksilarne limfne čvorove prikazana su u tablici 2. Proliferacijska aktivnost određena imunohistokemijski pomoću Ki-67 prikazana je na slici 5. Kako u nekim biopsijama nije bilo dovoljno materijala, analizirano je ukupno 27 karcinoma dojke bez metastaza, a ekspresija Ki-67 se kretala od 1-70%, prosječno 23,5%. Od tumora s metastazama dovoljno je materijala bilo za 30 uzoraka, a ekspresija Ki-67 je bila od 5-72%, prosječno 25,6%. Jako izražena ekspresija HER2 prikazana je na slici 6.

Većina bolesnica je bila u dobi od 41-60 godina (Slika 7), dok je tumor u više od 50% bolesnica ove skupine mjerio od 2 do 5 cm (Slika 8).

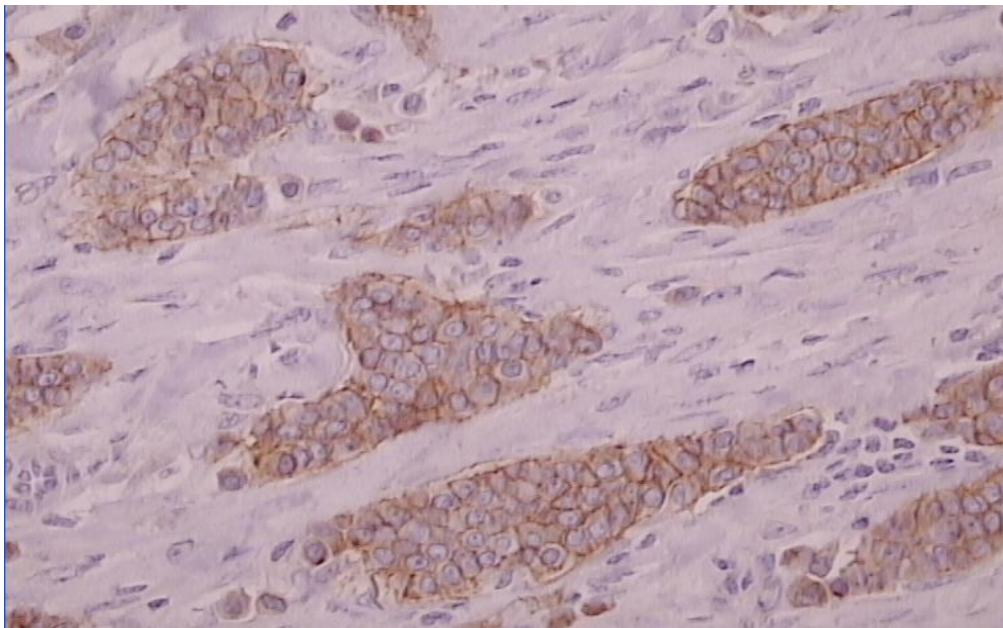
**Tablica 2.** Kliničko patološki podaci za bolesnice s metastazama u limfnim čvorovima aksile (N1,MX i N2MX).

Kliničko-patološki parametar	Broj (%)
<b>Dob</b>	
Do 40 godina	3 (7,5)
41 do 60 godina	18 (45)
61 do 80 godina	16 (40)
Preko 80 godina	3 (7,5)
<b>Veličina tumora</b>	
≤ 2 cm	14 (35)
> 2 do 5cm	21 (52,5)
>5 cm	5 (12,5)
<b>ER status</b>	
Odsustvo reakcije	8 (20)
Slabo izražena reakcija	8 (20)
Umjereno izražena	1 (2,5)
Jako izražena	23 (57,5)
<b>PR status</b>	
Odsustvo reakcije	10 (25,0)
Slabo izražena	5 (12,5)
Umjereno izražena	3 (7,5)
Jako izražena	22 (55,0)
<b>HER 2 status</b>	
Odsustvo reakcije	30 (75,0)
Slabo izražena reakcija	0
Umjereno izražena	2 (5,0)
Jako izražena	8(20,0)

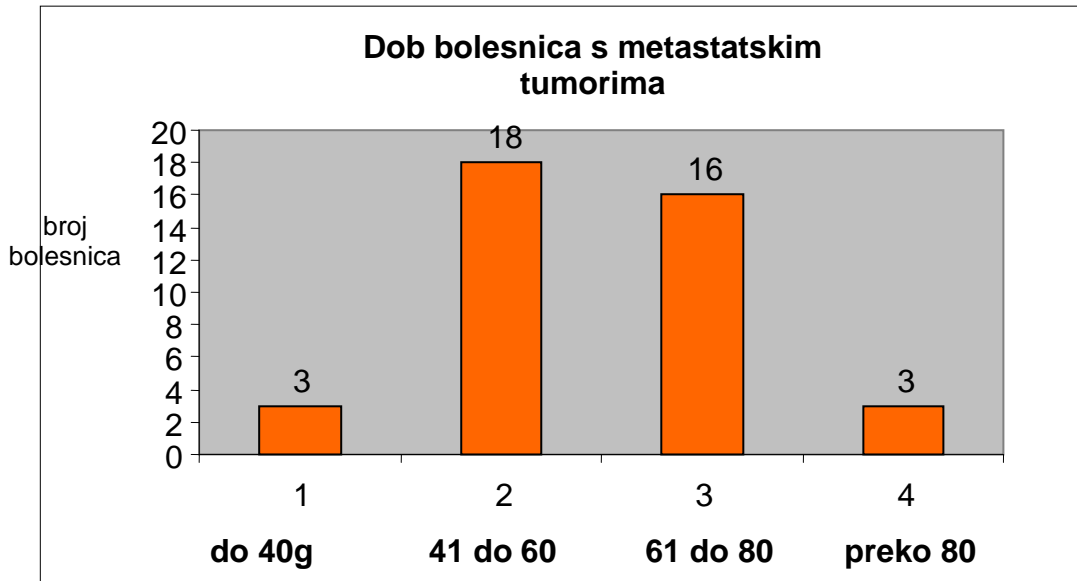




Slika 5. Proliferacijska aktivnost (Ki-67) određena imunohistokemijom. Pozitivno je približno 20% stanica s duktalnog invazivnog karcinoma, bez metastaza u limfne čvorove (x200)

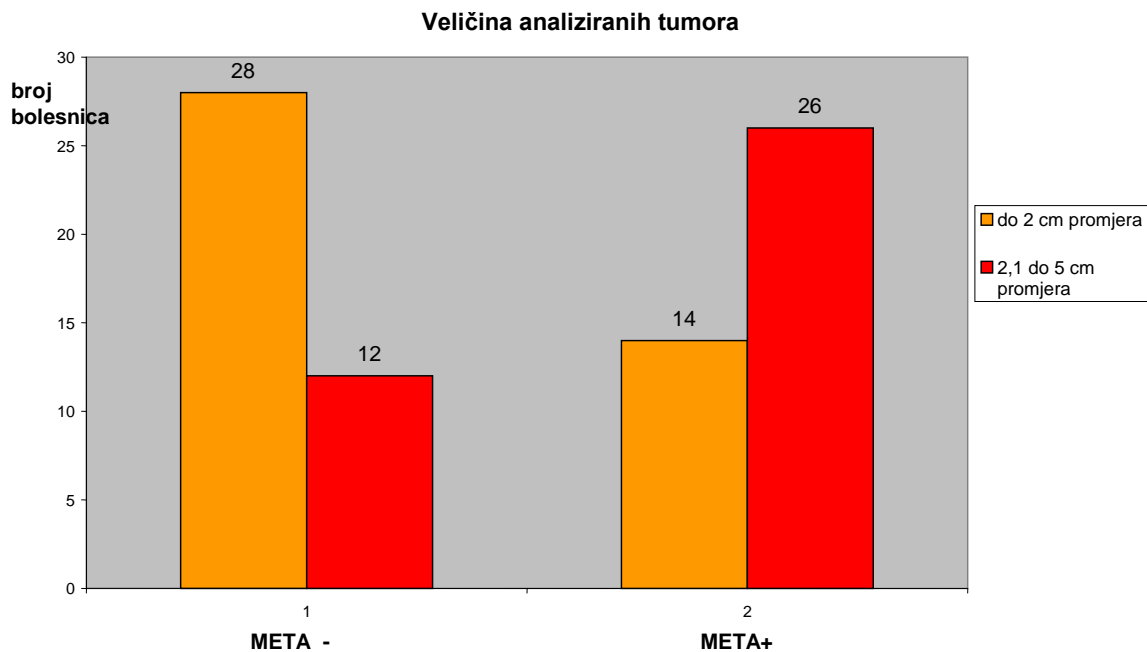


Slika 6. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na HER2 (3+) u stanicama duktalnog invazivnog karcinoma dojke koji je metastazirao u aksilarne limfne čvorove (x400)



**Slika 7.** Dobna zastupljenost bolesnica s metastazama karcinoma dojke.

Najviše bolesnica, njih 18, bilo je iz dobne skupine od 41 do 60 godina, 16 ih je bilo dobne skupine od 61 do 80, preko 80 godina 3 bolesnica, dok su samo tri bile mlađe od 40 godina.



**Slika 8.** Odnos veličine tumora u obje skupine: nemetastatski i metastatski



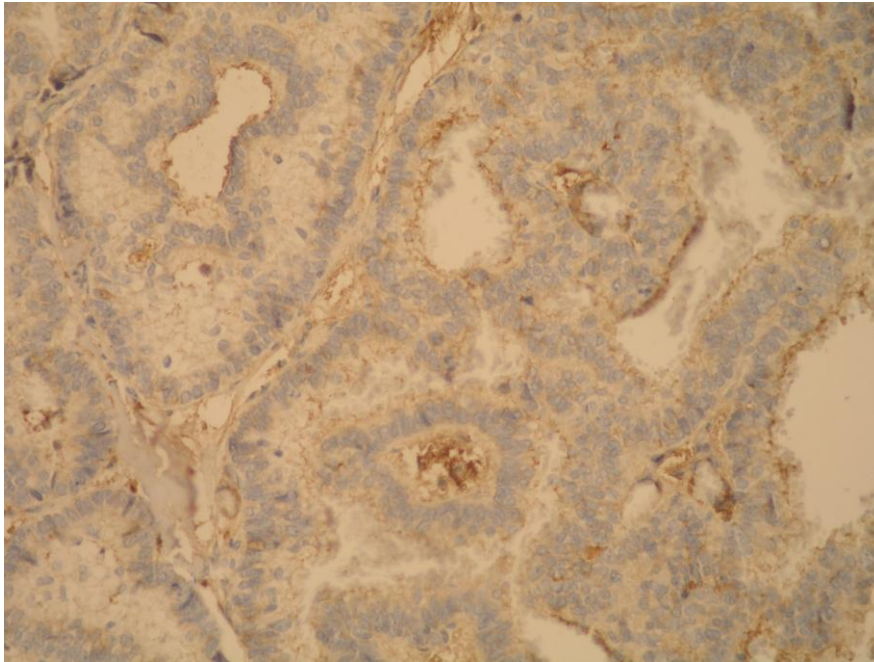
Na slici 8. vidi se da je velik broj metastazirajućih tumora bio promjera  $\geq 2$  do 5 cm (N=26) . U skupini nemetastazirajućih tumora samo je 12 bilo ove veličine. U potonjoj skupini prevladali su (N=28) tumori manje veličine, promjera  $\leq 2$ ,) dok je u skupini metastazirajućih tumora samo 14 uzoraka bilo ove veličine. Ekspresija hormona rasta, receptora hormona rasta, plakoglobina i NEDD9 u skupini bolesnica s duktalnim invazivnim karcinomom bez metastaza prikazana je u Tablici 3. i na slikama 9 i 10.

