

Fosforilirani receptor HER-2 kao pokazatelj rezistencije karcinoma dojke na terapiju trastuzumabom

Ramić, Snježana

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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:105:704030>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Snježana Ramić

**Fosforilirani receptor HER-2 kao
pokazatelj rezistencije karcinoma
dojke na terapiju trastuzumabom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Snježana Ramić

**Fosforilirani receptor HER-2 kao
pokazatelj rezistencije karcinoma
dojke na terapiju trastuzumabom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

Disertacija je izrađena na Odjelu za onkološku patologiju Klinika za tumore, Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“, Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Fabijan Knežević, dr. med., spec. patološke anatomije

Zahvaljujem mentoru na razumijevanju, strpljenju, podršci i poticaju tijekom izrade i pisanja ove disertacije.

Zahvaljujem svojim prijateljima što nisu gubili vjeru u mene, čak i kada je sama nisam imala.

Najviše zahvaljujem svojoj obitelji, a posebno svom suprugu, koji je podnio veliki teret znanstvenog istraživanja.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Grada dojke	1
1.1.1.	Embriologija i razvoj dojke	1
1.1.2.	Anatomija i fiziologija dojke	1
1.2.	Bolesti dojke	4
1.2.1.	Netumorske bolesti dojke	4
1.2.2.	Proliferativne bolesti dojke	4
1.2.3.	Tumorske bolesti dojke	6
1.2.3.1.	Dobroćudni tumori dojke	6
1.2.3.2.	Zloćudni tumori dojke	7
1.3.	Rak dojke	10
1.3.1.	Etiologija raka dojke	10
1.3.2.	Opći čimbenici nastanka raka dojke	11
1.3.3.	Genetski čimbenici nastanka raka dojke	12
1.3.4.	Epidemiologija raka dojke	14
1.4.	Dijagnostika raka dojke	17
1.4.1.	Patohistološka dijagnostika raka dojke	19
1.4.2.	Morfološki prognostički čimbenici	21
1.4.3.	Molekularni prognostički čimbenici	24
1.4.3.1.	Receptori za estrogen i progesteron	24
1.4.3.2.	Proliferacijski biljeg Ki-67	25
1.4.3.3.	Receptor HER2	26
1.4.4.	Molekularna sub-klasifikacija karcinoma dojke	30
	<i>Luminalni A</i>	32
	<i>Luminalni B</i>	32
	<i>HER2/neu tip</i>	33
	<i>Basal-like</i>	33
1.4.5.	Terapija karcinoma dojke	36

1.5. Obitelj receptora HER/ErbB	38
1.5.1. Građa i funkcija receptora HER	38
1.5.2. Signalni putevi aktivirani receptorima HER	39
1.5.3. Utjecaj receptora HER u karcinogenezi	42
1.5.3.1. HER1/ErbB1/EGFR	42
1.5.3.2. HER2/ErbB2/Neu	43
1.5.3.3. HER3/ErbB3	45
1.5.3.4. HER4/ErbB4	45
1.6. Terapija usmjerena na receptore HER	47
1.6.1. Trastuzumab (Herceptin®)	50
1.6.1.1. Mehanizmi djelovanja trastuzumaba	52
1.6.1.2. Mehanizmi rezistencije na trastuzumab	53
2. HIPOTEZA	57
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	58
4. MATERIJALI I METODE	59
4.1. Bolesnice	59
4.2. Metode	60
4.2.1. Konstruiranje tkivnih „mikročipova“ (Tissue microarray)	60
4.2.2. Imunohistokemijsko bojenje	61
4.2.3. Evaluacija imunohistokemijskih podataka	62
4.3. Metode statističke analize	63
5. REZULTATI	64
5.1. Izraženost fosforiliranog receptora HER2	66
5.2. Izraženost receptora HER obitelji	71
5.2.1. Izraženost receptora HER1	71
5.2.2. Izraženost receptora HER3	72

5.2.3. Izraženost receptora HER4	75
5.3. Istovremena izraženost receptora HER obitelji	78
5.4. Rezistencija na trastuzumab	81
5.5. Preživljenje bolesnica	85
6. RASPRAVA	93
7. ZAKLJUČCI	104
8. KRATKI SADRŽAJ	105
9. SUMMARY	106
10. POPIS LITERATURE	107
11. ŽIVOTOPIS	126

POPIS KRATICA

4ICD	unutarstanična jedinica receptora HER4 (engl. <i>HER4 intracellular domain</i>), aktivacijom i proteolitičkom razgradnjom receptora fragment se otpušta u citoplazmu
ADCC	citotoksičnost ovisna o protutijelu (engl. <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
AJCC	Američka združena komisija za rak (engl. <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
Akt	serin-treonin specifična protein kinaza B
BRCA 1 i 2	tumor supresor geni koji sudjeluju u popravku DNA (engl. <i>Breast cancer geni 1 i 2</i>)
CDH	kaderini (engl. <i>Cadherin</i>)
CISH	kromogena hibridizacija <i>in situ</i> (engl. <i>Chromogenic in situ hybridisation</i>)
CRC	kolorektalni karcinom (engl. <i>colorectal cancer</i>)
DCIS	intraduktalni karcinom, karcinom <i>in situ</i> (engl. <i>ductal carcinoma in situ</i>)
DIN	duktalna intraepitelna neoplazija
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ER	receptor za estrogen (engl. <i>estrogene receptor</i>)
ERK	izvanstanična signalno regulirana kinaza (engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
FDA	agencija za promicanje i zaštitu zdravlja u SAD (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FISH	fluorescencijska hibridizacija <i>in situ</i> (engl. <i>fluorescence in situ hybridisation</i>)
HER/ErbB	obitelj receptora za humane epidermalne čimbenike rasta (engl. <i>human epidermal growth factor receptor family</i>)
HER1/ErbB1/EGFR	receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 1 (engl. <i>human epidermal growth factor receptor 1</i>)
HER1 +/-	status receptora HER1 pozitivan (+) ili negativan (–)
HER2/ErbB2/Neu	receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HER2 +/-	status receptora HER2 pozitivan (+) ili negativan (–)

HER3/ErbB3	receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 3 (engl. <i>human epidermal growth factor receptor 3</i>)
HER3 +/-	status receptora HER3 pozitivan (+) ili negativan (–)
HER4/ErbB4	receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 4 (engl. <i>human epidermal growth factor receptor 4</i>); receptor za humani epidermalni faktor rasta 4
HER4 +/-	status receptora HER4 pozitivan (+) ili negativan (–)
HR, RR	mjere omjera izgleda i relativnog rizika korišteni u statistici (engl. <i>hazard risk, relative risk</i>)
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
IHC	metoda imunohistokemijskog bojenja (engl. <i>immunohistochemistry</i>)
JM	domena tirozin kinaznih receptora koja se nalazi blisko uz membranu stanice vezana na transmembranski dio receptora (engl. <i>juxtamembrane</i>)
LČ	limfni čvor(ovi)
MAPK/ERK	protein-kinaza aktivirana mitogenima (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>) znana i kao ERK (engl. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
MAPK/ERK/Akt	signalni put koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
mTOR	protein inhibiran rapamicinom (engl. <i>mammalian/mechanistic Target Of Rapamycin</i>)
NCCN	neprofitno udruženje stručnjaka SAD-a koji utvrđuju preporuke u kliničkoj onkološkoj praksi (engl. <i>National Comprehensive Cancer Network</i>)
NOS	bez posebnih obilježja (engl. <i>Not Otherwise Specified</i>)
P2NA	klon primarnog protutijela na fosforilacijsko mjesto Tyr-1248 HER2 receptora korišten u istraživanju
pCR	patološki kompletni odgovor (engl. <i>pathologic complete response</i>)
pHER2	fosforilirani/aktivni oblik HER2 receptora (u istraživanju se uglavnom odnosi na fosforilacijsko mjesto Tyr-1248)
pHER2 +/-	fosforilirani status receptora HER2 pozitivan (+) ili negativan (–)
PI3K	fosfatidilinozitol-3 kinaze, obitelj ATP enzima (engl. <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>)
PI3KCA	gen za katalitičku podjedinicu PI3K enzima (protoonkogen)

PI3KCA/Akt/mTOR	signalni put koji aktivira rast i proliferaciju stanica, aktiviran receptorima HER
PR	receptor za progesteron (engl. <i>progesterone receptor</i>)
PTEN	homolog fosfataza i tenzina, tumor supresor gen (engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>)
RAS	skupina protoonkogeni RAS (engl. <i>rat sarcoma</i>)
RAS/RAF/MEK	signalni put koji potiče proliferaciju stanica, aktiviran čimbenicima rasta
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
SAD	Sjedinjene Američke Države
SEER	program Američkog nacionalnog instituta za rak (engl. <i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i>)
SISH	srebrom bojena hibridizacija <i>in situ</i> (engl. <i>Silver enhanced in situ hybridisation</i>)
TGF	transformirajući čimbenik rasta (engl. <i>transforming growth factor</i>)
TNM	sistem stupnjevanja raka dojke prema parametrima veličine primarnog tumora (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova tumorskim stanicama (N) te prisutnost udaljenih metastaza (M)
TP53/p53	tumor-supresorski gen 53/protein p53 „čuvar genoma“ (engl. <i>Tumor protein p53</i>)
UZV	ultrazvuk
vs.	suprotno, u odnosu na, protiv (engl. <i>versus</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija – SZO (eng. <i>World Health Organisation</i>)
χ^2	Hi-kvadrat test

1. UVOD

1.1. Građa dojke

1.1.1. Embriologija i razvoj dojke

Dojka ili mliječna žlijezda (lat. *mamma*, grč. *mastos*) najveća je kožna žlijezda, koja je zapravo modificirana žlijezda znojnica. Tijekom embrionalnog razvoja duž ventro-lateralne strane trupa razvijaju se mliječne pruge. Od njihovih kranijalnih dijelova razvijaju se mliječne žlijezde. Urastanjem zadebljanog epidermisa u mezenhim formira se niz epitelnih tračaka od kojih se razviju glavni odvodni kanali reznjeva mliječne žlijezde (lat. *ducti lactiferi*) (1-5). Pod kraj fetalnog života epitelni tračci se granaju i u njima se pojavljuju lumeni. Grananje epitelnih tračaka, koji predstavljaju buduće mliječne kanaliće, nastavlja se i nakon rođenja.

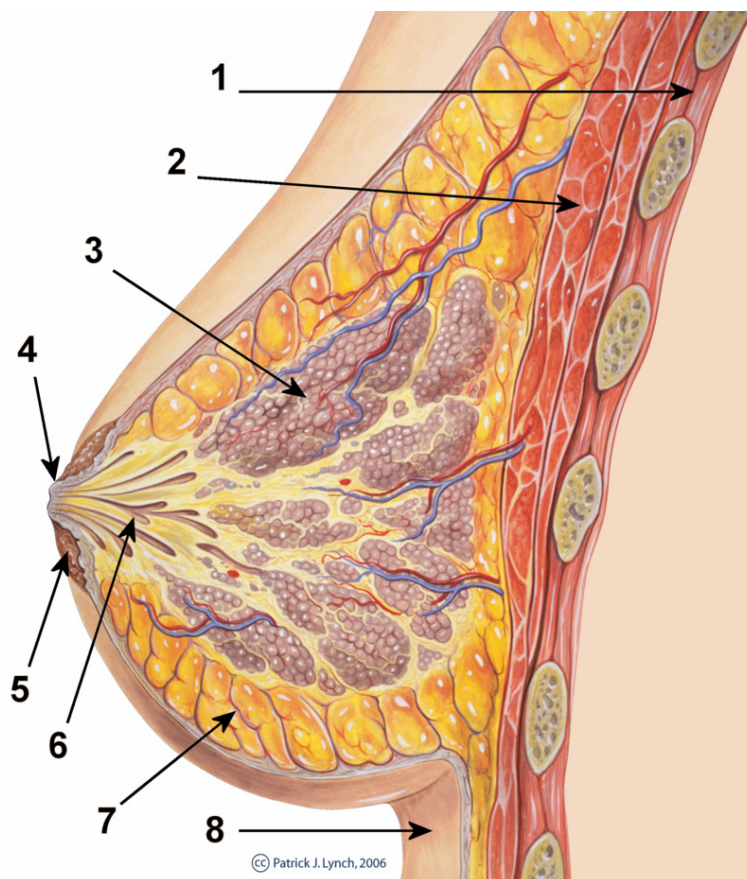
Tijekom puberteta kod djevojaka, pod utjecajem estrogena i progesterona iz jajnika, dolazi do produljivanja i grananja postojećih kanala uz istodobno nakupljanje masnog tkiva. Dojka prolazi i kroz cikličke promjene tijekom menstrualnog ciklusa. Ipak, tek za vrijeme trudnoće dolazi do grananja i formiranja žljezda, alveologeneze, te konačne diferencijacije u smjeru sekrecije (1-5). Prilikom trudnoće i laktacije na krajevima terminalnih kanalića formiraju se alveole, nakupine žljezdanih stanica koje izlučuju mlijeko. Nakon prestanka dojenja većina alveola propada apoptozom, a u starosti nastupa involucija (5). Strukturnu građu dojke čine čvrsto žljezdano i vezivno te mekano masno tkivo pa se dojka pri opipu doima kao skup grudica i kvržica. To je važno znati jer u neupućenih žena izaziva nedoumice i strah od raka (6).

Kod muškaraca grananje prestaje prije puberteta, pa mliječna žlijezda ostane nerazvijena.

1.1.2. Anatomija i fiziologija dojke

Dojka je simetrični parni organ, smješten na prednjoj strani prsnog koša s funkcijom proizvodnje i izlučivanja mlijeka. Normalnu veličinu doseže tijekom puberteta. Većinom je smještena između drugog i sedmog rebra te između lateralnog ruba prsne kosti i srednje pazušne linije (lat. *regio mammalis*) (1-5). Korijen dojke (lat. *radix mammae*) se nalazi u području ispod drugog rebra i nastavlja se u trup (lat. *corpus mammae*). Dojka je obložena kožom, a na vrhu dojke je bradavica (lat. *papilla mammae*, *mammilla*), izbočena tvorba

veliĉine oko jedan centimetar kroz koju izlaze izvodni kanali mlijeĉne Źlijezde. Oko bradavice je kruŹno pigmentirano podruĉje (lat. *areola mammae*) (Slika 1).



Slika 1. GraĊa dojke, sagitalni presjek: 1 - prsni koŹ; 2 - veliki prsni miŹiĉ; 3 - mlijeĉne Źlijezde; 4 - bradavica; 5 - areola; 6 - mlijeĉni kanali; 7 - masno tkivo; 8 - koŹa
(Preuzeto iz: Lynch PJ, medicinski ilustrator;
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Breast_anatomy_normal_scheme.png)

Dojku ĉini tkivo mlijeĉne Źlijezde (lat. *glandula mammaria*), vezivna stroma i masno tkivo. Mlijeĉna Źlijezda odrasle Źene sastoji se od 15-25 reŹnjeva sloŹene alveotubularne graĊe (lat. *lobi glandulae mammariae*) (Slika 1). ReŹnjevi su meĊusobno odvojeni gustim vezivom i masnim tkivom, a dodatno su podijeljeni na manje reŹnjiĉe (lat. *lobuli glandulae mammariae*) koji se sastoje od ogranka alveola. Svaki reŹanj je Źlijezda za sebe, ĉiji se reŹnjiĉi s nekoliko kanala spajaju u terminalni kanal. Kroz odvodni kanal (lat. *ductus lactiferus*) koji se proŹiruje u sinuse (lat. *sinus lactiferus*) svaki reŹanj se zasebno otvara na

prсној bradavici (5). Režnjevi i njihovi izvodni kanali poredani su zrakasto oko bradavice pa otuda pravilo da svaki kirurški rez dojke ide radijalno prema bradavici. Dojka je dobro opskrbljena krvnim i limfnim žilama (6).