**Tablica 3.** Ekspresija NEDD9, plakoglobina, hormona rasta i receptora hormona rasta u prvoj skupini tumora, bez metastaza.

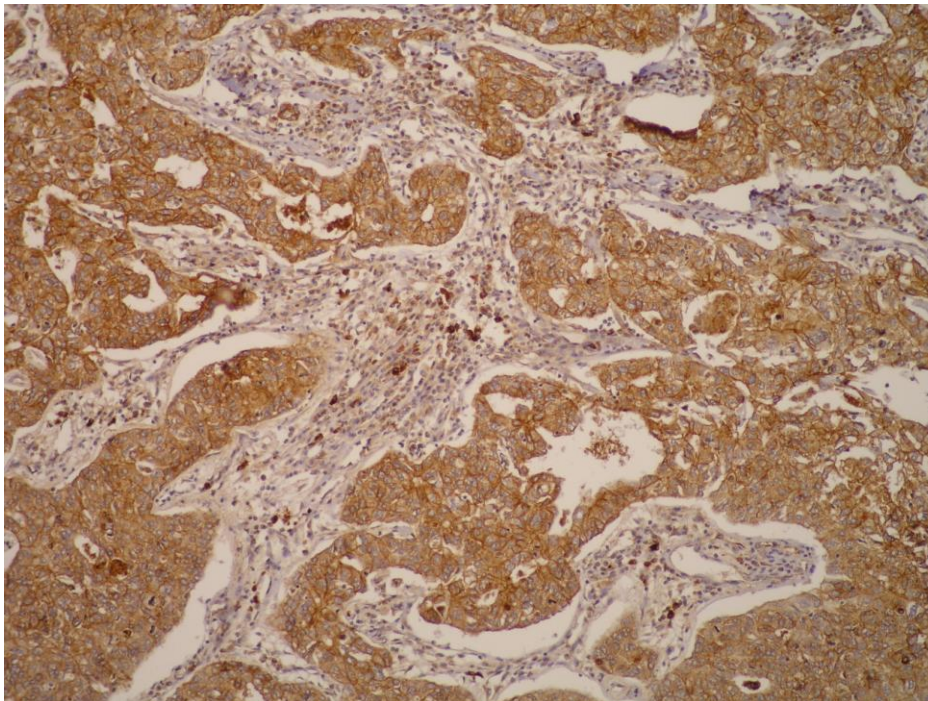
	Učestalost javljanja N / %		Statistika	<i>post-hoc</i>
	Epitel (n=40)	Stroma (n=40)		
<b>NEDD9</b>				
Odsustvo reakcije	8 (20,0)	28 (70,0)	$\chi^2=51,42$ P<0,001 *	
Slabo izražena	1 (2,6)	12 (30,0)		
Umjereno izražena	4 (10,0)	0		
Jako izražena	27 (67,4)	0		P<0,001 *
<b>PLAKOGLOBIN</b>				
Odsustvo reakcije	14 (35,0)	30 (75,0)	$\chi^2=41,82$ P<0,001 *	
Slabo izražena	0	10 (25,0)		
Umjereno izražena	0	0		
Jako izražena	26 (65,0)	0		P<0,001 *
<b>RHR</b>				
Odsustvo reakcije	26 (65,0)	9 (22,5)	$\chi^2=27,42$ P<0,001 *	
Slabo izražena	14 (35,0)	12 (30,0)		
Umjereno izražena	0	9 (22,5)		P=0,032 *
Jako izražena	0	10 (25,0)		P=0,001 *
<b>HR</b>				
Odsustvo reakcije	25 (62,5)	18 (45,0)	$\chi^2=1,81$ P=0,149	
Slabo izražena	15 (37,5)	22 (55,0)		
Umjereno izražena	0	0		
Jako izražena	0	0		

\* označava statističku značajnost

Kada je  $P < 0,05$  tada postoji statistički značajna razlika s obzirom na izražaj analiziranog čimbenika, pri čemu se posebno vrednuje imunoreaktivnost epitelne i stromalne komponente.



Slika 9. Ekspresija hormona rasta u duktalnom invazivnom karcinomu dojke bez metastaza u aksilarnom limfnom čvoru (x40).



Slika 10. Ekspresija plakoglobina u duktalnom invazivnom karcinomu dojke bez metastaza u aksilarnom limfnom čvoru (x100).

Ekspresija hormona rasta i receptora hormona rasta, NEDD9 i plakoglobina, u tkivu tumora koji su metastazirali u aksilarne limfne čvorove prikazana je u Tablici 4.

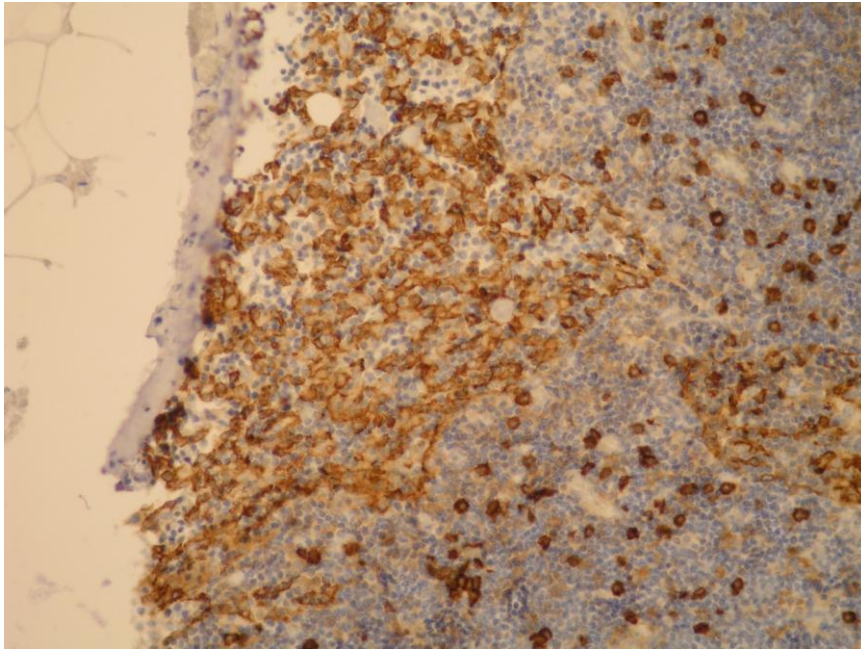
**Tablica 4.** Ekspresija NEDD9, plakoglobina, hormona rasta i receptora za hormon rasta u tkivu tumora koji su metastazirali u aksilarne limfne čvorove

	Učestalost avljanja N (%)		Statistika	post-hoc
	Epitel (n=40)	Stroma (n=40)		
<b>NEDD9</b>				
Odsustvo reakcije	8 (20,0)	22 (55,0)	$\chi^2=56,53$ P<0,001*	
Slabo izraženo	0	18 (45,0)		
Umjerenno izraženo	0	0		
Jako izraženo	32 (80,0)	0		P<0,001*
<b>PLAKOGLOBIN</b>				
Odsustvo reakcije	0	35 (87,5)	$\chi^2=82,51$ P<0,001*	
Slabo izraženo	3 (7,5)	5 (12,5)		
Umjerenno izraženo	3 (7,5)	0		
Jako izraženo	34 (85,0)	0		P<0,001*
<b>RHR</b>				
Odsustvo reakcije	21 (52,5)	13 (32,5)	$\chi^2=10,95$ P=0,012*	
Slabo izraženo	15 (37,5)	10 (25,0)		
Umjerenno izraženo	1 (2,5)	5 (12,5)		
Jako izraženo	3 (7,5)	12 (30,0)		P=0,012*
<b>HR</b>				
Odsustvo reakcije	27 (67,5)	23 (57,5)	$\chi^2=0,48$ P=0,488	
Slabo izraženo	13 (32,5)	17 (42,5)		
Umjerenno izraženo	0	0		
Jako izraženo	0	0		

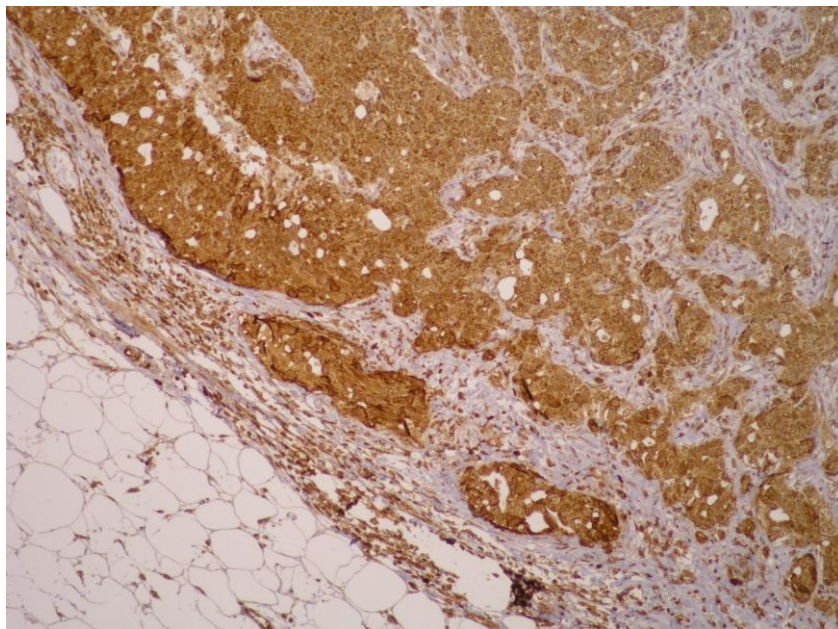
\*označava statističku značajnost



Ekspresija NEDD9, plakoglobina, hormona rasta i receptora hormona rasta u metastazama karcinoma dojke u aksilarne limfne čvorove prikazana je na slikama 11 i 12 i u Tablici 5.



Slika 11. Ekspresija receptora hormona rasta u metastazi dukalnog invazivnog karcinoma dojke u limfnom čvoru aksile (x40)



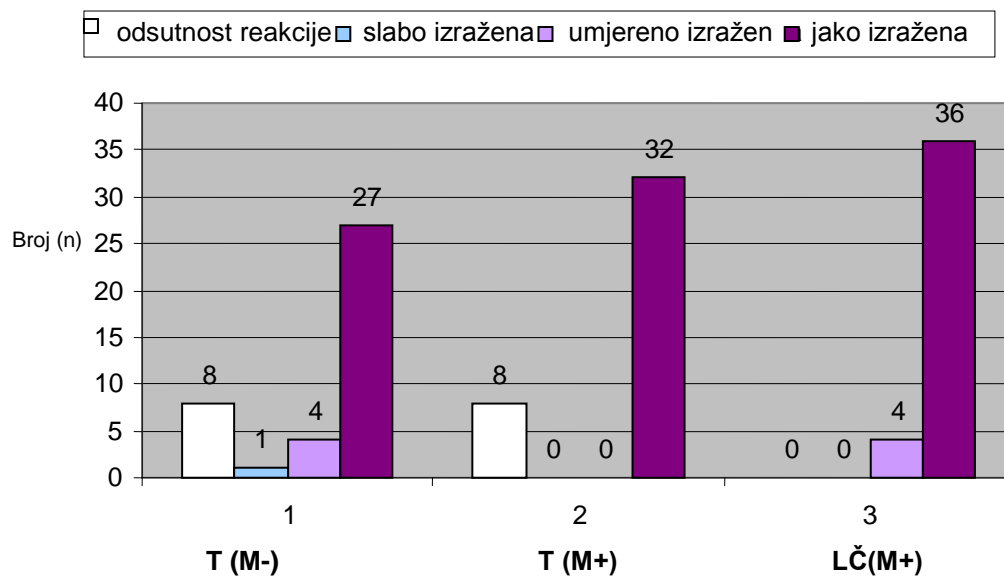
Slika 12. Ekspresija NEDD9 u metastazi dukalnog invazivnog karcinoma dojke u aksilarnom limfnom čvoru.

**Tablica 5.** Ekspresija NEDD9, plakoglobina, hormona rasta i receptora hormona rasta u metastazama karcinoma dojke u aksilarne limfne čvorove

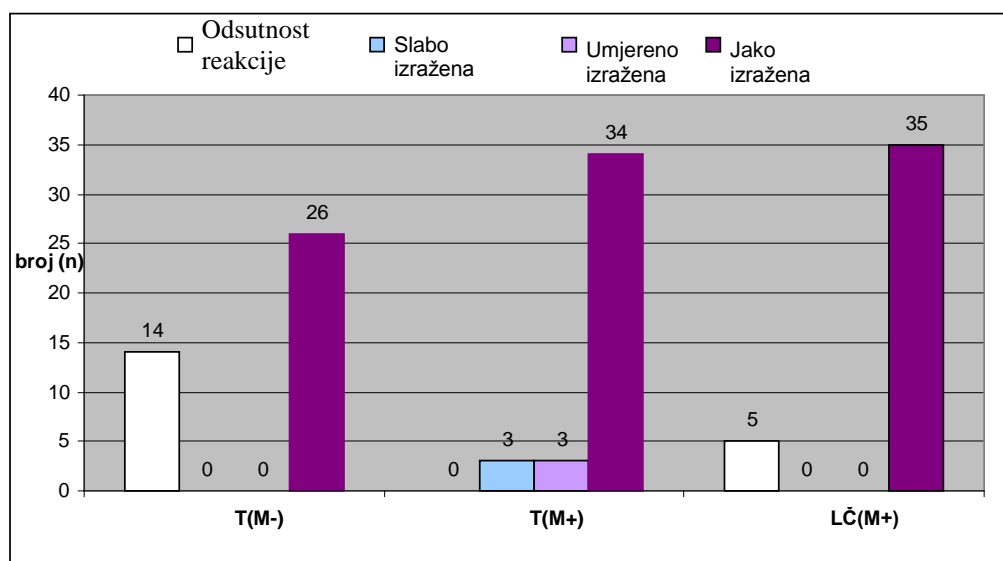
	Učestalost javljanja N (%)		Statistika	post-hoc
	Epitel (n=40)	Stroma (n=40)		
<b>NEDD9</b>				
Odsustvo reakcije	0	18 (45,0)	$\chi^2=72,42$ P<0,001*	
Slabo izraženo	0	20 (50,0)		
Umjereno izraženo	4 (10,0)	0		
Jako izraženo	36 (90,0)	2 (5,0)		P<0,001*
<b>PLAKOGLOBIN</b>				
Odsustvo reakcije	5 (12,5)	31 (77,5)	$\chi^2=62,78$ P<0,001*	
Slabo izraženo	0	9 (22,5)		
Umjereno izraženo	0	0		
Jako izraženo	35 (87,5)	0		P<0,001*
<b>RHR</b>				
Odsustvo reakcije	0	0	$\chi^2=31,75$ P<0,001*	
Slabo izraženo	35 (87,5)	10 (25,0)		
Umjereno izraženo	2 (5,0)	11 (27,5)		
Jako izraženo	3 (7,5)	19 (47,5)		P<0,001*
<b>HR</b>				
Odsustvo reakcije	18 (45,0)	18 (45,0)	P=1,0	
Slabo izraženo	22 (55,0)	22 (55,0)		
Umjereno izraženo	0	0		
Jako izraženo	0	0		

\*označava statističku značajnost

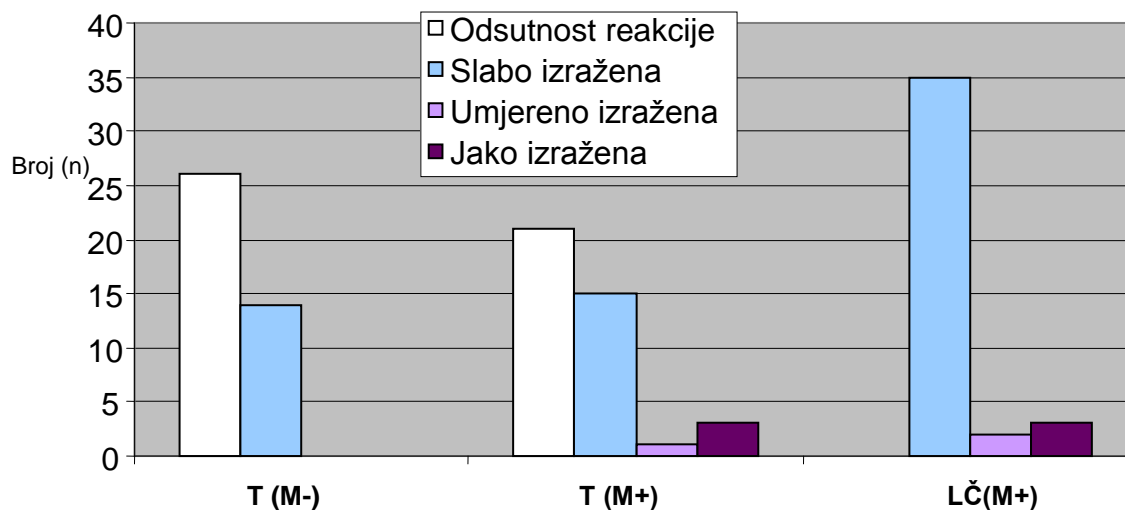
Ekspresija NEDD9 u sve tri istraživane skupine prikazana je na slici 13, ekspresija plakoglobina na slici 14, ekspresija receptora za hormon rasta na slici 15, te naposljetku ekspresija hormona rasta na slici 16.



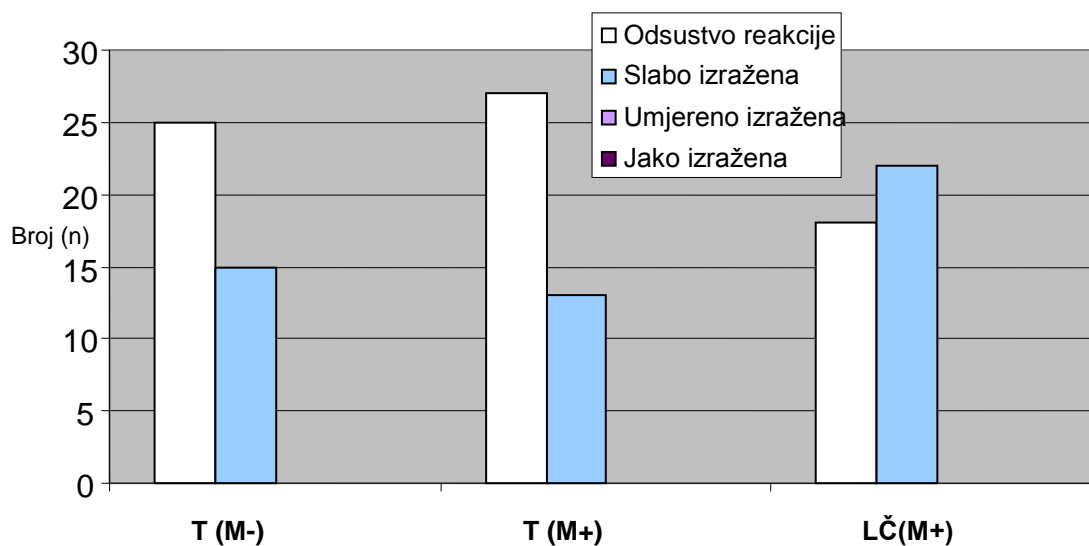
**Slika 13.** Ekspresija NEDD9 određenog u epitelu tumora bez metastaza, tumora s metastazama i u aksilarnim limfnim čvorovima s metastazama



**Slika 14.** Ekspresija plakoglobina u epitelu tumora dojke bez metastaza, tumora s metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima i u aksilarnim limfnim čvorovima s metastazama.

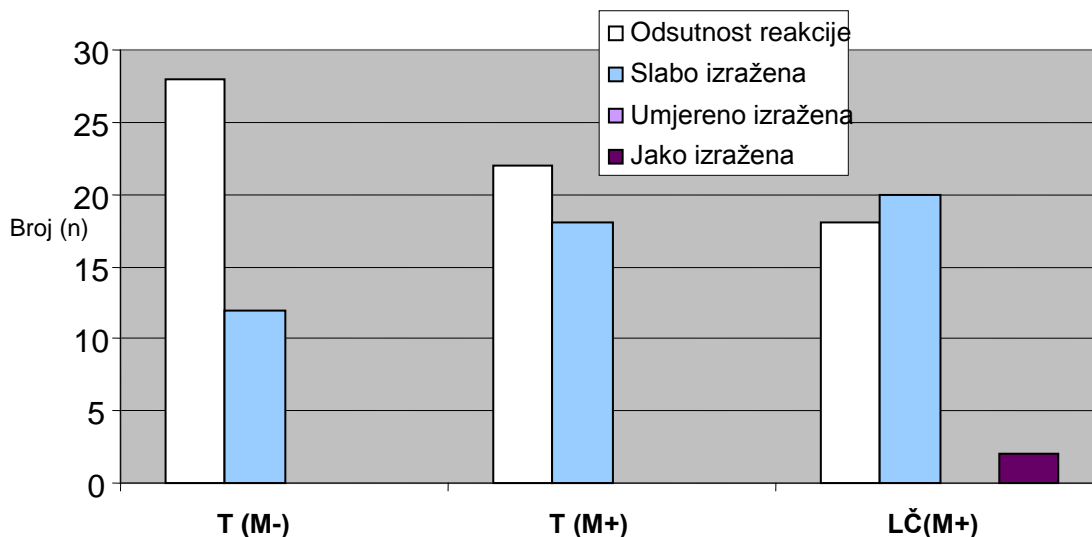


**Slika 15.** Ekspresija RHR određenog u epitelu tumora bez metastaza, tumora s metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima i u aksilarnim limfnim čvorovima s metastazama.