U trudnoći se žljezdano tkivo potpuno osposobi za izlučivanje mlijeka (2-5). Placenta u trudnoći luči velike količine estrogena, koji dovode do grananja i rasta sustava kanalića, povećanja strome i odlaganja masti. Pod utjecajem progesterona rastu režnjići, pupaju alveole i razvijaju se sekrecijske karakteristike alveolarnih stanica. Za razliku od prolaktina, estrogen i progesteron imaju specifično inhibitorno djelovanje na lučenje mlijeka. U tom mehanizmu sudjeluje još nekoliko hormona: prolaktin, hormon rasta, glukokortikoidi nadbubrežne žlijezde i inzulin. Kako nakon poroda dolazi do pada koncentracije estrogena i progesterona, omogućava se laktogeni učinak prolaktina (2-5). Dva do tri dana nakon poroda počinje obilno lučenje mlijeka, za što je osim prolaktina potrebno postojanje hormona rasta, glukokortikoida nadbubrežne žlijezde i paratiroidnog hormon. Mlijeko se neprekidno luči u alveole mliječnih žlijezda, a u kanaliće dolazi kombiniranim neurogenim i hormonskim podražajem oksitocinom. Oksitocin uzrokuje kontrakciju mioepitelnih stanica koje čine vanjski sloj stanica acinusa dojke (2).

1.2. Bolesti dojke

1.2.1. Netumorske bolesti dojke

Bolesti dojke mogu biti netumorske i tumorske bolesti. U netumorske bolesti uključujemo razna stanja u dojkama koja nisu povezana s povećanim rizikom za nastanak raka dojke te obuhvaćaju (6-8):

- Poremećaje u razvoju dojki: amastija (manjak dojke), mikromastija (male dojke), makromastija (velike dojke), polimastija (prekobrojne dojke), atelija (manjak bradavice), mikrotelija (sitna uvučena bradavica), politelija (prekobrojna bradavica)
- Poremećaje u funkciji: galaktoreja (izlučivanje mlijeka izvan doba dojenja), secernirajuća dojka, krvareća dojka, mastodinija (bolna dojka), produljeno dojenje, preobilna količina mlijeka i spontano otjecanje mlijeka
- Regresivne promjene: atrofija ("smežurane" dojke), distrofija (pretvaranje tkiva dojke u mast, sluz ili stvaranje kalcifikata) i steatonekroza (odumrlo masno tkivo se ulaže kalcij, tvrd čvor u dojci)
- Upalne promjene: teilitis (upala bradavice), areolitis (upala areole), intertrigo (ekcem submamalnog sulkusa), mastitis (upala mliječne žlijezde, najčešće u prva dva tjedna nakon poroda), apsces (lokalizirana gnojna upala), karbunkul (gnojna infekcija kože i potkožnog tkiva dojke s brojnim gnojnim čepovima) i rijetko tuberkuloza, sifilis i aktinomikoza
- Displazije: promjene najčešće uzrokovane hormonalnim utjecajima (estrogen, progesteron, prolaktin)

1.2.2. Proliferativne bolesti dojke

Pored povećanih čimbenika rizika za nastanak karcinoma dojke na koje ne možemo utjecati (dob, spol, obiteljska anamneza, rasa i slično) postoje i pojedina proliferativna stanja u dojkama koja povećavaju rizik od nastanka karcinoma. Neke proliferativne lezije unutar kanalića dojke imaju ekscesivan rast stanica te neznatno povećavaju rizik za nastanak karcinoma dojke, dok neke od proliferativnih lezija dojke svrstavamo u skupinu preneoplazija dojke (8).

- **Tipičnu duktalnu hiperplaziju** (engl. *Usual Ductal Hyperplasia, UDH*) karakterizira heterogenost u veličini i obliku stanica bez nuklearne atipije te stvaranje nepravilnih pukotina između umnoženih stanica unutar lumena kanalića. Stanična heterogenost rezultat je proliferacije s različitim stupnjevima diferencijacije epitelnih stanica koje imunohistokemijski većinom pokazuju pozitivitet na visokomolekularne citokeratine CK 5/14 koji su biljezi bazalnih stanica, a manje na niskomolekularne epitelne citokeratine CK 8/18.
Ostale epitelne proliferacije bez atipije kao sklerozirajuća adenoza, apokrina adenoza, mikroglandularna adenoza, „radial scar“ te jednostavni fibroadenomi pripadaju skupini uobičajenih proliferacija koje ne smatramo preneoplastičnim lezijama.
- **Proliferaciju s ravnom epitelnom atipijom** (engl. *Flat Epithelial Atypia, FEA*) karakterizira umnožavanje epitelnih stanica, poredanih u jedan ili nekoliko slojeva, koje pokazuju niski stupanj citološke atipije s jezgrama koje nisu smještene uz bazalnu membranu. Najčešće nastaju na terminalnoj duktalno-lobularnoj jedinici, a stanice histološki nalikuju stanicama duktalnog karcinoma *in situ* niskog gradusa. FEA se smatra prekursorskom lezijom za nastanak karcinoma. Prema novoj klasifikaciji svrstava se kao duktalna intraepitelna neoplazija gradusa 1A (DIN 1A).
- **Proliferativne lezije s atipijom** odgovaraju stanjima u kojima postoji ekscesivan rast stanica duktusa ili lobulusa dojke, ali sa staničnom atipijom koju karakterizira stanična i nuklearna heterogenost. Rizik za razvoj karcinoma povećan je 4-5 puta. Atipičnu duktalnu hiperplaziju (engl. *Atypical Ductal Hyperplasia, ADH*) karakteriziraju dobro diferencirane uniformne stanice s okruglim hiperkromatičnim jezgama s pojedinačnim nukleolima koje tvore mikropapilarne i cribriformne formacije. Mitoze su rijetke, posebno one patološke. Stanice unutar kanalića pokazuju imunohistokemijski pozitivitet na CK8/18. Prema novoj klasifikaciji svrstava se kao duktalna intraepitelna neoplazija gradusa 1B (DIN 1B)
Toj skupini pripada i atipična lobularna hiperplazija (engl. *Atypical Lobular Hyperplasia, ALH*).
- **Duktalni karcinom *in situ* (DCIS)** karakterizira intraduktalna proliferacija s atipijom koja se očituje kroz tri stupnja (gradus I, II, III). Stanice niskog gradusa (I) su uniformne te imaju male okrugle jezge s rijetkim nukleolima koje tvore mikropapilarne i cribriformne formacije. Stanice visokog gradusa (III) imaju velike, pleomorfne jezgre s narušenom polarizacijom i distribucijom kromatina i

nukleolima. Stanice mogu činiti jedan sloj ili mikropapilane i kribriformne te solidne formacije. Često prisutne mitoze i nekroze unutar kanalića te mikrokalcifikati. Prisutnost mikrokalcifikata na mamografskoj snimci najčešći je način dijagnostike DCIS-a. Desetogodišnje preživljenje je veće od 98%. Ipak, rizik za nastanak invazivnog karcinoma povećan je 8-11 puta te se u oko 50% slučajeva DCIS-a razvije invazivni karcinom dojke (8-10). Prema novoj klasifikaciji svrstavaju se kao duktalne intraepitelne neoplazije gradusa 1C (niski gradus) do gradusa 3 (visoki gradus) (DIN 1C do DIN 3).

1.2.3. Tumorske bolesti dojke

Tumorske bolesti dojke svrstavamo u skupinu dobroćudnih ili zloćudnih tumora. Zloćudni tumori imaju sposobnost invadiranja i razaranja okolnog tkiva te širenja u druga tkiva i organe (metastaziranje). Oni mogu nastati iz bilo kojeg građevnog dijela dojke: vezivnog, žljezdanog, masnog, krvožilnog i živčanog tkiva. Obzirom na razlike u histološkoj građi i izgledu tumorskih stanica Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) (eng. *World Health Organisation, WHO*) predložila je klasifikaciju tumora dojke prema histološkom tipu koja se danas koristi u nešto modificiranom obliku (10,11).

1.2.3.1. Dobroćudni tumori dojke

Neke od najčešćih dobroćudnih (benignih) tumora dojke prema SZO su:

- EPITELNI tumori nastali iz žljezdanog tkiva obuhvaćaju adenome i intraduktalne papilome i epitelne neproliferirajuće lezije: jednostavne ciste, nesklerozirajuća adenoza, papilarna apokrina adenoza i umjerena hiperplazija epitela
- FIBROEPITELNI tumori nastali iz vezivnog i epitelnog tkiva obuhvaćaju hamartom, fibroadenome i filodes tumor
- MEZENHIMALNI tumori: nodularni fascitis, miofibrom, lipom, leiomiom, hemangiom, neurofibrom, švanom i dr.
- TUMORI BRADAVICE: adenom, Padgettova bolest, siringomatozni adenom

1.2.3.2. Zloćudni tumori dojke

Tumore dojke možemo podijeliti u dvije velike skupine s obzirom na odnos malignih stanica prema bazalnoj membrani: neinvazivni (ne probijaju bazalnu membranu) i invazivni (probijaju bazalnu membranu). Intraduktalni karcinomi ili karcinomi *in situ* koji nisu probili bazalnu membranu smatraju se prekursorskim lezijama za invazivni karcinom. Maligne stanice koje potječu od epitelnih stanica duktusa ili lobula, a koje su probile bazalnu membranu čine invazivni karcinom dojke. Obzirom da je karcinom dojke najučestaliji zloćudni tumor dojke, pod pojmom rak dojke najčešće se podrazumijeva invazivni karcinom dojke.

Prikazujemo podjelu zloćudnih tumora dojke prema tipu stanica iz kojih su nastale, po WHO klasifikaciji (11):

1) EPITELNI TUMORI

Neinvazivni karcinomi

- Intraduktalni karcinom (duktalni karcinom *in situ*)
- Pagetova bolest bradavice dojke
- Lobularni karcinom *in situ*

Invazivni karcinomi

- Mikroinvazivni karcinom
- Invazivni karcinom nespecificiranog tipa (NST, engl. *no special type*)
- Invazivni lobularni karcinom
- Tubularni karcinom
- Kribriformni karcinoma
- Mucinozni karcinom
- Karcinom s medularnim karakteristikama
- Karcinom s apokrinom diferencijacijom
- Karcinom sa stanicama izgleda poput prstena pečatnjaka
- Invazivni mikropapilarni karcinom
- Metaplastični karcinom

- Rijetki tipovi karcinoma: Neuroendokrini, Sekretorni, Onkocitni, Karcinom s gigantskim stanicama koje sliče osteoklastima, Karcinom bogat glikogenom, Karcinom bogat lipidima i sl.

2) MIJEŠANI TUMORI VEZIVNOG I EPITELNOG TKIVA

- Maligni cistosarkoma filodes

3) MEZENHIMALNI TUMORI

- Angiosarkom
- Fibrosarkom
- Leiomiosarkom
- Hondrosarkom
- Osteosarkom
- Hemangiopericitom
- Dermatofibrosarkom protuberans

4) TUMORI KOŽE DOJKE

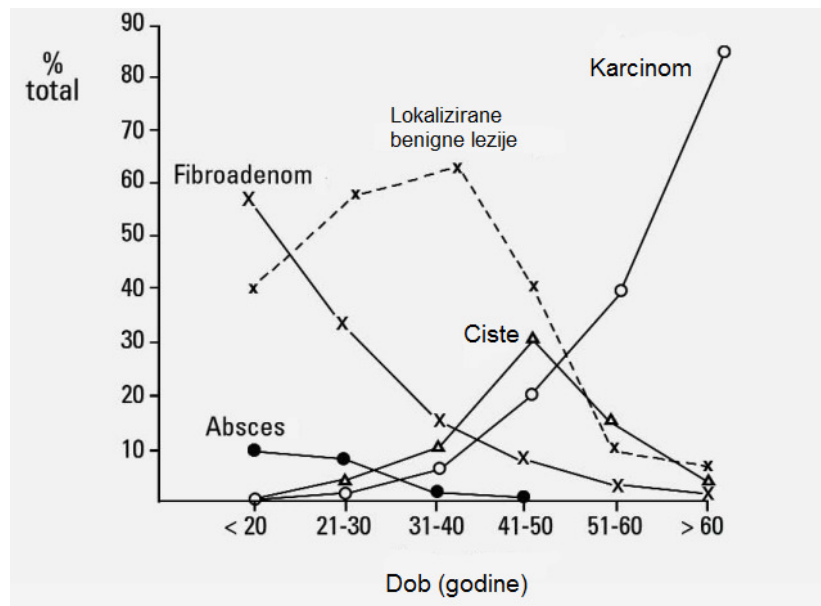
- Melanom bradavice
- Karcinom skvamoznih stanica bradavice
- Karcinom bazalnih stanica bradavice

5) TUMORI LIMFATIČKOG I HEMATOPOETSKOG TKIVA

- Hodgkinova bolest
- Non-Hodgkin limfom
- Plazmacitom
- Leukemičke infiltracije

Duktalni karcinom nastaje iz epitela kanalića u području terminalne duktulo-lobularne jedinice i najčešći je tip raka dojke, s gotovo 80% svih karcinoma dojke (11). Lobularni karcinom nastao iz epitela acinusa (lobula) čini oko 10% svih slučajeva raka dojke. Određivanje histološkog tipa karcinoma dojke ima prognostički i prediktivni značaj npr. tubularni karcinomi koji su uglavnom nižeg gradusa i bolje diferencirani pokazuju dobru

prognozu (80% bolesnica ima preživljenje više od 10 godina), a karcinomi s medularnim karakteristikama koji su obično višeg gradusa i slabije diferencirani imaju lošu prognozu (manje od 50% bolesnica ima 10-godišnje preživljenje) (12). Iz Slike 2 je vidljivo da sa starijom dobi žena dolazi do pojave agresivnijih bolesti dojke (11).



Slika 2. Pojave pojedinih bolesti dojke u odnosu na starosnu dob žena (Preuzeto i modificirano: Tavassoli F. i Devilee P., IARC Press; 2012)

1.3. Rak dojke

1.3.1. Etiologija raka dojke

Iako su karcinomi dojke već dugo predmet brojnih istraživanja, još uvijek postoje brojne etiološke nepoznanice vezane uz njihov nastanak. Do danas postoji usuglašenost o povezanosti načina života kao egzogenog etiološkog čimbenika s razvojem karcinoma dojke (13). Tome u prilog govore epidemiološki podaci o povezanosti incidencije karcinoma dojke s višim socio-ekonomskim statusom te njegove veće učestalosti u razvijenijim zemljama. Vjerojatno i podatak o povećanju incidencije unatoč unapređenju liječenja, potvrđuje ovu pretpostavku. Preko 70% žena s dijagnosticiranim rakom dojke nema poznate rizične čimbenike pa možemo pretpostaviti da su sve žene pod rizikom za nastanak raka dojke (14). Općenito je prihvaćeno gledište da je nastanak raka dojke uzrokovan djelovanjem brojnih egzogenih i endogenih čimbenika (Tablica 1) (15).