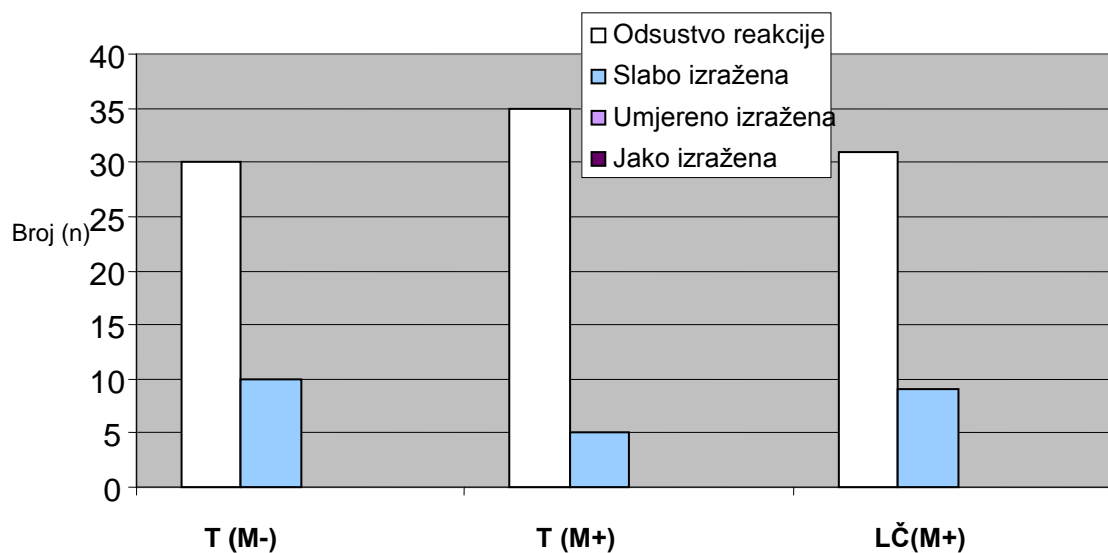


**Slika 16.** Ekspresija HR određenog u epitelu tumora bez metastaza, tumora s metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima i u aksilarnim limfnim čvorovima s metastazama.

Ekspresija NEDD9, plakoglobina, hormona rasta i receptora hormona rasta u stromi tumora bez metastaza, sa metastazama i u metastazama karcinoma dojke u aksilarne limfne čvorove prikazana je u slikama 17-20.

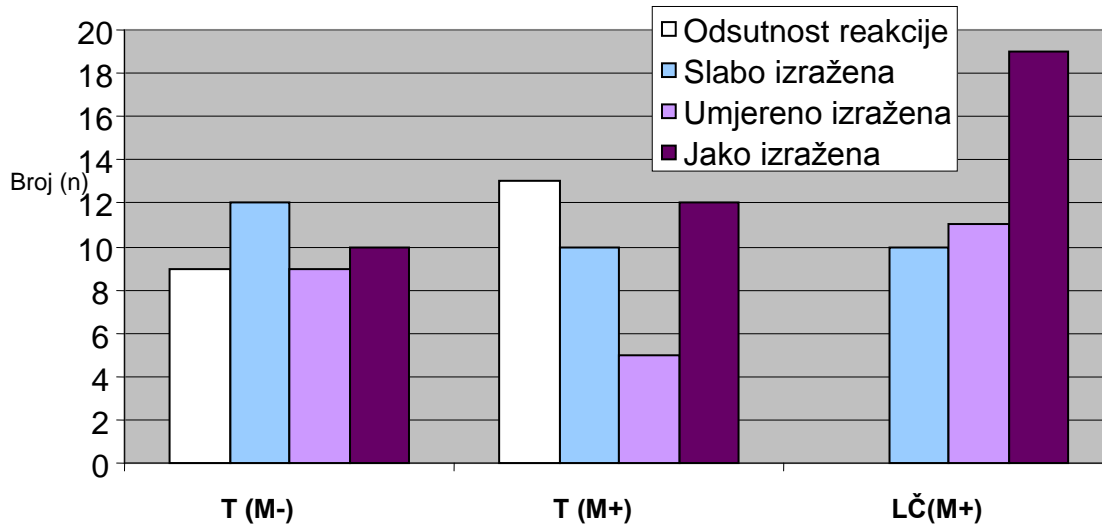


**Slika 17.** Ekspresija NEDD9 određenog u stromi tumora bez metastaza, tumora s metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima i u aksilarnim limfnim čvorovima s metastazama.

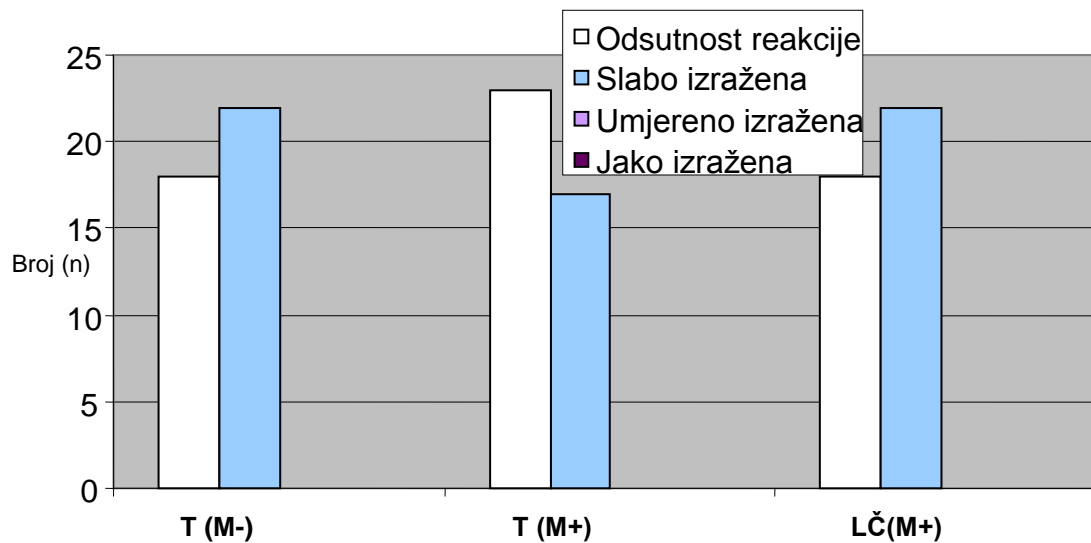


**Slika 18.** Ekspresija plakoglobina određenog u stromi tumora bez metastaza, tumora s metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima i u aksilarnim limfnim čvorovima s metastazama.





**Slika 19.** Ekspresija RHR određenog u stromi tumora bez metastaza, tumora s metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima i u aksilarnim limfnim čvorovima s metastazama.



**Slika 20.** Ekspresija HR određenog u stromi tumora bez metastaza, tumora s metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima i u aksilarnim limfnim čvorovima s metastazama.

Rezultati dobiveni usporedbom ekspresije ispitivanih čimbenika u epitelnim stanicama tumora s i bez metastaza prikazani su u Tablici 6, a usporedba ekspresije u stromi u Tablici 7.

**Tablica 6.** Usporedba faktora NEDD9 i ostalih čimbenika određenih u epitelu između tumora bez metastaza i s metastazama

	Učestalost javljanja N (%)		Statistika	post-hoc
	bez metastaza (n=40)	s metastazama (n=40)		
<b>NEDD9</b>				
Odsustvo reakcije	8 (20,0)	8 (20,0)	$\chi^2=5,42$ P=0,143	
Slabo izraženo	1 (2,6)	0		
Umjereno izraženo	4 (10,0)	0		
Jako izraženo	27 (67,4)	32 (80,0)		
<b>PLAKOGLOBIN</b>				
Odsustvo reakcije	14 (35,0)	0	$\chi^2=21,07$ P<0,001*	
Slabo izraženo	0	3 (7,5)		
Umjereno izraženo	0	3 (7,5)		
Jako izraženo	26 (65,0)	34 (85,0)		P=0,042*
<b>RHR</b>				
Odsustvo reakcije	26 (65,0)	21 (52,5)	$\chi^2=4,56$ P=0,206	
Slabo izraženo	14 (35,0)	15 (37,5)		
Umjereno izraženo	0	1 (2,5)		
Jako izraženo	0	3 (7,5)		
<b>HR</b>				
Odsustvo reakcije	25 (62,5)	27 (67,5)	$\chi^2=0,55$ P=0,815	
Slabo izraženo	15 (37,5)	13 (32,5)		
Umjereno izraženo	0	0		
Jako izraženo	0	0		

\*označava statističku značajnost

**Tablica 7.** Usporedba analiziranih čimbenika određenih u stromi između tumora bez metastaza i s metastazama.

	Učestalost javljanja N (%)		Statistika
	bez metastaza (n=40)	s metastazama (n=40)	
<b>NEDD9</b>			
Odsustvo reakcije	28 (70,0)	22 (55,0)	$\chi^2=1,33$ P=0,248
Slabo izraženo	12 (30,0)	18 (45,0)	
Umjereno izraženo	0	0	
Jako izraženo	0	0	
<b>PLAKOGLOBIN</b>			
Odsustvo reakcije	30 (75,0)	35 (87,5)	$\chi^2=1,31$ P=0,252
Slabo izraženo	10 (25,0)	5 (12,5)	
Umjereno izraženo	0	0	
Jako izraženo	0	0	
<b>RHR</b>			
Odsustvo reakcije	9 (22,5)	13 (32,5)	$\chi^2=2,23$ P=0,525
Slabo izraženo	12 (30,0)	10 (25,0)	
Umjereno izraženo	9 (22,5)	5 (12,5)	
Jako izraženo	10 (25,0)	12 (30,0)	
<b>HR</b>			
Odsustvo reakcije	18 (45,0)	23 (57,5)	$\chi^2=5,42$ P=0,267
Slabo izraženo	22 (55,0)	17 (42,5)	
Umjereno izraženo	0	0	
Jako izraženo	0	0	

\*označava statističku značajnost

Ekspresija svih čimbenika određenih u stromi tumora koji nisu metastazirali NE razlikuje se statistički značajno od njihove ekspresije u stromi tumora s metastazama (svi  $P > 0,05$ ).

Ekspresija čimbenika koji se rutinski analiziraju u karcinomima dojke uključujući ekspresiju estrogenskih i progesteronskih receptora te HER2 prikazana je u Tablici 8.

**Tablica 8.** Ekspresija ER, PR i HER2 u tumora bez i s metastazama.

	Učestalost javljanja N (%)		Statistika
	bez metastaza (n=40)	metastaze (n=40)	
<b>ER</b>			
Odsustvo reakcije	9 (22,5)	8 (20,0)	$\chi^2=11,72$ P=0,008*
Slabo izraženo	0	8 (20,0)	
Umjereno izraženo	6 (15,0)	1 (2,5)	
Jako izraženo	25 (62,5)	23 (57,5)	
<b>PR</b>			
Odsustvo reakcije	10 (25,0)	10 (25,0)	$\chi^2=8,86$ P=0,031*
Slabo izraženo	0	5 (12,5)	
Umjereno izraženo	10 (25,0)	3 (7,5)	
Jako izraženo	20 (50,0)	22 (55,0)	
<b>HER2</b>			
Odsustvo reakcije	18 (45,0)	30 (75,0)	$\chi^2=11,84$ P=0,008*
Slabo izraženo	6 (15,0)	0	
Umjereno izraženo	7 (17,5)	2 (5,0)	
Jako izraženo	9 (22,5)	8 (20,0)	

\*označava statističku značajnost

**Tablica 9.** Korelacija ER, PR i HER-2 i analiziranih čimbenika u tumorima bez metastaza

Varijabla	Označene korelacije: * $p < 0,05000$							
	NEDD9 epitel	NEDD9 stroma	Plakoglobin epitel	Plakoglobin stroma	RHR epitel	RHR stroma	HR epitel	HR stroma
ER	0,086486	<b>-0,40686*</b>	0,261217	-0,149596	-0,07302	0,055436	<b>0,373892*</b>	<b>0,33191*</b>
PR	0,204406	-0,101757	0,105436	0,009910	-0,30099	-0,09427	-0,205535	0,255673
HER-2	0,290569	0,053021	0,052007	-0,042151	-0,11137	0,194021	0,141300	-0,22599

**Tablica 10.** Korelacija ER, PR i HER-2 s ispitivanim čimbenicima u tumorima s metastazama

Varijabla	Označene korelacije : * $p < 0,05000$							
	NEDD9 epitel	NEDD9 stroma	Plakoglobin epitel	Plakoglobin stroma	RHR epitel	RHR stroma	HR epitel	HR stroma
ER	-0,162964	-0,158942	0,021974	0,310775	<b>-0,31616*</b>	0,084232	-0,090499	-0,035883
PR	-0,050984	0,041078	0,020624	0,199268	-0,029816	-0,116704	-0,198191	-0,092617
HER-2	-0,074940	-0,076081	<b>-0,38576*</b>	0,238963	-0,157994	0,157941	<b>0,41161*</b>	-0,184183

## 5.1. Statistička analiza rezultata

Ekspresija NEDD9 u tumorima bez metastaza statistički se značajno razlikuje s obzirom radi li se o epitelu ili stromi ( $P < 0,001$ ). NEDD9 je statistički značajno u većem postotku jako izražen u epitelu u odnosu na stromu (67,4% vs. 0;  $P < 0,001$ ).

Ekspresija plakoglobina u tumorima bez metastaza statistički se značajno razlikuje obzirom na to radi li se o epitelu ili stromi ( $P < 0,001$ ). Plakoglobin je u statistički značajno većem postotku jako izražen u epitelu, u odnosu na stromu (65,0% vs. 0;  $P < 0,001$ ).

Ekspresija RHR u tumorima bez metastaza statistički se značajno razlikuje s obzirom na to radi li se o epitelu ili stromi ( $P < 0,001$ ). RHR je u statistički značajno većem postotku jako izražen i umjereno izražen u stromi u odnosu na epitel (jako izražena: 25,0% vs. 0;  $P = 0,001$ , umjereno izražena: 22,5% vs. 0;  $P = 0,032$ ).

Ekspresija HR u tumorima bez metastaza statistički se značajno ne razlikuje s obzirom na to radi li se o epitelu ili stromi ( $P = 0,149$ ). U obje komponente je izrazito slaba.

Ekspresija NEDD9 u tumorima s metastazama statistički se značajno razlikuje s obzirom na to radi li se o epitelu ili stromi ( $P < 0,001$ ). NEDD9 je u statistički značajno većem postotku jako izražen u epitelu, u odnosu na stromu (80,0% vs. 0;  $P < 0,001$ ).

Ekspresija plakoglobina u tumorima s metastazama statistički se značajno razlikuje s obzirom na to radi li se o epitelu ili stromi ( $P < 0,001$ ). Plakoglobin je u statistički značajno većem postotku jako izražen u epitelu, u odnosu na stromu (85,0% vs. 0;  $P < 0,001$ ).

Ekspresija RHR u tumorima s metastazama se statistički značajno razlikuje s obzirom na to radi li se o epitelu ili stromi ( $P = 0,012$ ). RHR je u statistički značajno manjem postotku jako izražen u epitelu, u odnosu na stromu (jako izražena: 7,5% vs. 30,0;  $P = 0,012$ ).

Ekspresija HR u tumorima s metastazama se statistički značajno ne razlikuje s obzirom radi li se o epitelu ili stromi ( $P = 0,488$ ). U obje je komponente izrazito slaba.

Ekspresija NEDD9 u metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima se statistički značajno razlikuje s obzirom na to radi li se o epitelu ili stromi ( $P < 0,001$ ). NEDD9 je u statistički značajno većem postotku jako izražen u epitelu u odnosu na stromu (90,0% vs. 5%;  $P < 0,001$ ).

Ekspresija plakoglobina u metastazama u aksilarnim čvorovima se statistički značajno razlikuje s obzirom na to radi li se o epitelu ili stromi ( $P < 0,001$ ). Plakoglobin je u statistički značajno većem postotku jako izražen u epitelu, u odnosu na stromu (87,5% vs. 0;  $P < 0,001$ ).

Ekspresija RHR u metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima se statistički značajno razlikuje s obzirom na to radi li se o epitelu ili stromi ( $P = 0,012$ ). RHR je u statistički

značajno manjem postotku jako izražen u epitelu u odnosu na stromu (jako izražena: 7,5% vs. 47,5;  $P < 0,001$ ).

Ekspresija HR u metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima se statistički značajno ne razlikuje s obzirom na to radi li se o epitelu ili stromi ( $P=1,00$ ). U obje komponente je izrazito slaba.

Ekspresija NEDD9 u epitelu tumora bez metastaza ne razlikuje se statistički značajno u odnosu na ekspresiju NEDD9 u epitelu tumora s metastazama ( $P=0,143$ ).

Ekspresija plakoglobina u epitelu tumora bez metastaza je statistički značajno manja u usporedbi s ekspresijom plakoglobina u epitelu tumora s metastazama ( $P < 0,001$ ). Jako izražen plakoglobin se u epitelu tumora s metastazama javlja u većem postotku (85% vs 65%;  $P=0,042$ ).

Ekspresija RHR u epitelu tumora bez metastaza ne razlikuje se statistički značajno u odnosu na ekspresiju RHR u epitelu tumora s metastazama ( $P=0,206$ ).

Ekspresija HR u epitelu tumora bez metastaza ne razlikuje se statistički značajno u odnosu na ekspresiju HR u epitelu tumora s metastazama ( $P=0,815$ ).

Ekspresija ER, PR i HER2 ne razlikuje se statistički značajno u skupini tumora bez metastaza sa skupinom tumora sa metastazama.

Jako izražena ekspresija ER javlja se u 62,5% uzoraka u tumorima bez metastaza i u 57,5% uzoraka tumora sa metastazama.

Jako izražena ekspresija PR javlja se u 50,0% uzoraka tumora bez metastaza i u 55,0% uzoraka tumora sa metastazama.

Jako izražena reakcija HER2 javlja se u 22,5% uzoraka bez metastaza i u 20,0% uzoraka sa metastazama.

Utvrđena je statistički značajna korelacija između ekspresije ER i NEDD9 u stromi tumora te ekspresije ER i hormona rasta, kao i ekspresije ER i receptora hormona rasta, u epitelu, u karcinomima dojke bez metastaza ( $p < 0,05$ ).

Pored toga, utvrđena je statistički značajna korelacija između ekspresije ER i ekspresije receptora hormona rasta, te ekspresije HER2 i ekspresije plakoglobina, kao i ekspresije HER2 i hormona rasta u epitelu karcinoma sa metastazama ( $p < 0,05$ ).

## **6. RASPRAVA**



## Rasprava

Karcinom dojke je najčešća maligna bolest u žena. U većini razvijenih zemalja broj žena oboljelih od karcinoma dojke u stalnom je porastu, a sve je češća pojava u mladih žena, što se objašnjava promjenama u načinu života. Usprkos tome, u posljednjih godina je u razvijenim zemljama Europe i SAD došlo do pada mortaliteta zahvaljujući programima ranog otkrivanja – mamografskog probira, boljoj dijagnostici općenito, kao i napretku u adjuvantnoj hormonskoj i kemoterapiji, u posljednje vrijeme sve izraženijem personaliziranom pristupu liječenju uz rutinsko određivanje ER, PR, HER2 i Ki-67. Kao rezultat metoda koje omogućuju bolje i ranije otkrivanje karcinoma, posebice okultnog, većina bolesnica danas dolazi na liječenje u ranom stadiju bolesti. Oksfordska meta-analiza jasno je pokazala da adjuvantna hormonska terapija, odnosno kemoterapija značajno snižava rizik ponovne pojave bolesti, kao i smrti od raka dojke (1).

Rak dojke je najučestalija bolest ženske populacije, od čega oko 10 % slučajeva otpada na nasljedne oblike karcinoma dojke (1, 3, 18, 27).

Točan mehanizam nastanka i širenja raka dojke još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Mnoga istraživanja novijeg datuma ukazuju da je za proliferaciju, apoptozu, migratornu sposobnost i diferencijaciju tumora, osim epitelne, bitna i stromalna komponenta tumora, koja tumorskim stanicama olakšava lokalno i udaljeno širenje (49, 50, 51).

U provedenom istraživanju analizirane su dvije skupine od po 40 bolesnica oboljelih od dukalnog invazivnog, srednje diferenciranog (G2) karcinoma dojke. U većine bolesnica je učinjena radikalna mastektomija, s odstranjenjem pazušnih limfnih čvorova. U novije se vrijeme u liječenju karcinoma dojke primjenjuju pošteđni operativni zahvati, kojima se odstranjuje manji dio dojke s tumorom, s ciljem bržeg oporavka nakon operacije i manjim brojem postoperativnih komplikacija. Ovakav se pristup liječenju temelji na rezultatima studija na velikom broju bolesnica koje su klinički praćene u duljem periodu (dvadesetak godina) (52,53).

Osim HR, RHR, plakoglobina i NEDD9 u stromalnoj i epitelnoj komponenti tumora bez metastaza, tumora s metastazama i metastaza u limfnim čvorova aksile, u istraživanju su u uključeni svi dosad prihvaćeni parametri i prognostički čimbenici bitni za praćenje bolesnica oboljelih od karcinoma dojke. Analizirani su: dob bolesnica, histološki gradus, veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova, TNM stadij bolesti, status ER i PR, kao i status proteina HER2 (54, 55).