Tablica 1. Prikaz najvažnijih etioloških čimbenika na povećani relativni rizik (RR) za razvoj karcinoma dojke

Opći čimbenici (90%)	Genetički čimbenici (10%)
• Dob >65 (RR: 4 puta veći) • Proliferativne lezije s atipijom (RR: 4 puta veći) • Duljina životne izloženosti estrogenima (RR: 2-4 puta veći): nadomjesna hormonska terapija u menopauzi, gustoća dojki • Izloženost fizikalnim i kemijskim karcinogenima (RR: 2-4 puta veći) • RR: veći 1-2 puta - rana menarhe, kasna menopauza, kasna prva trudnoća, ne dojenje, nulipara, visoko-kalorijska prehrana, alkohol, smanjena tjelesna aktivnost (pretilost)	RR 2- 4 puta veći: • Genski polimorfizam • Obiteljska anamneza • Nasljedne mutacije visokorizičnih gena (BRCA1, BRCA2, PTEN, TP53, MLH1, MSH2, ATM)

Utjecaj nekog čimbenika na mogućnost obolijevanja izražavamo relativnim rizikom (RR) (Tablica 1). Čimbenike rizika svrstavamo u visoko rizične (RR iznad 4), umjereno rizične (RR 2-4) i nisko rizične (RR ispod 2) (16). Rasvjetljavanje etioloških čimbenika i njihovo bolje razumijevanje može doprinijeti boljim strategijama prevencije razvoja karcinoma dojke i definiranju visoko rizičnih osoba koje zahtijevaju češći kontrolni pregledi i dodatna testiranja (13-17).

1.3.2. Opći čimbenici nastanka raka dojke

Standardni čimbenici visokog rizika su starija životna dob, spol, rasa, nacija (Ashkenazi židovi) i obiteljska anamneza te se ne mogu izbjeći. Mnoge preporuke sugeriraju promjenu načina života, više tjelesne aktivnosti, nepušenje, pravilnu prehranu bogatu antioksidansima i vlaknima, s nižim udjelom masnoća i bogatu nezasićenim masnim kiselinama za smanjuje rizika razvoja karcinom dojke (18). Ipak, još nema čvrstih dokaza i statistički značajne povezanosti takvog načina prehrane sa smanjenim rizikom obolijevanja od raka dojke i s boljom prognozom nakon terapije (19, 20). Literatura je utvrdila značajnu povezanost raka dojke s čestom konzumacijom alkoholnih pića neovisno o životnoj dobi (21). Prekomjerna tjelesna težina povećava rizik od obolijevanja kod žena u postmenopauzi dok u premenopauzi djeluje čak zaštitnički (22). Povećanje težine smanjuje preživljenje u obje skupine bolesnica s već dijagnosticiranim rakom dojke (23). Masno tkivo sadrži enzim aromatazu ključnu u biosintezi estrogena iz androgena te tako masno tkivo povišuje endogenu razinu estrogena i daje prokancerogeni učinak. Isto tako, masno tkivo djeluje i kao akumulator karcinogena iz hrane koji su uglavnom lipofilni spojevi (24). Način života povezan s dužom izloženošću endogenim estrogenima kao što je rana prva menstruacija, kasna menopauza, kasna trudnoća ili izostanak trudnoće te egzogeni unos estrogena, preko oralne kontracepcije i hormonske nadomjesne terapije u menopauzi, povećavaju rizik razvoja karcinoma dojke (25). Predugo razdoblje korištenja oralnih kontraceptiva u premenopauzalnih žena povećava rizik od obolijevanja od raka dojke, pogotovo u slučajevima kasne trudnoće (26). Hormonsko nadomjesno liječenje simptoma menopauze i osteoporoze povećava rizik obolijevanja, koji raste s brojem godina uzimanja. Hormonsko nadomjesno liječenje povećava i rizik od kardiovaskularnih bolesti, tromboembolije i kolecistitisa (27). Mehanizam pro-karcinogenog učinak estrogena povezan je s njegovom indukcijom proliferacije, čime se povećanjem broja staničnih dioba

mogu nakupiti mutacije kao začetnici karcinogeneze. Međutim, estrogen djeluje i kao kemijski karcinogen, zbog načina metaboličke inaktivacije i popratne produkcije reaktivnih kisikovih spojeva. S druge strane, trudnoća u kojoj stanice dojke doživljavaju potpuno sazrijevanje i diferencijaciju, kao i dojenje kada stanice dojke dobivaju apoptotične signale, djeluju zaštitno te stoga višestruke trudnoće i prolongirano dojenje imaju preventivni učinak s obzirom na razvoj karcinoma dojke (28).

Dojka je, uz koštanu srž, štitnjaču i pluća, jedan od najosjetljivijih organa na karcinogenezu potaknutu zračenjem. Utjecaji zračenja na nastanak karcinoma dojke prvi put su primijećeni kod preživjelih u eksploziji atomskih bombi i kod žena liječenih zračenjem kao terapijom za Hodgkinovu bolest (29, 30). Rizik predstavlja i učestalo izlaganje malim dozama zračenja u terapijske i dijagnostičke svrhe naročito u djetinjstvu dok se tkivo dojke još nije potpuno diferenciralo (31).

1.3.3. Genetički čimbenici nastanka raka dojke

Obiteljski rak dojke podrazumijeva nastanak bolesti unutar obitelji s većom učestalošću nego u općoj populaciji. Žene s obiteljskom anamnezom raka dojke imaju veću vjerojatnost obolijevanja, koja korelira s brojem oboljelih članova obitelji, dobi obolijevanja i stupnjem srodnosti. Oboljeli srodnik unutar uže obitelji povećava rizik čak 2 do 3 puta (13). Nasljedan rak dojke nosi mutaciju gena koja se obiteljski nasljeđuje, najčešće u sklopu sindroma poput Li Fraumeni, Cowden, Peutz-Jeghers. Mutacija p53 gena, u bolesnica s Li-Fraumenijevim sindromom, dovodi do nastanka niza tumora (sarkomi, tumori dojke, tumori mozga, leukemije, karcinom grkljana i pluća), a najčešći su tumori dojke (u 25% slučajeva). Rak dojke uočen je i u 29% bolesnica s Cowdenovom bolešću (genetički sindrom povezanim s učestalim hamartomima), a često su prisutne i benigne promjene dojke, poput fibroadenoma, fibrocističnih lezija, duktalne epitelne hiperplazije i sl.

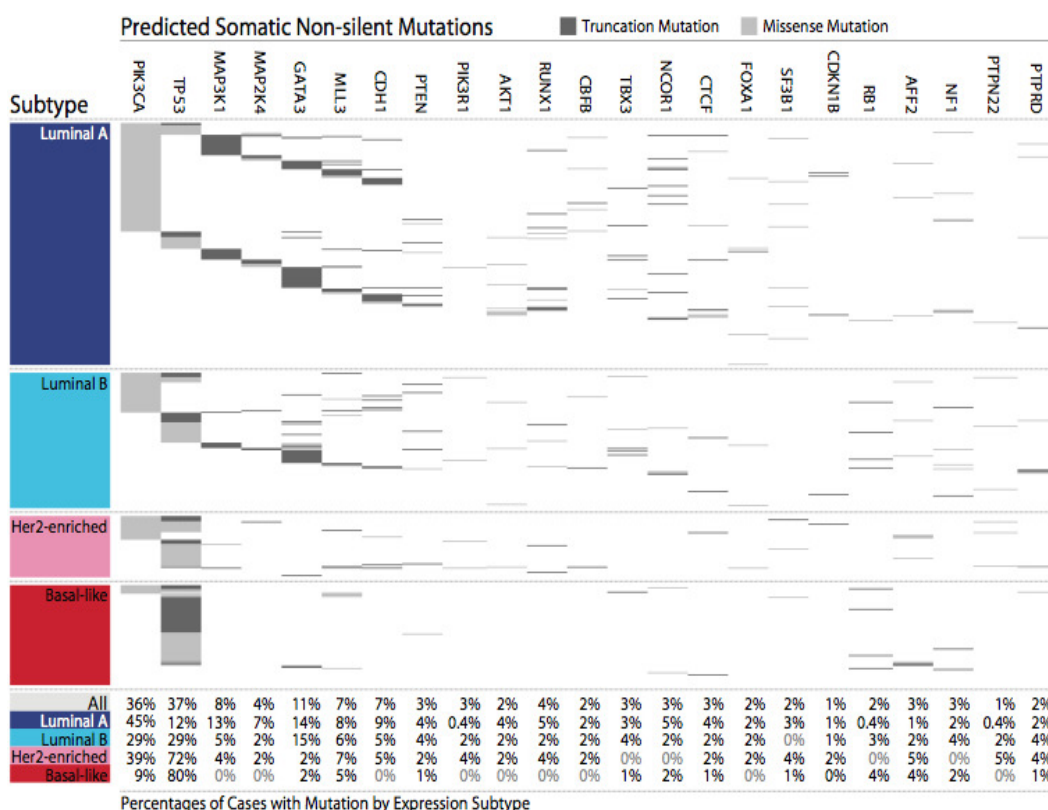
Polimorfizam gena koji sudjeluju u metabolizmu estrogena, lipida ili popravka deoksiribonukleinske kiseline (DNA) predstavljaju nizak čimbenik rizika ali u sinergizmu s egzogenim čimbenicima rizika mogu povećati rizik razvoja karcinoma.

Nasljedne mutacije čine manje od 10% ukupnog uzroka za nastanak raka dojke. Ipak, osobe koje imaju mutaciju na jednom alelu imaju dvostruko veći rizik za nastanak

karcinoma od osoba bez mutacija. Najčešće su mutacije na genima BRCA1 i BRCA2 (eng. *Breast Cancer 1 and 2 gene*) čiji nositelji imaju više od 45-85% vjerojatnost za nastanak karcinoma dojke i 11–62% vjerojatnost za nastanak raka jajnika do 70. godine života i uzrok su 1/3 ukupnih nasljednih karcinoma dojke (32, 33).

BRCA1 je ključni protein u održavanju genomske stabilnosti, popravku DNA, kontroli staničnog ciklusa te modeliranju kromatina, regulaciji transkripcije i translacije. Kao odgovor na oštećenje DNA, sudjeluje u popravku dvolančane DNA mehanizmom homologne rekombinacije kao i popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair pathway*) (33). Oba gena sudjeluju u mehanizmu popravka DNA te njihove inaktivacijske mutacije (delecije i insercije, „non-sense“ mutacije) uzrokuju onkogeni efekt u visokoproliferativnim stanicama dojke i jajnika. Budući da su BRCA 1 i 2, veliki genski lokusi, na svakom genu je do danas detektirano preko 1000 mutacija od kojih većina ima prokarcinogeni učinak (33, 34). Za sada se međunarodna baza značaja pojedinih mutacija još popunjava, budući da pojedina mutacija ne donosi nužno i oboljenje te stoga postoje dvojbeni mišljenja o potrebi za molekularnim probira osoba sa suspektom obiteljskom anamnezom (33-35). U Hrvatskoj su 2017. godine uvedene smjernice za genetičko savjetovanje i testiranje za nasljedni rak dojke i jajnika kod bolesnica koje prema anamnestičkim podacima imaju visok rizik od nastanka raka dojke (36).

Do danas je poznato još nekoliko tumor-supresorskih gena čija nasljedna mutacija na jednom alelu doprinosi visokom riziku razvoja karcinoma dojke: PTEN (engl. *Phosphatase and tensin homolog*), TP53 (engl. *Tumor protein p53*) i CDH1 (engl. *Cadherin 1*) (32). Oštećenja gena koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa, bilo da je to gubitak funkcije tumor supresorskih gena, gubitak regulacije apoptoze (kontrolirane „smrti“ stanica koje se ne mogu popraviti) ili aktivacijske mutacije ključnih onkogenata imaju za posljedice nekontroliranu diobu i rast stanica te su neposredan uzrok nastanka raka (Slika 6) (37).



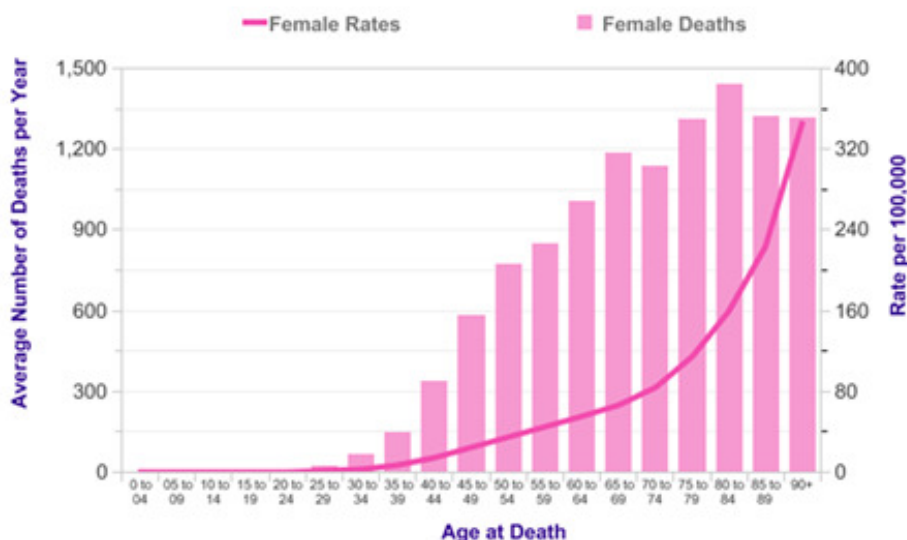
Slika 6. Karakteristične mutacija u genomu karcinoma dojke po intrinzičnim skupinama. (Preuzeto iz: <http://massgenomics.org/2012/09/a-comprehensive-atlas-of-breast-cancer-genomes.html>)

1.3.4. Epidemiologija raka dojke

Rak dojke je već dugu niz godina najčešći rak kod žena u svijetu. Visoka učestalost i još uvijek visoka smrtnost smješta rak dojke u svjetski, zdravstveni i sociološki problem. Nakon raka pluća, najčešći je uzrok smrti u odnosu na ostale tumore u općoj populaciji (9, 38, 39). Incidencija raka dojke najviša je u ekonomski razvijenijim zemljama Sjevernoj Americi i Sjevernoj Europi, kao zemljama visokog rizika, zatim Južnoj Americi i Južnoj Europi, kao zemljama srednjeg rizika te naposljetku Aziji i Africi, kao zemljama s najnižim rizikom obolijevanja (40).

Rak dojke je treći po učestalosti svih karcinoma nakon karcinoma pluća i debelog crijeva u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD). Prema izvještaju Nacionalnog instituta za rak SAD-a, incidencija raka dojke stalno je lagano u porastu (38). Ipak, prema istom registru, 5-godišnje preživljenje je poraslo sa 75,2% (1975) na 91% (2014), a smrtnost je cijelo

vrijeme lagano u padu. Prema izvještaju iz 2014. godine, od ukupnog broja novonastalih karcinoma, 14,6% su karcinomi dojke (29% kod žena) s mortalitetom od 6,8% svih smrti od karcinoma. Oko 40% dijagnosticiranih karcinoma dojke razvija regionalne ili udaljenje metastaze unatoč terapiji, a 16,4% završava smrtnim ishodom (41). Incidencija i mortalitet rastu s godinama starosti i udvostručavaju se svakih deset godina pri čemu je u dobnoj skupini između 40 i 60 godina najčešći pojedinačni uzrok smrti žena (42, 43).



Slika 3. Incidencija (stupići) i mortalitet (krivulja) karcinoma dojke prema dobi bolesnica (Preuzeto iz: Breast Cancer 2012-2014; http://www.cancerresearchuk.org/sites/default/files/cstream-node/deaths_crude_f_breast_M14.pdf)

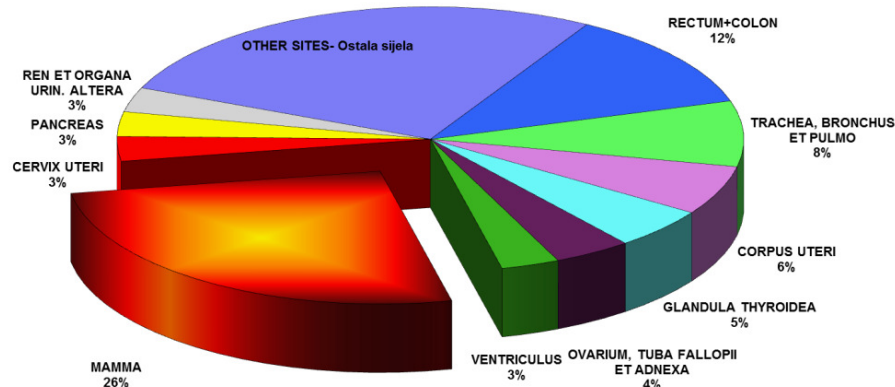
Prosječna dob dijagnosticiranja karcinoma dojke iznosi 61 godinu, a prosječna dob smrti od iste iznosi 68 godina (43). Prema izvještaju Nacionalnog instituta za rak Ujedinjenog kraljevstva (UK), incidencija raka dojke također je stalno u porastu, a rizik od nastanka karcinoma ima jedna od osam žena (Slika 3). Od ukupnog broja novonastalih karcinoma, 15% su karcinomi dojke, odnosno 28,8% svih karcinoma kod žena i smrtnost od 16,8% (44).

Incidencija raka u Hrvatskoj je u stalnom porastu te se od 1968. do 2014. više nego udvostručila, međutim u kontinuiranom porastu je i smrtnost od karcinoma (44). U Hrvatskoj će svaka 11. žena oboljeti od karcinoma dojke, gdje on obuhvaća 12,3% svih dijagnosticiranih slučajeva karcinoma te tako Hrvatsku smješta u zemlje visokog rizika obolijevanja od raka dojke (44). I u Hrvatskoj je to karcinom s najvišom incidencijom kod

žena (26%) i vrlo visokom smrtnošću žena (40%), dok je za oba spola na trećem mjestu, poslije raka debelog crijeva i pluća (Slika 4). Obuhvaća 17% svih smrtnih slučajeva uslijed karcinoma te predstavlja treći uzrok smrti žena općenito, nakon cerebrovaskularnih i srčanih bolesti (44, 45).

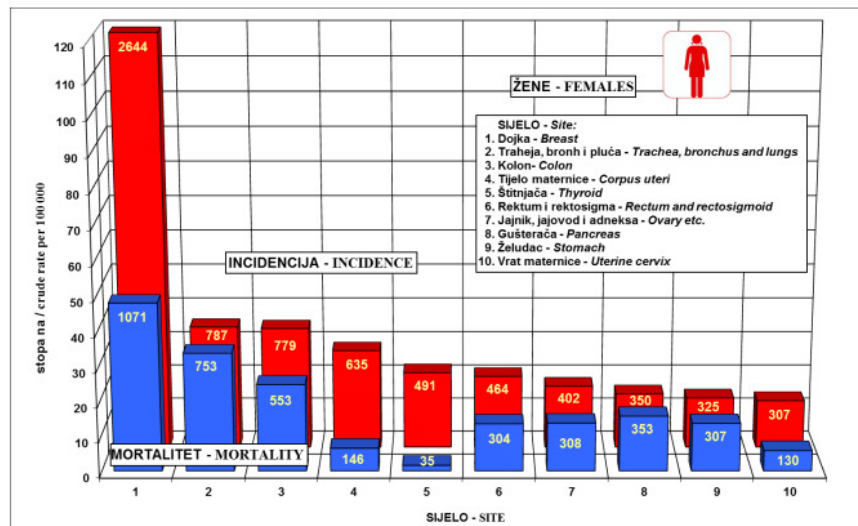
Jedna od zabrinjavajućih epidemioloških značajki je tendencija porasta stope incidencije, kako u Hrvatskoj tako i u svijetu, unatoč napredovanju u dijagnostici i terapiji. Međutim, u zemljama koje su rano počele s organiziranim programima preventivnog mamografskog pregleda uočen je pad smrtnosti. Uvođenjem probira sa svrhom ranog otkrivanja karcinoma dojke povećao se broj otkrivanja neinvazivnog karcinoma te danas DIN obuhvaća 13% svih dijagnosticiranih karcinoma dojke (46).

ŽENE - Females all ages (n = 10045)



Slika 4. Vodeća sjela karcinoma kod žena svih dobi u Hrvatskoj (Preuzeto iz: HZJZ, 2016; Bilten 39. https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2014_final.pdf)

Hrvatska je 2006. godine započela s provođenjem mamografskog probira kroz Nacionalni program ranog otkrivanja raka dojke te je nakon desetogodišnjeg probira uočen pad veličine tumora pri dijagnozi te manji broj slučajeva s pozitivnim limfnim čvorovima u pazušnoj jami. U slijedećim godinama očekuje se i zamjetan pad smrtnosti (47).



Slika 5. Trend incidencije i mortaliteta karcinoma dojke u Hrvatskoj (lijevo) u odnosu na ostala sijela (Preuzeto iz: HZJZ; 2016: Bilten 39. https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2014_final.pdf)

1.4. Dijagnostika raka dojke

Rak dojke otkriven u ranoj fazi izlječiv je u 98% slučajeva, dok je 5-godišnje preživljenje kod uznapredovalog stadija bolesti od 35-65% (27). U svrhu ranog otkrivanja raka dojke primjenjuju se brojne dijagnostičke metode što je i najvažniji korak u liječenju. Rani rak dojke nema simptoma pa se bolest obično dijagnosticira u slučaju postojanja kliničkih simptoma (kasna faza) ili slučajnim nalazom uslijed probira klinički asimptomatskih pacijentica. Kliničkim pregledom utvrđuje se postojanje simptoma, poput palpabilnih čvorića na dojnama, bolnih dojki, promjena na koži dojke i bradavicama. Uz dojke se također vrši palpacija regionalnih limfnih čvorova te utvrđuje opće stanje organizma (48). Uzimanje anamneze, osobne i obiteljske, podrazumijeva pregled svih endogenih rizičnih čimbenika kao i mogućnost povezanosti s BRCA mutacijama i potrebu za dodatnim testiranjem. Osim toga detaljnom anamnezom moguće je utvrditi patologije nekih organskih sustava koje mogu nepovoljno utjecati na ishod liječenja kemoterapijom, radioterapijom i anti-endokrinom terapijom (48).

Laboratorijskom dijagnostikom određuje diferencijalna krvna slika, jetrene probe i status tumorskih biljega u serumu CA 15-3, CA 27-29 (eng. *Cancer Antigen*), CEA

(karcinoembrionalni antigen). Tumorski biljezi, iako nisu nezavisni pokazatelji bolesti, češće se koriste pri praćenju bolesnica tijekom terapije pa je važno znati njihovu primarnu vrijednost (48).

U dijagnostici se uglavnom primjenjuju mamografija i ultrazvuk, a za složenije suspektne lezije koriste se magnetska rezonanca (MR) i pozitronska emisijska kompjutorska tomografija (PET/CT). Mamografija je radiološka metoda oslikavanja kojom se vrši probir i rana detekcija zloćudnih promjena dojki praćenjem promjena u radiografskoj gustoći dojke. Mamografija je naročito pogodna za probir kod starije populacije, kada je žljezdani parenhim dojki zamijenjen masnim tkivom. Preporuča se prvu mamografiju napraviti nakon 40. godine života, a obavezno do 50. Većina invazivnih karcinoma ima prisutne mikrokalcifikate (50%) koji su lako uočljivi mamografski. Sustav kategorizacije mamografskog nalaza naziva se Breast Imaging Reporting and Data System – skraćeno BI-RADS. Prema njemu se otkrivene promjene procjenjuju ocjenom od 0-6, gdje BI-RADS 6 predstavlja dijagnosticiran rak dojke.

Treba napomenuti da preko 20% tumora nije mamografski uočljivo pa se stoga kombinira mamografski i ultrazvučni (UZV) pregled (13). Ultrazvuk je metoda oslikavanja koja oslikava tkivo na osnovi razlike u građi tkiva i primjerenija je mlađim ženama i trudnicama jer je ugodna, bezbolna i potpuno bezopasna. Može detektirati karcinome manje od 1 cm koji nisu vidljivi mamografijom, ali s druge strane teško može detektirati sijela s mikrokalcifikatima (13, 48). Slikovne dijagnostičke metode se koriste i za kliničku, preoperativnu, procjenu proširenosti bolesti.

Ipak, suspektno uočene lezije potrebno je potvrditi direktnom analizom uzorka tkiva, citološki ili patohistološki. Iglena biopsija je preciznija metoda jer je u uzorku vidljiva histološka građa tumora pa je patohistološka analiza točnija od citološke. Uzorak se uzima pod nadzorom MRI-a ili ultrazvuka (13, 48). Danas se u kliničkoj praksi iglena biopsija koristi i kao dopuna dijagnostici pri određivanju raka koji će preoperativno biti tretiran terapijski (neoadjuvantna terapija).

Nakon operacije, analiza tumorskog tkiva uključuje niz patohistoloških parametara koji opisuju prirodu tumora i kliničku sliku. Upravo zbog izrazite heterogenosti raka dojke, prognoza i terapija određuje se individualno prema velikom broju morfoloških i molekularnih prognostičkih čimbenika. Morfološki prognostički čimbenici, od kojih su najvažniji histološki tip tumora, stupanj diferenciranosti tumora (gradus), veličina tumora, te prisutnost malignih stanica u regionalnim limfnim čvorovima određuju se na osnovi histološke slike. Molekularni biljezi, od kojih su najvažniji, izraženost receptora za

estrogen (ER) i progesteron (PR), izraženost receptora humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 (eng. *Human Epidermal growth factor Receptor 2*, HER2) i izraženost proliferacijskog biljega Ki-67 određuju se imunohistokemijskim metodama (49). Njihovo određivanje omogućuje procjenu osjetljivosti tumora na određeni terapijski agens što omogućava optimizaciju terapije, koja će poboljšati individualni ishod bolesti te produžiti preživljenje i smanjiti rizik od pojavnosti povrata bolesti.

1.4.1. Patohistološka dijagnostika raka dojke

Patologija je morfološka struka koja se bavi promatranjem promjena na stanicama (citopatologija), tkivima (histopatologija) i organima (patološka anatomija). Nakon obavljenih osnovnih dijagnostičkih postupaka bolesnicu s karcinomom dojke treba svrstati u jednu od skupina prema stadiju bolesti i odrediti podtip karcinoma radi određivanja vrste terapije i pristupa liječenju. Duktalni invazivni karcinom dojke je najčešći histološki tip i čini do 85% svih karcinoma dojke. Ovaj patohistološki tip obuhvaća širok spektar izrazito heterogene skupine tumora koji pokazuju različitu histološku građu, biološko ponašanjem, agresivnost i sklonost metastaziranju pa i različit odgovor na terapiju. Tu se ne radi samo o različitim morfološkim osobinama, već i o razlikama na molekularnoj razini naizgled morfološki sličnih karcinoma što se reflektira u različitoj osjetljivosti na kemoterapijsko i hormonsko liječenje. Do njegove dijagnoze dolazi se isključivanjem ostalih specifično definiranih oblika karcinoma (10, 11).

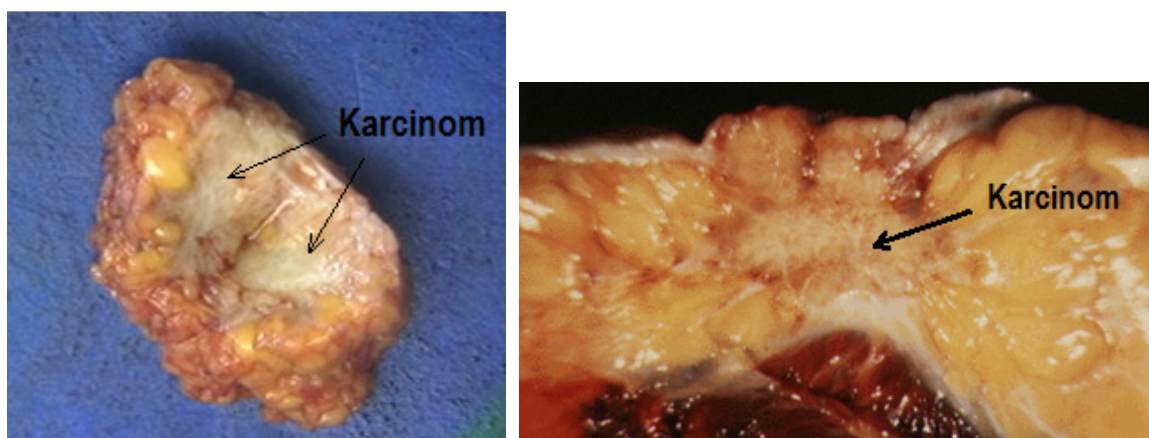
Makroskopski, duktalni invazivni karcinom uglavnom pokazuje neoštro ograničeni infiltrativni rast (rjeđe nodularni). Varijacije u veličini tumora su velike, ali tumor je obično tvrđe konzistencije zbog dezmodoplastične strome, a često i s mikrokalcifikatima, što omogućava rano otkrivanje mamografijom (13, 50). Mikroskopska slika također pokazuje varijacije s obzirom na način rasta i morfologiju. Tumorske stanice variraju u izgledu i veličini stanica (pleomorfne) s oskudnijom, eozinofilnom citoplazmom i brojnim mitozama u usporedbi s normalnim duktalnim epitelom (13, 50). Tumor može rasti u obliku nepravilnih solidnih nakupina, dobro formiranih gnijezda, tračaka ili pojedinačnih stanica. Imunohistokemijski, tumor izražava citokeratine (CK) male molekulske mase (CK 7, CK 8, CK 18, CK 19), E-cadherin i epitelni membranski antigen (10, 11, 13, 50).