Histološki gradus tumora predstavlja stupanj diferenciranosti tumora. U ovom je istraživanju svih 80 analiziranih tumora, 40 bez metastaza u limfne čvorove i 40 s metastazama u aksilarne limfne čvorove bilo srednjeg stupnja (G2) diferenciranosti. Na taj način smo pribavili najreprezentativniju skupinu što se homogenosti stupnja diferencijacije tiče. To je značajno za što točniju interpretaciju rezultata. Bloom i Richardson, u opsežnoj analizi koju su proveli, navode podjednaku zastupljenost različitih stupnjeva diferenciranosti, odnosno gradusa tumora u velikom broju uzoraka duktalnog invazivnog karcinoma (56).

HR ili somatotropin je hormon - polipeptidni lanac koji se sastoji od 191 aminokiseline, a stvara se i izlučuje u acidofilnim stanicama prednjeg režnja hipofize. Hormon rasta ima molekularnu masu oko 21,500 Da (57, 58).

Važnost hormona rasta i njegove uloge u nastanku i razvitku tumora rezultirala je i uvođenjem hipofizektomije kao metode liječenja karcinoma dojke 1953. godine (3, 17, 27). Zajedno s ovariektomijom i adrenaletomijom bila je dio ablativne endokrine terapije sve do uvođenja antiestrogena i aminoglutetimida osamdesetih godina prošlog stoljeća (3, 17, 27).

Iako hormon rasta djeluje izravno na ciljna tkiva, mnogi od njegovih učinaka neizravno su posredovani preko čimbenika rasta IGF-I (od engl. insulin like growth factor) koji predstavlja značajan čimbenik rasta i diferencijacije. U tkivima IGF-I pokazuje lokalne parakrine učinke koji su dijelom ovisni, a dijelom neovisni o HR. Potonje implicira da bi terapija karcinoma efektivnom supresijom HR/IGF-I osovine mogla djelovati na regresiju rasta tumora. Povećano izlučivanje hormona rasta povezano je s povećanim rizikom za obolijevanje od zloćudnih bolesti (59, 60). Tako je pokazana povećana ekspresija HR i RHR u metastazama karcinoma debelog crijeva u regionalnim limfnim čvorovima (61, 62) te u različitim drugim tumorima (63).

Prepoznavajući važnu ulogu koju HR iskazuje u različitim, pa tako i tumorskim patofiziološkim procesima, postoje mnoga istraživanja se provode kako bi se razvio i proizveo antagonist receptora hormona rasta (64, 65). Osim toga pojačana ekspresija receptora hormona rasta pokazana je i u preneoplastičnim procesima poput aktiničke keratoze (65, 66).

Receptor za hormon rasta je glikoprotein od 70 kDa, građen od 620 aminokiselina, nalazi se na membrani i unutrašnjim organelama stanica, a same stanice su ga sposobne proizvoditi i regulirati autokrinim učinkom IGF-1. Gen koji kodira GHR nalazi se u području p12 na, kromosomu 5. Receptor hormona rasta nalazi se na staničnoj membrani u

fetalnim tkivima, jetri, mozgu, bubregu, probavnoj cijevi, masnim stanicama, skeletnim mišićima, srcu, limfatičnom tkivu i kostima. Nakon vezivanja hormona rasta i receptora hormona rasta (dvije molekule receptora, jedna molekula hormona rasta) dolazi do dimerizacije i aktiviranja sustava Janus – kinaze što za posljedicu ima sintezu IGF -1 (67). (68). Čini se da novotvorine imaju pojačanu ekspresiju RHR u usporedbi s okolnim normalnim tkivom (61-66, 69). Smatra se da do toga dolazi zbog genske amplifikacije ili pojačane transkripcije navedenog receptora i njegovih liganada. Smatra se da pojačano stvaranje i ekspresija receptora hormona rasta nastaje zbog abnormalne transkripcije ili zbog tzv. «autokrine stimulacije». Neoplastične lezije imaju pojačanu ekspresiju receptora hormona rasta u odnosu na normalna tkiva (60, 65, 69).

Izraženost receptora hormona rasta najveća je u citoplazmi, a u jezgri jedva vidljiva (60, 61). Imunohistokemijska analiza je pokazala da je prisutnost receptora hormona rasta u korelaciji s razvojnim stadijem tumora kao i sa stupnjem diferencijacije malignih stanica; izraženost receptora hormona rasta je veća u slabije diferenciranih tumorima. Smatra se da su agresivnost i proliferativni potencijal tumorskog tkiva u pozitivnoj korelaciji s ekspresijom receptora hormona rasta.

Ekspresija plakoglobina u tkivima tumora je najčešće snižena, što je posredovano djelovanjem autokrinog hormona rasta, odnosno njegove pojačane ekspresije. Novija istraživanja pokazala su da plakoglobin može imati pozitivne i negativne učinke na rast stanica tumora (70). Jedan od načina na koji na koji dezmosomi, kao čimbenici stabilnosti i inhibicije invazivnih svojstava stanica, moduliraju intracelularni signalni put je regulacija dostupnosti plakoglobina. Uloga plakoglobina u mehanizmu Wnt/beta-katenin nije tako dobro definirana kao uloga samog beta katenina. U nekim je staničnim linijama– npr. u stanicama humanog planocelularnog karcinoma (SCC9), snažna ekspresija plakoglobina praćena nekontroliranim rastom i stvaranjem novih žarišta (71, 72, 73).

Plakoglobin inhibira vezanje Tcf-4 na molekulu DNK. Ovaj je fenomen prisutan tijekom progresije ranog stadija tumora u invazivni stadij. Odsutnost djelovanja ili smanjeno djelovanje plakoglobina u ranijoj fazi razvoja karcinoma posreduje konverziji neinvazivnog u invazivni stadij. Iz toga proizlazi da je ekspresija plakoglobina u ranijoj fazi značajno slabija u odnosu na kasniju fazu bolesti, što rezultira konverzijom ranog stadija u uznapredovali, što je posredovano povišenom ekspresijom autokrinog hormona rasta. Smanjena ekspresija plakoglobina zbiva se kao posljedica epitelno-mezenhimalne konverzije.. Ta zbivanja praćena su relokalizacijom E-kadherina u citoplazmu i neutralizacijom djelovanja E-kadherina, molekule stabilnosti međustaničnih veza.

Sve je to praćeno i posredovano pojačanom ekspresijom HR. Upravo autokrini produkcija HR od strane stanica karcinoma ima za posljedicu nastajanje mezenhimalnog fenotipa s posljedičnim povećanjem migratorne sposobnosti i invazivnosti kroz ekstracelularni matriks. Tako *in vivo* nastaju stanice karcinoma s lokalnim invazivnim mogućnostima. Istraživanja su pokazala da je stupanj ekspresije gena za HR povišen u karcinomima s metastazama u limfne čvorove aksile u usporedbi s normalnim stanicama žljezdanog tkiva dojke, ili nekih drugih, manje agresivnih proliferativnih procesa (74)

Smanjena aktivnost E-kadherina može predstavljati okidač za otpuštanje stanica iz primarnog tumora, odnosno metastaziranje. Moguće je da u kasnijoj, uznapređevaloj fazi bolesti dolazi do povišene ekspresije plakoglobina, što pokazuju rezultati i u ovom istraživanju i to samo u epitelnoj komponenti, bez značajnije razlike u odnosu na tumore bez metastaza (razlika je pokazana, u ovom doktoratu, uz  $P=0,042$ ). Upravo u ovom istraživanju zamijećena je snižena ekspresija HR u obje skupine tumora, posebice u tumora s metastazama, što bi moglo rezultirati pojačanom ekspresijom plakoglobina. To bi moglo biti posljedicom, među ostalim, i eventualne mezenhimalno epitelijalne tranzicije (MET). Ovom fenomenu će svakako biti potrebno posvetiti pažnju u budućim istraživanjima.

Hipoteza da je ekspresija plakoglobina snižena u karcinomima uznapređevalog stadija, s metastazama, u odnosu na karcinome bez metastaza, u našem istraživanju nije u potpunosti potvrđena. Ovo se može pripisati sniženoj ekspresiji HR, kao posljedici MET.

Dobiveni rezultati ne pokazuju smanjenu razinu plakoglobina u uzorcima karcinoma dojke kako onih bez metastaza, tako i u onih s metastazama. Utvrđena je izrazito pojačana izraženost plakoglobina u epitelnoj komponenti obje skupine tumora. To se može pripisati slabo izraženom djelovanju autokrinog hormona rasta, koji je vrlo slabo izražen u obje skupine tumora. Ekspresija plakoglobina i to u obje skupine, bila je snižena samo u stromalnoj komponenti, dok je u epitelnoj komponenti bila izrazito povišena. S druge strane u karcinomima dojke gradusa 2 pokazana je smanjena ekspresija beta katenina u oko 45% tumora (36).

Iako je epitel mliječne žlijezde taj koji proliferira, invadira i posjeduje tumorigeni potencijal, stroma dojke značajno doprinosi biološkom ponašanju tumora. Stroma dojke je heterogena i sastoji se od: adipocita, pre-adipocita, fibroblasta, krvnih žila, upalnih stanica i ekstracelularnog matriksa. Mliječne žlijezde u svom nastajanju i razvoju ispoljavaju mnoge osobine koje obilježavaju nastanak i progresiju tumora: invazivnost, reinicijacija stanične proliferacije, rezistencija na apoptozu i angiogenezu. Npr. terminalni žljezdani režnjic je u svom razvitku brzoproliferirajuća struktura epitelnih stanica koje invadiraju u stromalno

tkivo, vrlo slično tumoru. Nadalje, epitel mora zadržati mogućnost reinicijacije proliferacije svog razvoja. Postoje, također, mehanizmi unutar laktacijskog razdoblja žlijezde koji je štite od prerane involucije, kao i mehanizmi aktivnog „bijega“ od signala apoptoze. Isto kao i tumori, mliječna žlijezda inducira angiogenetske signalne putove, odnosno angiogenetsko remodeliranje. Razumljiva je, stoga, činjenica da su mnogi čimbenici esencijalni za razvitak mliječne žlijezde također pridruženi karcinomu, a mnogi od njih su upravo čimbenici strome. Bolje razumijevanje i usporedba navedenih fizioloških mehanizama s tumorigenezom, mogla bi doprinijeti razumijevanju nastanka tumora, njegovog razvoja, a time i učinkovitijoj terapiji kao i prevenciji bolesti (25).

Određivanje estrogenskih i progesteronskih receptora (ER i PR) u stanicama tumora postalo je neizostavni dio analize karcinoma dojke, zbog važnosti u predviđanju odgovora na liječenje. Poznato je da bolesnice koje imaju jaču ekspresiju hormonskih receptora imaju bolji odgovor na terapiju i imaju bolji prognostički tijek bolesti (3, 18, 27).

Prema podacima iz literature, oko 30 – 40% karcinoma dojke pokazuje pojačanu ekspresiju proteina HER2, što je povezano s agresivnijim kliničkim tijekom, bržim rastom i većim rizikom za metastaziranje zloćudnog tumora. Ekspresija HER2 u suprotnoj je korelaciji sa ekspresijom ER i PR, koji u slučajevima jake ekspresije imaju povoljniju prognostičku vrijednost (27). U ovom istraživanju pozitivnu ekspresiju HER2 proteina pokazivalo je 22,5% tumora bez metastaza i 20% tumora s metastazama. Razlika u ekspresiji HER2 u ovom istraživanju, u odnosu na podatke iz literature, mogla bi biti posljedica analize samo uzoraka karcinoma gradusa 2 diferenciranosti. Rezultati bi, vjerojatno, bili drugačiji da su analizirani uzorci gradusa G1 i G3.