Patohistološka dijagnostika karcinoma dojke uključuje makroskopski histološki pregled tumorskog tkiva, određivanje histološkog tipa karcinoma prema klasifikaciji SZO i

histološkog gradusa tumora i stupnjevanje karcinoma dojke prema patološkom TNM-u te određivanje ostalih prognostičkih čimbenika raka dojke u svrhu individualizacije prognoze (11, 51).

Najvažniji prognostički čimbenici karcinoma dojke su:

- Dob bolesnice
- Odnos tumora i bazalne membrane
- Veličina primarnog tumora
- Histološki tip tumora
- Histološka diferenciranost tumora (gradus)
- Proliferacijska sposobnost tumorskih stanica (mitotski indeks)
- Karakteristika upalnog infiltrata u tumoru i njegovoj periferiji
- Prisutnost žilne (limfovaskularne) invazije
- Status limfnih čvorova (broj, mjesto i veličina pozitivnih limfnih čvorova)
- Postojanje udaljenih presadnica i njihova lokacija
- Izraženost receptora za estrogen i progesteron
- Izraženost biljega proliferacije Ki-67 (MIB-1)
- Izraženost HER2 (receptora i/ili gena)



Slika 7. Makroskopski izgled karcinoma dojke

1.4.2. Morfološki prognostički čimbenici

Osim patohistološke slike, za prognozu i liječenje raka dojke, potrebno je odrediti i klinički stupanj proširenosti tumora (10, 11). U tu svrhu upotrebljava se TNM sustav stupnjevanja raka dojke prema parametrima veličine primarnog tumora (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova tumorskim stanicama (N) te prisutnost udaljenih metastaza (M) na slijedeći način:

pTx	Primarni tumor se ne može dokazati
pT0	Nepalpabilan tumor
pTis	Preinvazivni rak (neinfiltrirajući intraduktalni rak), Pagetova bolest
pT1	Tumor s najvećim promjerom do 2 cm
pT1a	Tumor s najvećim promjerom do 0,5 cm
pT1b	Tumor s najvećim promjerom između 0,5 i 1 cm
pT1c	Tumor s najvećim promjerom između 1 i 2 cm
pT2	Tumor s najvećim promjerom između 2 i 5 cm
pT3	Tumor s najvećim promjerom većim od 5 cm
pT4	Tumor bilo koje veličine s direktnim širenjem na zid prsnog koša ili kožu
pT4a	Zahvaćen zid prsnog koša
pT4b	Edem, prožimanja ili ulceracija kože dojke
pT4c	Obuhvaća T4a i T4b
pT4d	Upalni karcinom
pNx	Regionalni limfni čvorovi se ne mogu odrediti
pN0	Regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni
pN1	Istostrani pazušni limfni čvorovi su zahvaćeni i pomični
pN1a	mikrometastaze, promjera manjeg od 0,2 cm
pN1b	metastaze u jednom ili više limfnih čvorova veće od 0,2 cm
pN1bI	metastaze u jednom do tri limfna čvora, veličine 0,2 do 2 cm
pN1bII	metastaze u 4 ili više limfnih čvorova, veličine 0,2 do 2 cm
pN1bIII	tumor probija kapulu limfnog čvora i manji je od 2 cm
pN1bIV	metastaze u limfnom čvoru veličine 2 cm ili veće
pN2	Istostrani pazušni limfni čvorovi srasli međusobno ili na susjedne strukture
pN3	Zahvaćeni su istostrani unutrašnji limfni čvorovi unutar dojke

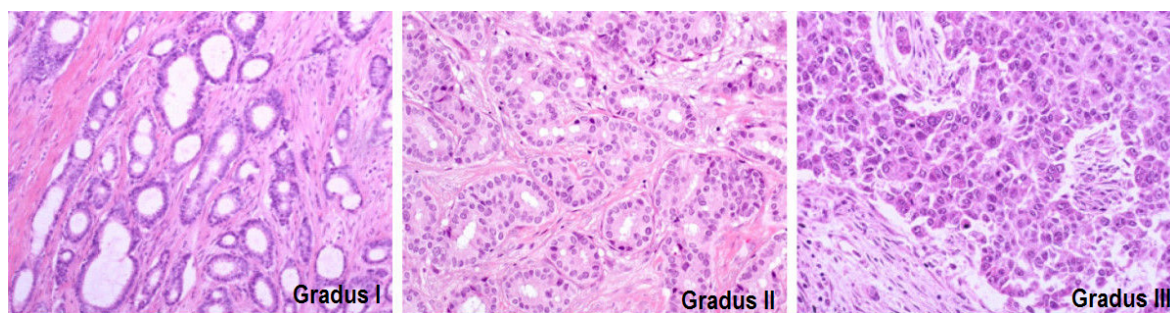
Mx	Metastaze se ne mogu odrediti
M0	Nema dokaza udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze (uključujući metastaze u istostrane supraklavikularne limfne čvorove)

Veličina tumora određuje se prilikom patohistološke obrade materijala, makroskopskim pregledom i mjerenjem u nativnom stanju. Veličina tumora u pozitivnoj je korelaciji s pojavom tumorom zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova što ukazuje na lošiju prognozu, smanjujući stopu preživljenja i povećavajući vjerojatnost povrata bolesti (52). Bolesnice s primarnim tumorom do 5 mm veličine pokazuju 10%-tni rizik pojavnosti metastaza, a do 20 mm veličine 30%-tni rizik (53). Petogodišnja stopa preživljenja bolesnica s tumorom manjim od 20 mm bez zahvaćenih limfnih čvorova je 96%, dok je u onih s promjerom većim od 50 mm i zahvaćenim limfnim čvorovima samo 43%. Promjer tumora i broj zahvaćenih limfnih čvorova neovisni su prognostički čimbenici. Paradoksalno, ekstremno veliki tumori pokazuju nešto bolju prognozu od tumora srednje veličine (54).

Histološkim gradusom tumora procjenjujemo agresivnost tumorskog fenotipa i njegovu histološku sličnost sa zdravim tkivom iz kojeg je nastao (Tablica 2). Osnovni kriterij stupnjevanja je ocjena arhitekture tumorskog tkiva prema tri morfološke kategorije, koja uključuje postotak tubularnih žljezdanih formacija; nuklearni polimorfizam (varijacije u veličini i obliku jezgre, izraženosti nukleola kao i granuliranost kromatina) i broj stanica u mitozu uočenih na 10 vidnih polja velikog povećanja mikroskopa, a koje se broje na periferiji tumora (55). Histološki gradus predstavlja zbroj bodova pojedinačnih kategorija pri čemu gradus I ima 3-5 bodova, gradus II 6-7 te gradus III, 8-9 bodova. Gradus I predstavlja dobro diferenciran tumor i pokazuje bolju prognozu od slabo diferenciranog tumora gradusa III. Histološki gradus je značajan neovisan prognostički čimbenik, a njegova prognostička vrijednost još raste u kombinaciji s drugim prognostičkim čimbenicima od kojih su najvažniji veličina tumora i stanje regionalnih limfnih čvorova (56). Određivanje prirode karcinoma je od iznimne važnosti jer agresivniji karcinomi zahtijevaju i agresivniji terapijski pristup tako da gradus ima i prediktivni značaj. Tumori višeg gradusa bolje reagiraju na kemoterapiju zbog pojačane proliferacije, ali karcinomi gradusa III imaju 9 puta veći rizik od povrata bolesti unutar pet godina nego oni gradusa II (57-59).

Tablica 2. Određivanje histološkog gradusa karcinoma dojke prema Nottingham sustavu

Bod	Tubularne formacije	Nuklearni polimorfizmi	Broj mitoza (u 10/HPF)
1	>75%	minimalne varijacije	0-9
2	10-75%	srednje varijacije	10-19
3	<10%	jako izražene varijacije	>20



Slika 8. Mikrofotografije karcinoma dojke histološkog gradusa I-III (Preuzeto i modificirano iz: Rakha i sur.; Breast Cancer Res. 2010; 12(4):207)

Regionalni limfni čvorovi pazuha primarno su mjesto metastaziranja karcinoma dojke, a zahvaćeni su u oko 40-50% bolesnica u trenutku dijagnoze (60). Predstavljaju najvažniji prognostički ali i prediktivni čimbenik, pri čemu je desetogodišnje preživljenje bolesnica s negativnim limfnim čvorovima 75% za razliku od 30% kod bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima (61). Ukupno preživljenje i rizik od pojave recidiva ne ovisi samo o broju zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova, već i njihovoj lokalizaciji te veličini tumorskih depozita u njima što je uključeno u pTNM klasifikaciju (62).

1.4.3. Molekularni prognostički čimbenici

Za potpunu patohistološku dijagnostiku karcinoma dojke nalaz, pored morfoloških karakteristika tumora, mora sadržavati i podatke o izraženosti estrogenskih, progesteronskih i androgenih receptora, postotak stanica u proliferaciji te izraženost receptora za faktore rasta 2 (HER2; eng. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*). Navedeni molekularni čimbenici ključni su u postupku terapije te se rutinski određuju na svakom invazivnom karcinomu dojke. Nakon preuzimanja i makroskopske obrade tumorskog tkivo se fiksira u 10% formalinu te uklapa u parafin. Tako pripremljeno tkivo adekvatno je za potrebe dodatnih testiranja.

1.4.3.1. Receptori za estrogen i progesteron

Rast tkiva dojke u pubertetu i trudnoći, kao i promjene tijekom mjesečnih ciklusa, kontrolirane su spolnim hormonima, estrogenom i progesteronom, koje luče jajnici. Njihovi receptori su složene građe i pripadaju obitelji steroidnih receptora koji imaju DNA veznu domenu i funkciju transkripcijskih faktora. Aktivacija pojedinih gena ovisi o ligandu (estrogen ili progesteron) pa treba naglasiti da se npr. estrogen može vezati na oba receptora i aktivirati dva različita seta gena. Steroidni receptori tako mogu kontrolirati izraženost oko 100-tinjak gena putem specifičnih obrasca genskih aktivacija i inaktivacija što za posljedicu ima proliferaciju stanica (63). Utvrđeno je postojanje dva tipa estrogenskih receptora (ER-alfa i ER-beta), dok se progesteronski receptor (PR) sastoji od A i B podjedinice (heterodimer). Prisutnost PR ukazuje da je estrogenski put očuvan iako se ne može utvrditi prisutnost receptora za estrogen. U tkivu hormonski aktivne dojke ER alfa je dominantan. Aktivacija ER rezultira uglavnom proliferativnim učinkom, dok progesteron ima učinak diferencijacije i kontrole proliferacije u zdravim stanicama. Sinteza progesteronskih receptora pozitivno je regulirana ligand ovisnom aktivacijom estrogenskih receptora (64).

Ovisno o populaciji, 50-85% karcinoma dojke izražava hormonske receptore i s porastom dobne skupine bolesnice, povećava se i udio tumora pozitivnih na ER (63-68). Izraženost ovih receptora ima prediktivni značaj jer omogućava individualizaciju terapije. Izraženost ER i PR receptora određuje se imunohistokemijskom metodom bojenja, a očitava se kao

postotak obojenih tumorskih jezgara, neovisno o intenzitetu obojenja. Kvantifikacija rezultata već je dugo predmet rasprave. Do sada je postojalo nekoliko kriterija za određivanje pozitivnog statusa te je 10% pozitivnih tumorskih stanica bila granična vrijednost (eng. '*cut-off point*') (48, 69-71). Od 2009. godine u St. Gallenu (Švicarska) dogovoren je novi kriterij: pozitivnom se smatra svaka, imunohistokemijski pozitivna reakcija jezgara tumorskih stanica neovisno o intenzitetu i postotku obojenih stanica (70). Ukoliko je rezultat ER i PR bojenja negativan u uzorku dobivenom biopsijom iglom, testiranje treba ponoviti na velikom uzorku dobivenom nakon kirurškog zahvata (72).

Tumori koji izražavaju ER i PR pokazuju viši stupanj diferencijacije što ukazuje na manje agresivan fenotip. Istovremena izraženost oba hormonska receptora pokazuje pozitivnu korelaciju s učinkovitim odgovorom na hormonsku terapiju, dok u slučaju neizražavanja oba receptora hormonska bolesnice primaju kemoterapiju (73). Izraženost receptora za estrogen u korelaciji je s nižim histološkim gradusom, manjom tumorskom masom, nižim proliferacijskim indeksom, diploidnim sadržajem DNA i manjim brojem zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova (66, 68, 74). Sve navedeno ukazuje na bolju prognozu, a 50-60% bolesnica s hormonski pozitivnim tumorima povoljno će reagirati na anti-estrogensku terapiju (65). Hormonski negativni karcinomi dojke pokazuju mnogo agresivniji fenotip i često sadrže amplifikaciju HER2, c-Myc i Int2 onkogeni i mutacije p53 tumor supresorskog gena (66). Negativan ER ima 2,5 puta veći rizik od povrata bolesti unutar pet godina (75).

1.4.3.2. Proliferacijski biljeg Ki-67

Proliferacijski biljezi su molekule prisutne u stanicama isključivo u aktivnim fazama staničnog ciklusa (G1, S, G2 i M). Jedan od proliferacijskih biljega koji se koristi u rutinskoj dijagnostici karcinoma dojke je Ki-67. Ki-67 je nehistonski protein koji se nalazi u jezgrama stanica svih faza staničnog ciklusa osim G0. Zdravo tkivo dojke izražava biljeg Ki-67 u manje od 3% stanica dok kod karcinoma on može biti izražen u visokom postotku (čak do 90%) (76). U kliničkoj primjeni određuje se imunohistokemijskim obojenjem jezgara te se izražava u postotku. Kriteriji za očitavanje su se također mijenjali tijekom godina. Klasifikacija u nizak stupanj proliferacije (0-14,6%), srednji stupanj (15-30%) i visoki stupanj (više od 30%) proliferacije 2011. godine promijenjena je na „cut-off“

vrijednost od 14,7%, a potom na 20% prema smjernicama iz St. Gallena, 2013. godine (71).

Visoka proliferacija je u pozitivnoj korelaciji s histološkim gradusom tumora, brojem zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova, mutacijama p53 gena i ostalim pokazateljima proliferacijske aktivnosti. U negativnoj je korelaciji s hormonskim receptorima, a s veličinom tumora nužno ne pokazuje povezanost. Visoki pozitivitet Ki-67 je povezan lošijom prognozom kod bolesnica koje nisu primile terapiju i s visokim rizikom od povrata bolesti (75). S druge strane visoka proliferacijska aktivnost ukazuje na bolji odgovor na kemoterapiju a visoki pozitivitet u ostatnom tumoru nakon tretmana, ukazuje na slab odgovor na terapiju i veliku vjerojatnost povrata bolesti (77-79). Biljezi proliferacije nemaju značajnu ulogu kao nezavisni prognostički čimbenici, ali imaju primjenu tijekom praćenja uspješnosti terapije (78). Novija istraživanja pokazuju da samo Ki-67 iznad 30% pozitivnih stanica ima utjecaj na lošije preživljenje bolesnica s karcinomom dojke (79, 80).

1.4.3.3. Receptor HER2

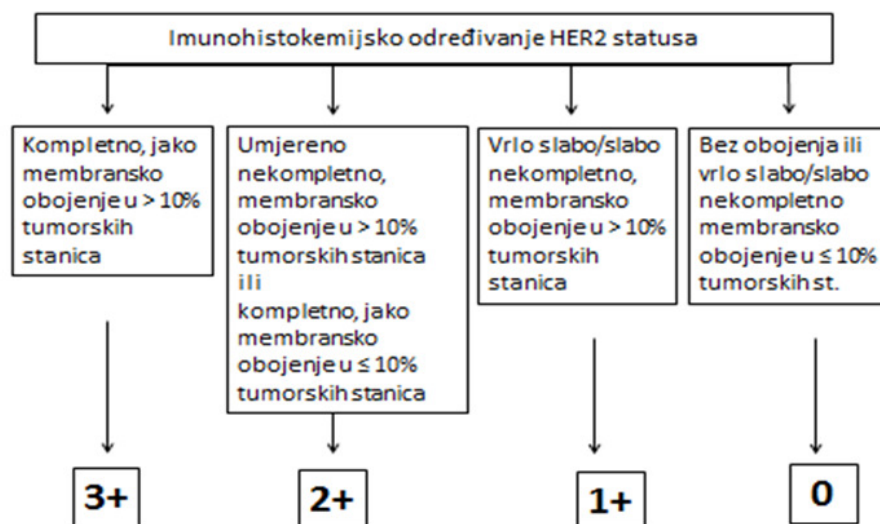
Proliferacija epitelnih stanice dojke ne aktivira se samo preko steroidnih receptora već i preko receptora humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 (eng. *human epidermal growth factor receptor*, HER2). Epitelne stanice kanalića dojke ne izražavaju HER2 receptor na svojoj membrani u dovoljnoj količini da bi pokazale vidljivu imunohistokemijsku reakciju te se smatraju negativnim. Receptor HER2 je prekomjerno izražen u 15-20% invazivnih karcinoma dojke te u 50% karcinoma *in situ* (81, 82). Povišenom količinom receptora HER2 na membrani stanica dobiva proliferativno, antiapoptotsko, angiogenezno i metastatsko onkogeno obilježje. Rutinski se određuje imunohistokemijski (IHC), najčešće HercepTestomTM i/ili nekom od metoda hibridizacije *in situ*. Metode hibridizacije *in situ* su osjetljivije i pouzdanije metode i najčešće se koriste u slučaju dvojbenog rezultata Hercep TestaTM (83). Što točnije određivanje izraženosti receptora HER2 potrebno je kako bi se preciznije izdvojile bolesnice prikladne za terapiju trastuzumabom (Herceptin[®], Genentech, Roche) (83-86). Trastuzumab je humanizirano rekombinantno monoklonsko protutijelo specifično usmjereno na receptor HER2 pa se svakodnevno primjenjuje kao terapija HER2 pozitivnih karcinoma u kombinaciji s još nekom odabranom terapijom (84-90).

Do danas se već nekoliko puta mijenjao kriterij za očitavanje pozitivnog receptora HER2. Prema dogovoru iz St. Gallena (2013.), imunohistokemijsko očitavanje je vraćeno na kriterij kontinuiranog membranskog obojenja u više od 10% tumorskih stanica te se očitava kao (Slika 9 i 10):

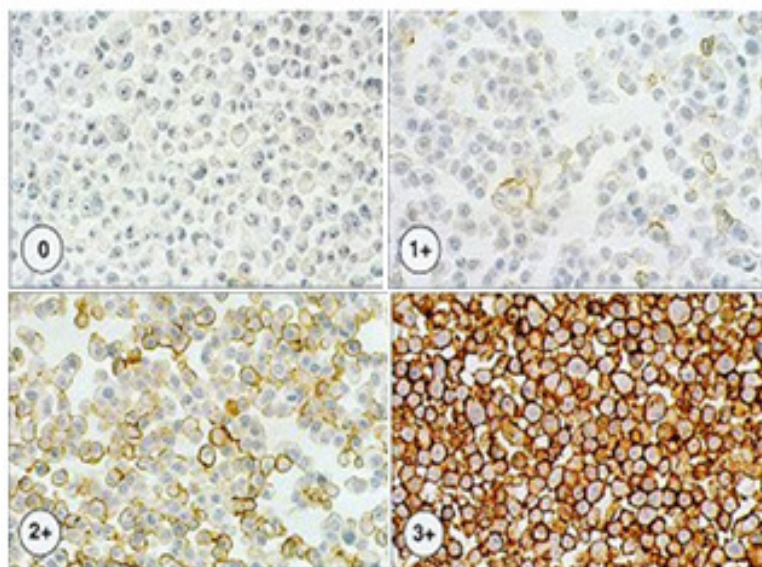
0 i 1+, negativan – tumorske stanice koje pokazuju odsutnost obojenja ili slabo obojenje HER2 receptora, što je ekvivalentno oko 20 000 receptora na membrani stanica, a interpretira se kao negativan rezultat

2+, nejasan - umjereno obojenje vidljivo u više od 10% tumorskih stanica, što je ekvivalentno oko pola milijuna receptora po stanici, a interpretira se kao nejasan rezultat. IHC 2+ rezultat traži dodatnu provjeru metodama hibridizacije *in situ*

3+, pozitivan – kontinuirano, jako obojenje vidljivo u više od 10% tumorskih stanica (3+), što je ekvivalentno više od 100 puta povećanom broju receptora u odnosu na normalnu stanicu, odnosno oko 2 milijuna receptora po stanici, a interpretira se kao pozitivan rezultat.



Slika 9. Algoritam očitavanja imunohistokemijske reakcije HER2 receptora



Slika 10. Imunohistokemijska izraženost HER2 receptora na membrani tumorskih stanica

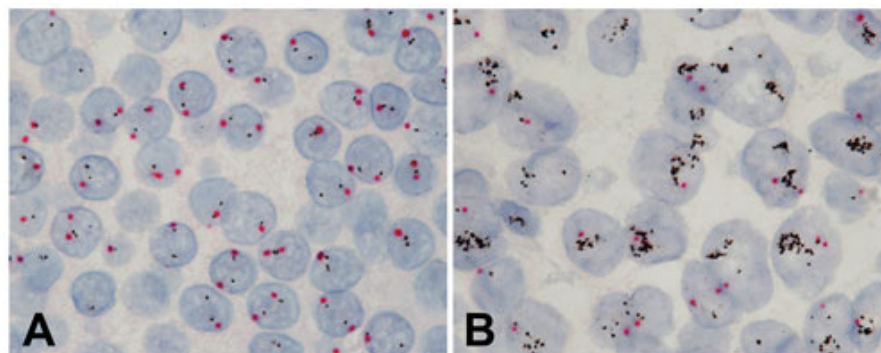
Metode hibridizacije *in situ* (eng. „*in situ*“ *hybridization*) detektiraju povećani broj kopija HER2 gena (amplifikacija). Zbog potrebe za dobrim probirom bolesnica za terapiju trastuzumabom također se više puta mijenjao kriterij očitavanja rezultata hibridizacije *in situ*, a i sama metoda je doživjela nekoliko modifikacija. Osnovni princip metode koristi kratki segment DNA sondu/probu komplementarnu odsječku HER2 gena, koja se metodom hibridizacije veže na HER2 gen u stanici. U modifikacijama metode mjesto vezanja se vizualizira:

- korištenjem DNA probe obilježene fluorescencijskim bojama (FISH)
- korištenjem DNA probe konjugirane s digoksinom ili dinitrofenilom, omogućava upotrebu sekundarnog protutijela te bojenje kromogenom (CISH) ili srebrom (SISH)
- istovremeno korištenje dvije probe (dual ISH) specifične za HER2 gen i regiju centromere kromosoma 17 (CEP17). Dvostukim bojenjem/kromogenom vizualiziraju se obje probe (Slika 11)

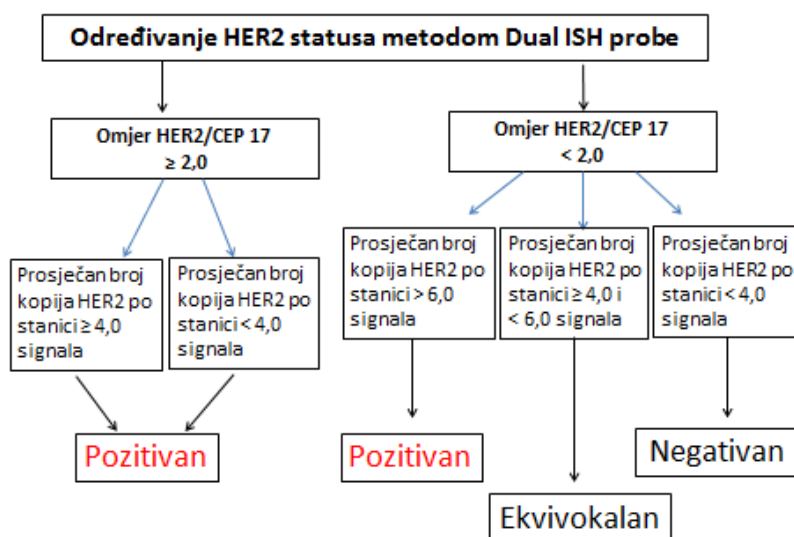
Rezultati hibridizacije vidljivi su kao intranuklearni signali, gdje pojedinačni signal predstavlja jedan HER2 genski lokus (Slika 11). Normalne stanice bez amplifikacije gena HER2 pokazuju dva intranuklearna signala. U slučaju povećanog broja kromosoma 17 (polisomija) koji se pojavljuje u tumorskim stanicama vidljivo je tri do pet signala po stanici koji se interpretiraju kao negativni rezultati. U starom načinu očitavanja detekcija šest ili više pojedinačnih intranuklearnih signala po stanici vidljivih u više od 50%

tumorskih stanica smatra se pozitivnim rezultatom CISH-a [6 do 10 signala predstavljaju nisku amplifikaciju, a više od 10 signala visoku amplifikaciju (86)].

Novom metodom dvostrukog bojenja koriste se dvije probe/sonde kako bi se u slučaju polisomije izbjegao lažno pozitivni rezultat. U ovom slučaju, dual ISH metodom, koristi se algoritam omjera dvaju signala u jezgri tumorske stanice prikazan na Slici 12. Ekvivokalan nalaz zahtjeva dodatno brojanje signala ili ponavljanje analize na novom uzorku.



Slika 11. Mikrofotografija HER2 hibridizacije *in situ* upotrebom dvostruke probe (crveni signali – CEP 17; crni signali – HER2 gen), bojano srebrom - dual SISH: A, bez amplifikacije; B, amplifikacija HER2 gena (povećanje 400x)



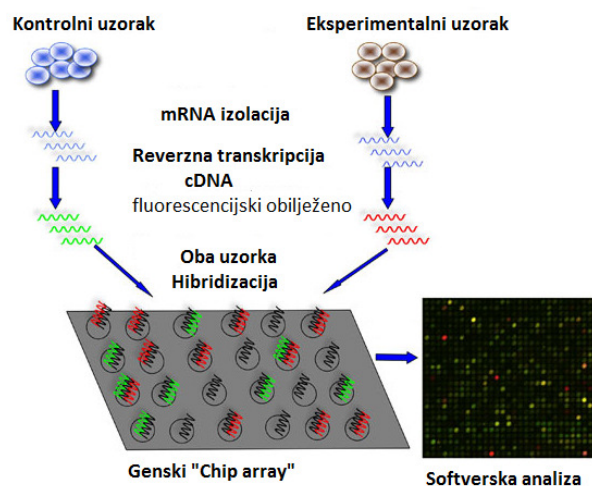
Slika 12. Algoritam određivanja statusa HER2 metodom hibridizacije *in situ* upotrebom dvostrukog bojenja HER2 gena i centromere kromosoma 17 (CEP17)

Prekomjerna izraženost receptora HER2 pokazuje najjaču povezanost s veličinom tumora, većim histološkim gradusom i većim brojem zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova odnosno s lošijom kliničkom slikom te kraćim preživljenjem (49). Međutim, kao i status steroidnih receptora, učinkovitiji je kao prediktivni čimbenik za primjenu anti-HER2 terapije i odgovora na određenu vrstu kemo- i hormonske terapije (91, 92).

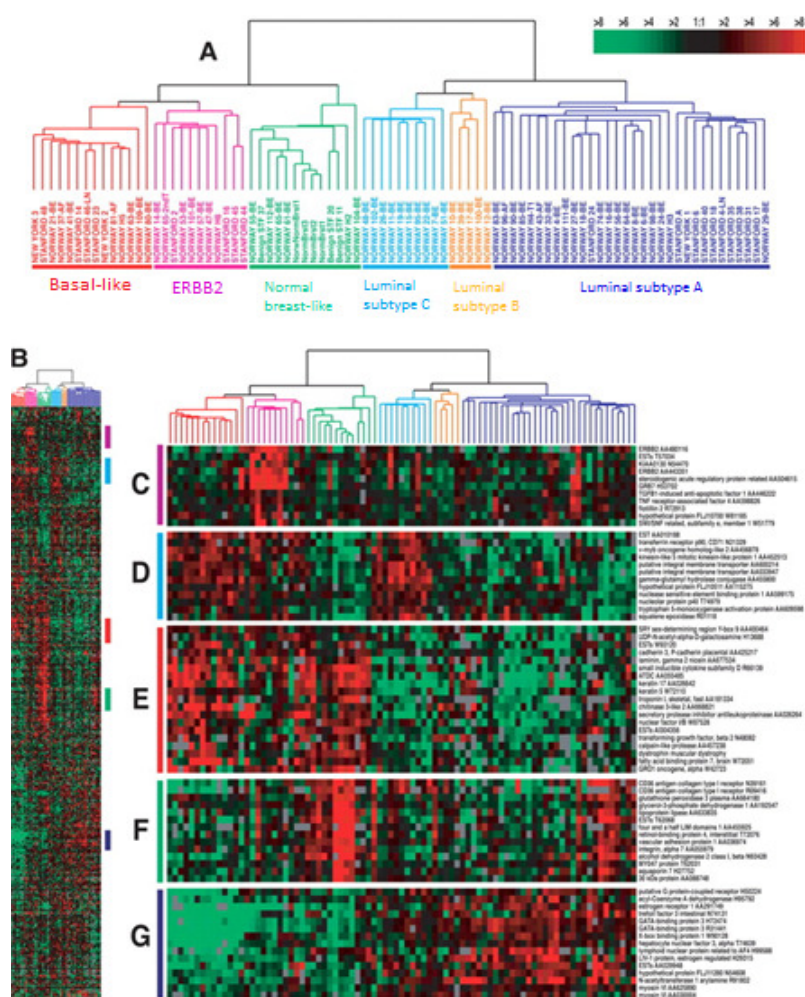
1.4.4. Molekularna sub-klasifikacija karcinoma dojke

Primjenom modernih metoda DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*) mikročip tehnologije moguće je pratiti aktivnost velikog broja gena unutar tumorskih stanica. Osnovni princip metode prikazan na Slici 13 koristi mogućnost izolacije ukupne glasničke ribonukleinske kiseline (eng. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) iz željenog uzorka i kontrolnog tkiva. Postupkom reverzne transkripcije iz mRNA se sintetiziraju komplementarne DNA (cDNA) ili cRNK probe obilježene fluorescencijskim bojama (svaki uzorak drugom bojom). Mjerenjem valne dužine i intenziteta fluorescencijske boje, softver očitava vezanje obilježenih proba na kratke odsječke DNA vezane na čip pločici. Na osnovi očitanih rezultata možemo utvrditi koji su geni jače, a koji slabije izraženi u uzorku, u odnosu na kontrolu (Slika 13). Tako se analizom genske ekspresije došlo do detaljnijih podataka o heterogenosti raka dojke. Obzirom da je tkivo dojke hormonski ovisno, u metodi komparativne genske analize je dokazano da, uz veliki broj drugih gena, klasični molekularni biljezi ER, PR HER2 i biljezi proliferacije mogu poslužiti za klasifikaciju karcinoma dojke.