Čimbenik NEDD9 jako je izražen u epitelnoj komponenti obje skupine tumora, i u ovom se istraživanju pokazao kao ključni čimbenik tumorskog rasta i progresije. Također je dokazano da NEDD9 igra važnu ulogu u migraciji i invaziji tumorskih stanica (76, 77). Njegova ekspresija mogla bi postati koristan dijagnostički biljeg za invazivne duktalne karcinome dojke, a eventualno bi mogla pripomoći i u predviđanju agresivnog ponašanja tih tumora i nastanka metastaza u regionalnim limfnim čvorovima.

Naposlijetku bi se moglo zaključiti da bi ciljano liječenje inhibicijom autokrine produkcije hormona rasta i inhibicijom djelovanja NEDD9, moglo spriječiti agresivno ponašanje i metastaziranje karcinoma dojke.

## **7. ZAKLJUČCI**

## Zaključci

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti slijedeće:

1. Ekspresija NEED9 je u epitelnoj komponenti tumora značajno povećana u svim tumorima, neovisno o metastatskom potencijalu. Istovremeno, ekspresija NEDD9 određena u epitelu tumora bez metastaza ne razlikuje se statistički značajno prema tumorima s metastazama. U stromalnoj komponenti obje skupine tumora ekspresija je izostala, ili je vrlo slaba, bez međusobne razlike. Ekspresija NEDD9 je u metastazama u limfnim čvorovima, statistički je jako povećana u tumorskoj epitelnoj komponenti (90%), dok je u stromi bila izrazito slaba (5%).
2. Ekspresija plakoglobina u epitelnoj komponenti dukalnog invazivnog karcinoma dojke jako je povećana u obje skupine tumora, iako statistički značajno manje u epitelnoj komponenti tumora bez metastaza. U stromalnoj komponenti obje skupine tumora ekspresija plakoglobina bila je slaba, odnosno, u većini slučajeva nije uopće bilo reakcije. Ekspresija plakoglobina u metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima jako je povećana u epitelnoj komponenti (87,5%), u odnosu na stromu gdje je praktički izostala.
3. Ekspresija RHR je bila slabo izražena, bez statistički značajne razlike, u epitelnoj komponenti obje skupine tumora. RHR je značajno izražen u stromalnoj komponenti obje skupine tumora, bez statistički značajne razlike između skupina. Ekspresija RHR u metastazama u limfnim čvorovima je značajnije povećana u stromalnoj komponenti (47,5%) u odnosu na epitelnu komponentu (7,5%).
4. Ekspresija HR je bila slaba kako u epitelnoj, tako i u stromalnoj komponenti u obje skupine tumora. Ekspresija HR u metastazama u limfnim čvorovima također je izrazito slaba kako u epitelnoj, tako i u stromalnoj komponenti.
5. Ekspresija svih čimbenika u stromi tumora bez metastaza ne razlikuje se statistički značajno od ekspresije čimbenika u stromi tumora s metastazama.
6. Nije utvrđena statistički značajna korelacija vrijednosti određivanih čimbenika u odnosu na veličinu tumora i dob bolesnika, neovisno o metastatskom statusu tumora.

Rezultati cjelokupnog istraživanja ne potvrđuju u cijelosti hipotezu da je ekspresija plakoglobina snižena u karcinomima s metastazama u odnosu na karcinome bez metastaza. Ekspresija plakoglobina, i to u obje skupine, bila je snižena samo u stromalnoj komponenti,

dok je u epitelnoj komponenti bila izrazito povećana. Hipoteza da je ekspresija NEDD9 povećana vrijedi samo za epitelnu komponentu u obje skupine tumora, dok je u stromi snižena, za razliku od plakoglobina gdje je situacija s ekspresijom u odnosu stroma/epitel obrnuta. Ekspresija RHR je povećana samo u stromalnoj komponenti obje skupine tumora, dok u epitelnoj nije, što je samo dijelom u korelaciji s postavljenom hipotezom da je ekspresija RHR povećana u metastazirajućih tumora. Također ekspresija hormona rasta nije bila značajno povećana niti u jednoj skupini tumora, niti u epitelnoj, niti u stromalnoj komponenti.

U uznapredovalom stadiju, čini se da važniju ulogu predstavlja NEDD9 koji bi mogao biti važan čimbenik u stjecanju, ali i održavanju malignog potencijala s promotivnom i permisivnom ulogom u metastaziranju.

Iz toga proizlazi zanimanje za proširenje istraživanja na određivanje ekspresije ovih čimbenika u ranijim fazama nastanka karcinoma, eventualno i nižeg gradusa (G1), u kojima bi plakoglobini mogao biti znatno smanjeno izražen, dok bi drugi čimbenici rasta, prvenstveno HR i RHR mogli biti značajnije izraženi.

Dokazivanjem mehanizama djelovanja autokrinog hormona rasta te posljedičnih učinaka na gen za hormon rasta, njegov receptor RHR, zatim plakoglobini i NEDD9 bilo bi moguće dokinuti eventualni učinak pozitivne povratne sprege navedenih čimbenika međustanične veze, a time i kontrolirati procese metastaziranja. Ciljano liječenje inhibicijom autokrine produkcije hormona rasta, odnosno antagonistima receptora hormona rasta te antagonistima NEDD9 moglo bi spriječiti metastaziranje karcinoma dojke.



## **8. SAŽETAK**

## Sažetak

Karcinom dojke glavnik je uzrok smrti u žena. Probir mamografija, u svrhu ranog otkrivanja karcinoma dojke provodi se u Hrvatskoj zadnjih nekoliko godina. U ovom se istraživanju koriste uzorci karcinoma dojke otkriveni metodom probira u Kliničkom bolničkom centru „Sestre Milosrdnice“. Hipoteza istraživanja bila je: u metastatskom karcinomu dojke povišena je ekspresija autokrinog hormona rasta (HR), receptora hormona rasta (RHR) i NEDD9, a snižena je ekspresija plakoglobina. Cilj istraživanja bio je utvrditi ekspresiju RH, RHR, NEDD9 i plakoglobina u karcinomima dojke bez metastaza, karcinomima dojke s metastazama i u metastazama u limfnim čvorovima, metodom imunohistokemije. Svi analizirani uzorci bili su histološkog gradusa „G2“. Istraživani parametri uspoređivani su s ispoljenošću ER, PR and HER2, a analizirani su još i veličina tumora, kao i dob bolesnica. U analizu je bilo uključeno 40 karcinoma bez metastaza, 40 karcinoma s metastazama i 40 metastaza u limfnim čvorovima. Eksperimentalni rezultati studije analizirani su adekvatnim statističkim metodama. Ekspresija plakoglobina i NEDD9 u epitelnoj komponenti tumora značajno je povećana u obje skupine tumora, kao i u epitelnoj komponenti metastaza u limfnim čvorovima, dok je u stromalnoj komponenti izrazito slaba ili izostala. Ekspresija HR je izrazito slaba kako u epitelnoj, tako i u stromalnoj komponenti obje skupine tumora i metastaza u limfnim čvorovima. Ekspresija RHR je povećana u stromalnoj komponenti obje skupine tumora kao i metastaza, dok je u epitelnoj komponenti izrazito slaba. RHR i NEDD9 antagonisti bi mogli biti od značajnog kliničkog značenja i terapijske važnosti a štetni efekti kemoterapije bi se značajno umanjili.

## **9. SUMMARY**

## Summary

Breast cancer is one of the leading causes of death in women. Mammographic screening for an early detection of breast cancer has been performed in Croatia for the last few years. The samples used in this study mostly belong to the patients that went to routine mammographic screening at the Clinical Hospital Center Sisters of Charity. The thesis hypothesis was: the expression of autocrine growth hormone (GH), its receptor (GHR), and NEDD9 are increased, while the expression of plakoglobin expression is decreased in metastasing breast cancer. All analyzed samples were of G2 histological grade. Immunohistochemistry was performed for studying the expression of GH, GHR, NEDD9 and plakoglobin in both 40 non-metastatic, and 40 metastatic breast cancer. Additionally, 40 lymph node metastases were analyzed in the same way. Study parameters were correlated with ER, PR and HER2 expression. Age of patients and tumor size were analyzed, too. Experimental results have been analyzed with appropriate statistical methods. Plakoglobin and NEDD9 expression is significantly increased in epithelial tumor component of both tumor groups, also in epithelial component of metastases in lymph nodes. In the stromal component expression is decreased. GH expression is decreased in epithelial and stromal tumor component of both tumor groups, also of lymph node metastases. GHR expression is increased in stromal component of both tumor groups, also of metastases, while in epithelial component is very weak.

GHR and NEDD9 antagonists may be of high clinical and therapeutic value by reducing chemotherapy side effects in breast cancer patients.

## **10. POPIS LITERATURE**

1. Hankinson S, Hunter D. Breast cancer. U: Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D. Textbook of cancer epidemiology. Oxford University Press, 2002, str. 301-39.
2. Jemal A, Tiwari RC, Murray T i sur. Cancer statistics, 2004. CA Cancer J Clin 2004;54 8-29.
3. Rosen PP. Breast pathology, 2. izd. Philadelphia:Lippincot Williams and Wilkins, 2001, str.325-64.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Zdravstveno-statistički ljetopis 2007. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2007.
5. Pryke M. Effect of population-based screening on breast cancer mortality. Lancet. 2012;379:1297-8.
6. Vrbanec D. Optimalno adjuvantno hormonsko liječenje raka dojke. U: Zbornik radova „Bolesti dojke“, HAZU, 2004, str. 123-30.
7. Rutquist LE: Adjuvant endocrine therapy. Best Pract Res Clin Endocrinol Metabolism 2004;18:81-95.
8. Pike MC, Krailo MD, Henderson BE i sur: „Hormonal“ risk factors,“breast tissue age“ and age-incidence of breast cancer. Nature 1983;303:767.
9. Schapira DV, Clarc RA,Wolff PA, i sur. Visceral obesity and breast cancer risk. Cancer 1994;74:632-9.
10. Nelson HD, Zakher B, Cantor A, i sur. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: A systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med 2012;156:635-48.
11. Ford D, Easton DF, Stratton M. i sur. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 i BRCA2 genes in breast cancer famillies. Am J Hum Genet 1998;62:676-89.