Do danas je razvijeno nekoliko komercijalnih testova, primjerice MammaPrint, Oncotype DX, PAM50 i Mammastrat koji prate aktivnost 21-70 gena i procjenjuju rizik od povrata bolesti i potencijalni odgovor na onkološku terapiju (41, 92, 93). Ovi testovi imaju najveći značaj kod bolesnica koje imaju prognostički „dobar“ karcinom (ER/PR pozitivan, HER2 negativan) kako bi se procijenila potreba za agresivnijom terapijom. U sve modele su uključeni proliferacijski biljezi jer bez njih ovi testovi nemaju potrebnu težinu.



Slika 13. Shematski prikaz metode komparativne genomske hibridizacije (Preuzeto i modificirano: <https://bitesizebio.com/7206/introduction-to-dna-microarrays/>)



Slika 14. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke na osnovi rezultata genske izraženosti (Preuzeto iz: Sørlie i sur. PNAS 2001;98:10869-74)

U procesu definiranja molekularnih podskupina dolazilo je do manjih promjena te se danas rak dojke svrstava u pet skupina koje se međusobno značajno razlikuju po skupinama aktivnih i potisnutih gena u odnosu na zdravo tkivo dojke (Slika 14) (93). Karcinomi luminalnog tipa posjeduju visoke količine gena karakterističnih za epitelne stanice lumena kanalića normalnog tkiva dojke (92). Osim spomenutih, postoje i brojni drugi biološki markeri u svojstvu prognostičkih čimbenika od kojih su neki još uvijek predmet istraživanja, kao što su HER1, p53, bcl-2, cyclin D, TGF α , c-myc, claudin, p27, nm23 i drugi. Stoga se dogovorno, na osnovi imunofenotipa, karcinomi dojke mogu svrstati u osnovne (intrinzične) podtipove koji većinom odgovaraju molekularnoj klasifikaciji.

Luminalni A (LumA) podtip karcinoma je najčešći i javlja se oko 40% slučajeva (95). Lum A izražavaju hormonske receptore (ER/PR pozitivni), ali su HER2 negativni, te su najčešće niskog gradusa s niskim proliferacijskim indeksom (Tablica 3). Oni pokazuju najmanje agresivan fenotip i osjetljivi su na endokrinu terapiju. Žene s ovim podtipom karcinoma rijetko primaju citotoksičnu terapiju osim ako imaju karcinom gradusa III, više pozitivnih limfnih čvorova ili temeljem MammaPrint ili Oncotype DX testa pokazuju visoki rizik od povrata bolesti. Ovi karcinomi izražavaju luminalne citokeratine (CK 8/18), FOXA1 (engl. *Forkhead box protein A1* ili *hepatocyte nuclear factor 3 alpha*), XBP1 (engl. *X-box binding protein 1*), GATA 3 (engl. *GATA binding protein 3*), BCL2 (engl. *B cell lymphoma 2*), HER3 i HER4 (91, 93).

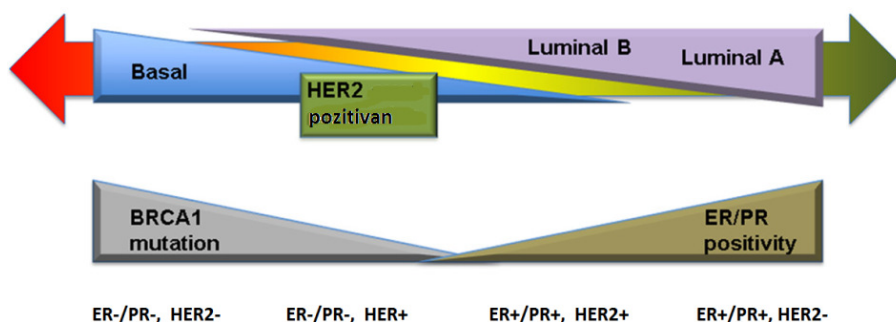
Luminalni B (LumB) podtip karcinoma javlja se u manje od 26% slučajeva (95). Imaju izražene hormonske receptore prema kriterijima navedenima u Tablici 3, ali se prema izraženosti receptora HER2 mogu podijeliti u dvije podskupine:

LumB/HER2 negativni karcinomi koji imaju izražene hormonske receptore, a nemaju prekomjerno izražen receptor HER2. Pogodni su za endokrinu terapiju, ali zbog visokog proliferacijskog biljega najčešće u kombinaciji s citotoksičnom terapijom. Obično su višeg gradusa nego LumA i izražavaju gene uključene u proliferaciju kao MYB (engl. *myeloblastosis viral oncogene homolog*), GGH (engl. *gamma glutamyl hydrolase*), LAPTMB4 (engl. *lysosome-associated transmembrane protein 4-beta*), NSEP1 (engl. *nuclease sensitive element binding protein 1*) i CCNE1 (engl. *cyclin E1*).

LumB/HER2 pozitivni karcinomi imaju izražene steroidne receptore i HER2 receptor te čine oko 30% Luminal B skupine. Terapijski su tretirani kombinacijom endokrine, citotoksične i anti-HER2 terapije (trastuzumab) (96). Prema istraživanju Parise i sur. (97)

bolesnice s LumB/HER2+ karcinomima imaju bolje sveukupno petogodišnje preživljenje od onih s LumB/HER2 negativnim karcinomima.

HER2/neu tip karcinoma koji izražavaju samo receptor HER2 (ne-luminalni) javljaju se kod mlađih bolesnica, agresivne su prirode, najčešće gradusa III s brzim relapsom, ali ih je moguće tretirati citotoksičnom terapijom (antraciklini) u kombinaciji s terapijom monoklonskim protutijelima na sam receptor - trastuzumab ili panitumumab (93, 96). U ovom slučaju govorimo o HER2 pozitivnom podtipu jer ovi karcinomi prekomjerno izražavaju HER2, ali imaju negativne hormonske receptore. Javljaju se u oko 12% karcinoma dojke i imaju lošu prognozu, ali se pojavom monoklonske ciljane terapije prognoza bolesnica s ovim podtipom karcinoma poboljšala. Ovi karcinomi često imaju mutacije u TP53 genu (95). Istraživanje de Ronde i sur. (98) na osnovi molekularne analize izraženosti gena u HER2 pozitivnoj intrinzičkoj skupini utvrdili su da dio HER2+ karcinoma ne pripada pravoj molekularnoj HER2 skupini već izražavaju luminalne biljege, dok su Prat i sur. (99) utvrdili postojanje basal-like biljega u 14% karcinoma HER2+ intrinzičke skupine (Slika 15).



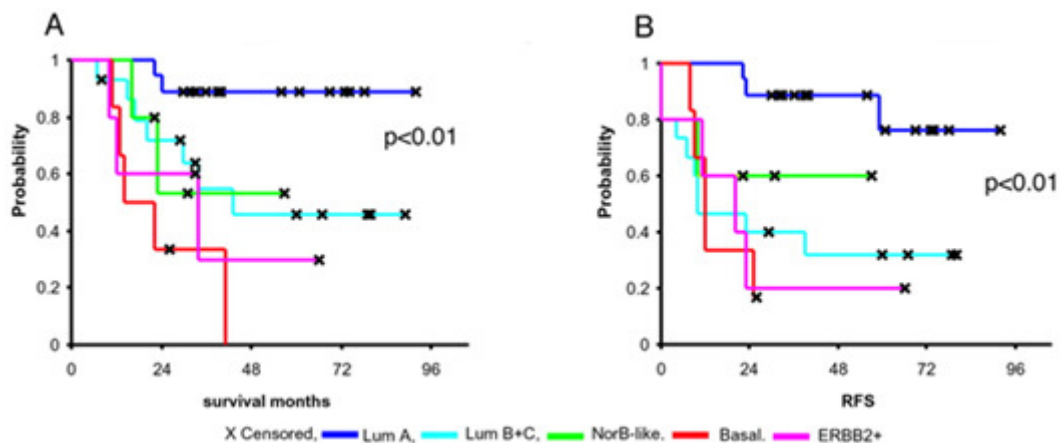
Slika 15. Slikovni prikaz pozicioniranja intrinzičkog tipa HER2 na osnovi molekularne izraženosti pojedinih gena (Preuzeto iz: Dai i sur. Am J Cancer Res 2015;5(10):2929-43)

Basal-like tip karcinoma je trostruko negativni karcinom dojke (eng. *triple negative breast cancer*, TNBC) jer ne izražavaju molekularne biljege ER/PR ni HER2. Dio tih tumora izražava bazalne mioepitelne citokeratine (CK5/6, CK14, CK17), laminine, p-kadherin, fascin, kaveoline 1 i 2 i receptore za faktore rasta 1 (EGFR) pa su često nazivani bazalni karcinomima iako to nije ispravno (99). Vrlo često imaju i mutacije tumor proteina p53, a i većina karcinoma s BRCA1 mutacijom pripada ovoj podskupini. Trostruko negativni

karcinomi dojke čine oko 15% ukupnih karcinoma dojke s većom incidencijom u žena mlađe populacije afričkog porijekla (100). Pravi *Basal-like* karcinomi čine oko 80% TNBC i mogu se dokazati samo molekularnim profiliranjem (101). TNBC pokazuju najveću agresivnost, ali u odnosu na ostale podtipove i veću osjetljivost na kemoterapiju na bazi platine (cisplatina, karboplatina, oksalplatina), DNA interkalirajućih agensa (doksorubicin), agensa koji blokiraju diobu (paklitaksel-blokira tubulin, PARP inhibitori-blokiraju enzim popravka poli-ADP riboza polimerazu) (102).

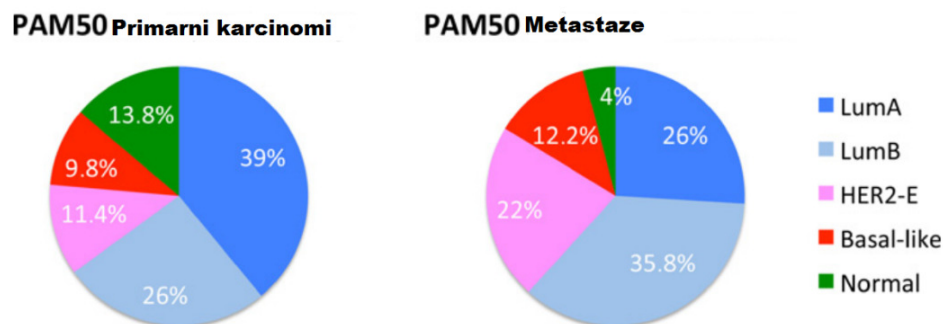
Tablica 3. Kriteriji subklasifikacije karcinoma dojke u intrinzičke skupine definirane prema molekularnim prognostičkim biljezima (St. Gallen 2013.)

LUMINAL A	ER pozitivan PR pozitivan ($\geq 20\%$) Ki-67 $\leq 20\%$ HER2 negativan
LUMINAL B / HER2 negativan	ER pozitivan PR $< 20\%$ ili negativan Ki-67 $> 20\%$ HER2 negativan
LUMINAL B / HER2 pozitivan	ER pozitivan PR bilo koji Ki-67 bilo koji % HER2 pozitivan
BASAL-LIKE	ER negativan PR negativan Ki-67 bilo koji % HER2 negativan
HER2 tip (neluminalni)	ER negativan PR negativan Ki-67 bilo koji % HER2 pozitivan



Slika 16. Krivulje ukupnog preživljenja bolesnica (A) i perioda bez povrata bolesti (B) u pet intrinzički podtipova karcinoma dojke (Preuzeto iz: Sørli i sur. PNAS 2001;98:10869-74)

Također je važno napomenuti da zbog intratumorske heterogenosti karcinoma dojke, a posebno nakon terapije, može doći do razvoja drugog molekularnog podtipa karcinoma. Promjena u izraženosti pojedinih molekularnih biljega (ER/PR i HER2) u recidivu ili metastatskoj bolesti događa se u 25-35% slučajeva (Slika 17) (103).



Slika 17. Učestalost intrinzičkih skupina karcinoma dojke u populaciji primarnih i metastatskih karcinoma (Preuzeto iz: Cejalvo i sur. Cancer Res. 2017;77(9);2213–21)

1.4.5. Terapija karcinoma dojke

Standardni terapijski modaliteti u liječenju karcinoma dojke uključuju kirurško liječenje, zračenje, kemoterapiju, endokrinu terapiju te usmjerenu (ciljanu) terapiju. Izbor terapije ovisi o brojnim prognostičkim i prediktivnim čimbenicima, opće stanje i dob bolesnice (104). Iako je metastatski karcinom dojke neizlječiva bolest, cilj liječenja je postići ravnotežu između koristi terapije i toksičnosti terapije sa svrhom povećanja preživljenja i održanja kvalitete života.

Kirurško liječenje najčešće predstavlja prvi korak liječenja pri čemu se uklanja tumor. Kirurški zahvat izvodi se na nekoliko načina ovisno o lokalizaciji, veličini i proširenosti tumora te o odnosu veličine tumora i veličine dojke. Operativnim zahvatom se uklanja cijela dojka (radikalna mastektomija) ili samo dio dojke (segmentektomija) te uklanjanje pazušnih limfnih čvorova (limfadenktomija) (105). U slučaju metastatski uznapredovalog karcinoma, operativni zahvat slijedi nakon neoadjuvantne kemoterapije koja se provodi u svrhu smanjivanja stadija bolesti.

Terapija zračenjem ili radioterapija podrazumijeva izlaganje tkiva ciljanom zračenju sa svrhom reduciranja ostatnih tumorskih stanica nakon kirurškog tretmana, čime se smanjuje rizik od povrata bolesti (96). Terapijsko zračenje najjače djeluje na stanice u proliferaciji, a to su uglavnom stanice raka. Efekt zračenja se postiže i tjednima nakon zračenja jer djeluje direktnim ioniziranjem atoma u stanici, ali i stvaranjem reaktivnih slobodnih radikala čime dolazi do naknadnih oštećenja DNA, proteina i lipida uzrokujući staničnu smrt ili gubitak njezine sposobnosti dijeljenja. Terapijsko zračenje djeluje i na zdrave stanice pa se polje zračenja dobro definira i označi, čime ima lokalni učinak. Takav neselektivni pristup tumorskim i zdravim stanicama može uzrokovati oštećenja zdravog tkiva ili pojačati rizik nastanka novih tumora ili povećati agresivnost postojećeg (106).