12. Pavelić K, Gall-Trošelj K. Recent advances in molecular genetics of breast cancer. *J Mol Med* 2001;79:566-73.
13. Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: What we know and what we need. *Nat Med* 2001;7: 552-6.
14. Tabar L, Dean PB. Thirty years of experience with mammography screening: a new approach to the diagnosis and treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008;10 Suppl 4:S3.
15. Orel SG. MR imaging of the breast. *Radiol Clin North Am* 2000;38:899-913.
16. Hahn S, Hecktor J, Grabellus F i sur. Diagnostic accuracy of dual-time-point 18F-FDG PET/CT for the detection of axillary lymph node metastases in breast cancer patients. *Acta Radiol* 2012;53:518-23.
17. Harris JR, Henderson I, Hellman S i sur. *Breast diseases*. Philadelphia:J.B.Lippincott Company, 1987.
18. Tavassoli FA, Devilee P. World health organisation classification of tumors. Tumors of the breast and female genital organs. France: IARC Press; 2003.
19. Jakić-Razumović J, Unušić J. Patohistološka analiza aksilarnih limfnih čvorova s posebnim osvrtom na biopsije „sentinel“ limfnog čvora. U: *Bolesti dojke* 8. zbornik radova XI znanstvenog sastanka HAZU „Bolesti dojke“ Prpić i sur. Zagreb 2001, str.107-18.
20. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from large study with long term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.
21. Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE. Assessment of tissue estrogen and progesterone receptor levels: a survey of current practice, techniques, and quantitation methods. *Breast J* 2006;6:189-96.

22. Yarden Y, Baselga J, Miles D i sur. Molecular approach to breast cancer treatment. *Semin Oncol* 2004;31:6-13.
23. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
24. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-22.
25. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010;11: 174-83.
26. Feigelson HS, Henderson BE. The epidemiology of breast cancer. U: *Breast cancer: A clinical Guide to Therapy*, Bonnadona G, Hortobagayi GN, Gianni AM (ur) London: Martin Dunitz Ltd, 2001
27. Rosai J. Rosai Ackerman. *Kirurška patologija. Školska knjiga Zagreb* 2010.
28. Wiseman BS, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* 2002;296:1046-9.
29. Sullu Y, Demirag GG, Yildirim A. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract* 2011;15:207747-53.
30. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orcherstrate epithelial-mesenhymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:131-42.
31. Kong C, Wang C, Wang L i sur. NEDD9 is a positive regulator of epithelial-mesenhymal transition and promotes invasion in aggressive breast cancer. *PLoS ONE* 2011;6(7):e22666.
32. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998;153:333-9.



33. Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003;94:575-8.
34. Frixen U, Behrens J, Sahs M, i sur. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991;113:173-85.
35. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. Reduced or absent E-cadherin expression predicts early metastases in breast cancer. *Mol Pathol* 2001;14:29.
36. Labinac-Peteh L. Odnos pojave peritubularnih pukotina s ekspresijom proteina strome E-Kadherina i  $\beta$  Katenina u karcinomu dojke. Disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2011.
37. Krušlin B, Levanat S, Baltić V, i sur. Growth factors in human tumors. *Res Exp Med* 1989;189:91-9.
38. Waters MJ, Barclay JL, Does growth hormone drive breast and other cancers. *Endocrinology* 2007;148:4533-5.
39. Pavelić K, Vrbanec D, Marušić S., Levanat S, Čabrijan T. Autocrine tumor growth regulation by somatomedin C: an in vitro model. *J Endocrinol* 1986;109: 233-8.
40. Liu N, Mertani HC, Norstedt G i sur. Mode of the autocrine/paracrine mechanisms of growth hormone action. *Exp Cell Res* 1997;237:196-206.
41. Mukhina S, Mertani HC, Guo K, Lee KO, Gluckman PD, Lobie PE. Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15166-71.
42. Kaulsay KK, Zhu T, Bennett W, i sur. The effects of autocrine human growth hormone (hGH) on human mammary carcinoma cell behavior are mediated via the hGH receptor. *Endocrinology* 2001;142:767-77.

43. Gebre-Medhin M, Kindblom LG, Wennbo H, i sur. Growth hormone receptor is expressed in human breast cancer. *Am J Pathol* 2001;158:1217-22.
44. Amitay R, Nass D, Meitar D, i sur. Reduced expression of plakoglobin correlates with adverse outcome in patients with neuroblastoma. *Am J Pathol* 2001;159:43-9.
45. Aberle H, Bierkamp C, Torchard D, i sur. The human plakoglobin gene localizes on chromosome 17q21 and is subjected to loss of heterozigosity in breast and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6384-8.
46. Miravet S, Piedra J, Miro F, i sur. The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for catenin and plakoglobin. *J Biol Chem* 2002;277:1884-91.
47. Izumchenko E, Singh MK, Plotnikova OV, i sur. NEDD9 promotes oncogenic signaling in mammary tumor development. *Cancer Res* 2009;69:7198-206.
48. Bradshaw LN, Zhong J, Bradbury P, i sur. Estradiol stabilizes the 105-kDa phosphoform of the adhesion docking protein NEDD9 and supresses NEDD9-dependent cell spreading in breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:340-5.
49. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, i sur. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993;123:513-22.
50. Kratochwill K. The stroma and the control of cell growth. *J Pathol* 1986;149:23-4.
51. Noel A, Foidrat JM. The role of stroma in breast carcinoma growth in vivo. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998;3:215-25.
52. Shekhar MPV, Werdell J, Santner SJ, i sur. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and diferentiation: Implications for tumor development and progression. *Cancer Res* 2001;61:1320-6.

53. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, i sur. Twenty year follow up of a randomized study comparing breast conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1227-32.
54. Fisher B, Anderson S, Bryant J, i sur. Twenty-year follow-up of randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Eng J Med* 2002;347:1233-41.
55. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;25:272-7.
56. Bloom HJG, Richardson W. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 359-77.
57. Vrkljan M, Čerina V. Akromegalija. Suvišak i nedostatak hormona rasta. Zagreb: Birotisak: 2004
58. Guyton A, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2003, str. 849-54.
59. Renehan AG, O'Connell J, O'Halloran D, Shanahan F, Potten CS, O'Dwyer ST, Shalet SM. Acromegaly and colorectal cancer: A comprehensive review of epidemiology, biological mechanisms and clinical implications. *Horm Metab Res* 2003;35:712-25.
60. Jukić Z. Izraženost hormona rasta i receptora hormona rasta u kolorektalnom adenokarcinomu. Disertacija. Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2007.
61. Jukić Z, Tomas D, Mijić A, Krušlin B. Expression of growth hormone receptor and growth hormone in colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2009;56:85-8.
62. Stanimirović A, Čupić H, Tomas D, i sur. Immunohistochemical determination of the growth hormone receptor in squamous cell carcinoma of the skin. *Acta Dermatoven APA* 2004;13:3-8.

63. Schally AV, Varga JL. Antagonistic analogs of growth hormone-releasing hormone: new potential antitumor agents. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:383-91.
64. Szepeshazi K, Schally AV, Groot K, i sur. Antagonists of growth hormone-releasing (GH-RH) inhibit IGF-II production and growth of HT-29 human colon cancers. *Br J Cancer* 2000;82:1724-31.
65. Stanimirović A, Čupić H, Bošnjak B, Krušlin B, Belicza M. Expression of p53, bcl-2 and growth hormone receptor in actinic keratosis, hypertrophic type. *Arch Dermatol Res* 2003;295:102-8.
66. Stanimirović A, Čupić H, Bošnjak B, i sur. Expression of TP53, Bcl-2 and growth hormone receptor in atrophic type of actinic keratosis. *J Dermatol Sci* 2004;34:49-53
67. Postel-Vinay MC, Finidori J. Growth hormone receptor: structure and signal transduction. *Eur J Endocrinol* 1995;133:654-9.
68. Renehan AG, O'Connell J, O'Halloran D, i sur. Acromegaly and colorectal cancer: A comprehensive review of epidemiology, biological mechanisms and clinical implications. *Horm Metab Res* 2003;35:712-25.
69. Pavelić K, Kolak T, Kapitanović S, i sur. Gastric cancer: the role of insulin-like growth factor 2 (IGF 2) and its receptors (IGF 1R and M6-P/IGF 2R). *J Pathol* 2003;201:430-8.
70. Kolligs FT, Kolligs B, Hajta KM, i sur. Catenin is regulated by APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes Dev* 2000;14:1319-31.
71. Shiina H, Breault JE, Basset WW, i sur. Functional loss of gamma-catenin gene through epigenetic and genetic pathways in human prostate cancer. *Cancer Res* 2005;65:2130-8.
72. Hakimelahi S, Parker HR, Glichrist A, i sur. Plakoglobin regulates the expression of the anti-apoptotic protein BCL-2. *J Biol Chem* 2000;275:10905-11.

73. Miravet S, Piedra J, Castano J, i sur. Thyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 2003;23:7391-402.
74. Raccurt M, Lobioe PE, Moudilou E, i sur. High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of mammary gland. *J Endocrinol* 2002;175:307-18.
75. Layfeld LJ, Gupta D, Mooney EE. Assesment of tissue estrogen and progesteron receptor levels: a survey of current practice, techniques and quantitation methods. *Breast J* 2000;6:189-96.
76. Ross JS, Fletcher JA. The HER2/neu oncogene in breast cancer: Prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *The Oncologist* 1998;3:237-52.
77. O'Neill GM, Seo S, Serebriiskii IG, Lessin SR, Golemis EA. A new central scffold for metastasis: parsing HEF1/Cas-L/NEDD9. *Cancer Res* 2007;67:8975-9.

## **11. ŽIVOTOPIS**

## Životopis

Rođen sam 15. travnja 1955. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završio sam u Ogulinu. Srednju školu u Zagrebu - gimnazija „Trešnjevka“ (VIII). Medicinski fakultet u Zagrebu upisao sam 1974, a diplomirao 1979. godine. Tijekom studija aktivno sam sudjelovao u znanstvenom radu te sam 1979. godine dobio rektorovu nagradu za najbolji morfološki rad studenta medicinskog fakulteta. Bio sam voditelj imunološke sekcije studentske stručne udruge Klub zdravlja „Andrija Štampar“, čiji sam predsjednik bio u vremenu od tri godine. Pripravnički liječnički staž odradio sam u Domu zdravlja željezničara u Zagrebu, gdje sam 5 godina radio u ambulanti primarne zdravstvene zaštite.

Poslijediplomski studij na Prirodoslovno matematičkom fakultetu, smjer Biomedicina, upisao sam 1982. godine. Magistarsku tezu „Rast melanoma B-16 u miševa s dijabetes melitusom“ obranio sam 1983. godine.

Specijalizaciju iz radiologije započeo sam 1988. godine u bolnici „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu. Specijalistički ispit položio sam 1991. godine. Uža specijalnost su mi dijagnostika bolesti gastrointestinalnog sustava, hepatobilijarnog sustava, dijagnostika bolesti dojke, urgentna stanja u radiologiji, te dijagnostika bolesti kardiorespiratornog sustava.

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora, radiološke sekcije, kao i Hrvatskog senološkog društva.

Član sam Europskog radiološkog društva (ESR).

Član sam Matice Hrvatske.

Aktivno sam sudjelovao na stručnim kongresima u zemlji, a u više navrata sudjelovao sam na kongresima u inozemstvu usavršavajući svoje radiološke vještine.

Govorim aktivno engleski jezik, a služim se njemačkim i španjolskim.

Oženjen sam i otac dvaju sinova.