Kod bolesnica s hormonski ovisnim rakom dojke terapija uključuje nekoliko modaliteta. Tip terapije ovisi o dobi bolesnice odnosno o menopauzalnom statusu. Hormonska ili endokrina terapija može biti ablativnog i aditivnog tipa. Ablativna endokrina terapija podrazumijeva uklanjanje glavnih endogenih izvora estrogena kao što su jajnici i najčešće se preporuča ženama u premenopauzi. Aditivna terapija se odnosi na blokiranje učinka estrogena lijekovima kao što su: inhibitori aromataza, koji blokiraju enzim aromatazu ključan u sintezi estrogena (anastrozol, letrozol, eksemestan); selektivni modulatori estrogenskih receptora (analozi estrogena) koji blokiraju hormonske receptore (tamoksifen) i regulatori uništavanja receptora estrogena (fulvestrat) (69). Bolesnice koje imaju

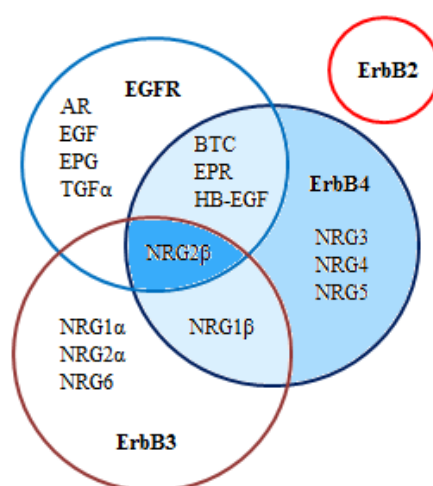
hormonski neovisni rak dojke primaju citotoksične lijekove (kemoterapija) koji djeluju na stanice u proliferaciji. Svaki lijek djeluje na drugu fazu ciklusa ili druge ciljne molekule u stanici. Stoga se često koristi kombinacija više kemoterapijskih lijekova. Obzirom da je to sistemska terapija ona ima negativan učinak i na zdrave stanice u diobi.

Danas je liječenje karcinoma dojke usmjereno prema ciljanom liječenju koje pokazuje selektivnost prema tumorskim stanicama čime se smanjuje negativno djelovanje na zdrave stanice. U tom slučaju govorimo o biološkoj terapiji koju čini primjena specifičnih protutijela i malih molekula. Tumorske stanice na svojoj površini izražavaju specifične biljege na koje se može ciljano djelovati monoklonskim protutijelima. Terapija monoklonskim protutijelima uglavnom blokira receptore za faktore rasta i aktivira imunološki sustav te na taj način blokira rast tumorske stanice. Terapija malim molekulama omogućava ulaz tih lijekova u tumorsku stanicu gdje ometaju unutarstanične signalne puteve koje tumorsku stanicu potiču na rast i širenje na udaljena mjesta u tijelu (metastaziranje). Prva monoklonska terapija korištena je 1998. godine, u liječenju bolesnica s HER2 pozitivnim rakom dojke, primjenom anti-HER2 monoklonskog protutijela trastuzumaba (92).

1.5. Obitelj receptora HER/ErbB

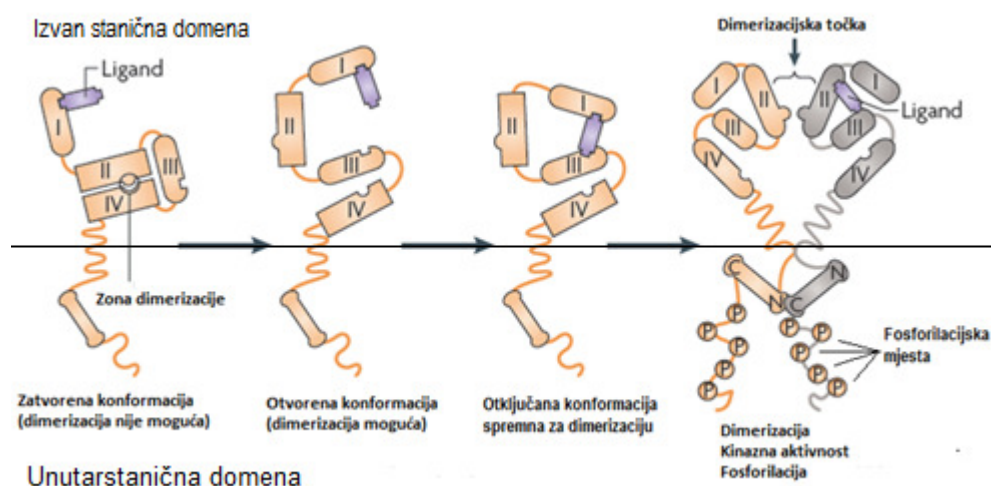
1.5.1. Građa i funkcija receptora HER

Obitelj receptora za epidermalni faktor rasta (eng. *human epidermal growth factor receptor*, *HER/ErbB*) jedna je od najistraživanijih obitelji receptorskih tirozin-kinaza i uključuje četiri receptora: HER1/ErbB1/EGFR, HER2/ErbB2/Neu, HER3/ErbB3 i HER4/ErbB4. Sva četiri receptora imaju strukturno homolognu građu. Svaka jedinica, monomer, građena je od izvanstanične domene na koju se veže ligand (faktor rasta), zatim transmembransku domenu i unutarstanične domene koja ima aktivnost tirozin-kinaze. Na izvanstaničnoj domeni identificirane su četiri subdomene: I i III s funkcijom vezanja liganda te cisteinske II i IV s funkcijom dimerizacije receptora (107). Vezanjem liganda dolazi do dimerizacije receptora koja je uvjet za daljnju aktivaciju kinazne aktivnosti. Ligandi tih receptora su mnogobrojni faktori rasta koji imaju evolucijski očuvanu EGF-nalik domenu odgovornu za specifičnost kojom se vežu na receptore. Postoji više od 140 različitih proteina koji imaju EGF-nalik domenu. Postoji više faktora rasta koji se vežu na receptor HER1, HER3 i HER4, a nijedan poznati koji se veže na HER2, ali receptor HER2 služi kao najčešći dimerizacijski partner (Slika 18). Ligandi koji se vežu na HER1 su epidermalni faktor rasta (EGF), epiregulin (EPG), amfiregulin (AR) i transformirajući faktor rasta α (TGF α). Druga skupina obuhvaća betacelulin (BTC), heparin vežući EGF (HB-EGF) i epiregulin (EPR) koji se vežu na HER1 i HER4, dok u treću skupinu spadaju heregulini/neuregulini (HRG/NRG) koji se vežu na HER3 i HER4 (107-110).



Slika 18. Najčešći ligandi za pojedine receptore HER obitelji

Od četiri navedena receptora samo su HER1 i HER4 potpuno funkcionalni, samostalno vežu ligand i posjeduju kinaznu aktivnost. Receptor HER2 nema postojećeg (poznatog) liganda, dok receptor HER3 nema dovoljno jaku tirozin-kinaznu aktivnost pa ta dva receptora djeluju samo u kompleksu s ostalim članovima obitelji (111). U fiziološkim uvjetima HER2/HER2 i HER3/HER3 homodimeri su nefunkcionalni.



Slika 19. Strukturna građa i konformacijska promjena receptora HER prilikom vezanja liganda i dimerizacije. Zatvorena konformacija (lijevo) tek vezanjem liganda prelazi u „otključanu“ koja može dimerizirati. HER2 receptor se jedini nalazi u otvorenoj konformaciji uvijek spreman za dimerizaciju (Preuzeto i prilagođeno iz: Baselga i Swain, Nat Rev Cancer. 2009;9:463-75)

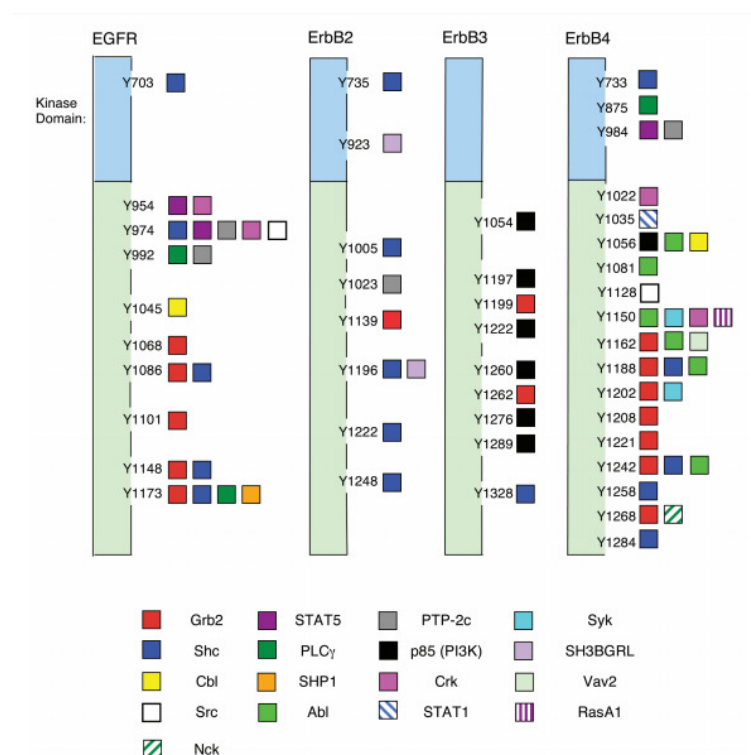
1.5.2. Signalni putevi aktivirani receptorima HER

Učinak aktivacije obitelji HER je raznolik, zbog karakteristične interakcije receptora i liganda, jer se jedan ligand može vezati na više receptora, a i jedan receptor veže više različitih liganada (112, 113). Na taj način postoji preko 600 različitih kombinacija ligand-receptor koji aktiviraju signalne puteve u raznim tkivima potičući proliferaciju, migraciju, angiogenezu, inhibiciju apoptoze i druge procese (Slika 20).

Aktivacijski put započinje vezanjem liganda za izvanstaničnu domenu receptora HER (Slika 19). Vezanje liganda na receptor mijenja konformaciju monomera te ga čini

prikladnim za dimerizaciju (114). Ovisno o tipu podjedinica, receptorski kompleksi mogu biti homodimerni (dvije iste podjedinice) ili heterodimerni (dvije različite podjedinice). Promjenom konformacije zbog dimerizacije aktivira se citoplazmatska kinazna domena te se susjedni monomeri transfosforiliraju (Slika 19).

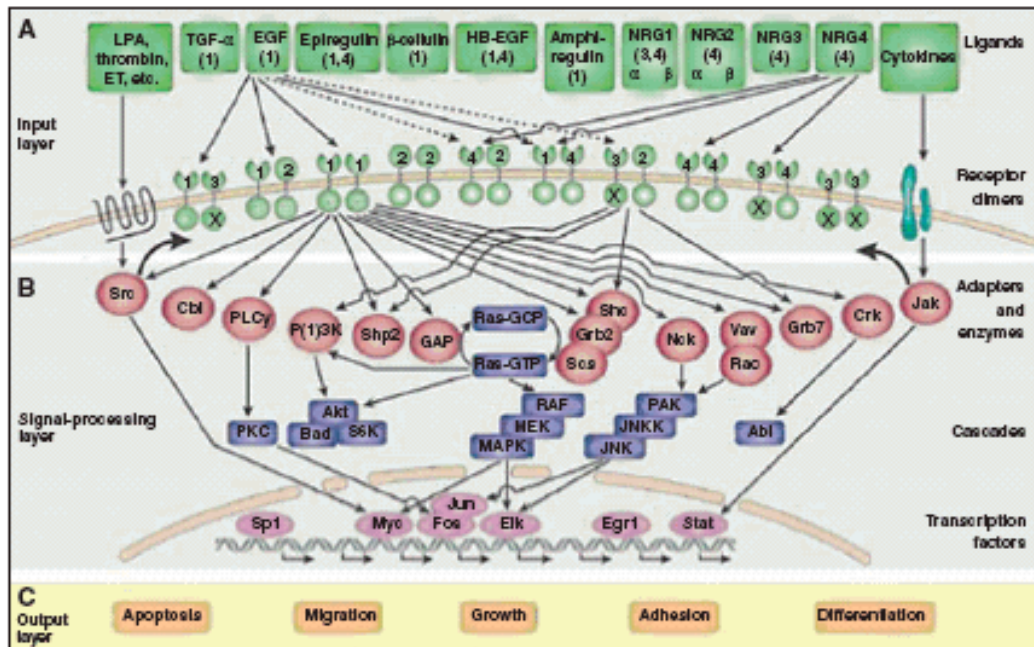
Fosforilirani tirozinski ostaci postaju vezna mjesta za proteine koji imaju -SH2 (engl. *Src homology 2*) ili -PTB (engl. *phosphotyrosine-binding*) domene. Na taj način se „signal“ prenosi duž signalnog puta do krajnjeg proteina (Slika 20) (115).



Slika 20. Shematski prikaz građe HER receptora s aktivirajućim mjestima fosforilacije za pripadajuće partnere različitih signalnih puteva (Preuzeto iz: Wilson i sur. *Pharmacol Ther.* 2009;122(1):1-8)

Svaki vezani ligand uzrokuje stvaranje drugog dimerizacijskog para te posljedično aktivaciju drugog signalnog puta (Slika 21) (114). Najčešće aktiviran signalni put svih receptora HER je MAPK signalni put (engl. *mitogen-activated protein kinase*). Druga dva zastupljena puta su PI3K (engl. *phosphatidylinositol-3-kinase*) aktiviran Akt put i p70S6K/p85S6K put (Slika 21). Ti putevi mogu biti aktivirani na više načina. Receptori HER1 i HER2 aktiviraju PI3K signalni put preko proteina posrednika, dok se receptori HER3 i HER4 izravno vežu na PI3K (74, 116). Kaskadna reakcija svih signalizacijskih

puteva na poslijetku završava u jezgri poticanjem transkripcije gena za određene stanične odgovore od stanične proliferacije, migracije, adhezije do diferencijacije ili apoptoze (Slika 21) (117).



Slika 21. Shematski prikaz signalnih puteva aktiviranih dimerizacijom receptora HER (Preuzeto iz: Yarden i Sliwkowski. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2:127-137)

Homodimerne kombinacije receptora HER uglavnom pokazuju slabiji mitogeni učinak od heterodimernih (116-119). Čini se da heterodimer HER2/HER3 pokazuje najpotentniju proliferacijsku aktivnost, dok s druge strane učinak aktivacije HER4 ovisi o ligandu, dajući mu time protumorski ili antitumorski učinak (118-121).

Na staničnoj membrani postoji stalna dinamika receptora HER. Veza liganda i receptora je tako jaka da se ligand ne može otpustiti s receptora već se procesom endocitoze receptor eliminira s površine stanice. Nakon endocitoze, receptori s membrane odlaze u sortirajuće endosome gdje se ili razgrađuju ili recikliraju i vraćaju na membranu. Taj proces spontane proteolitičke razgradnje omogućava kontinuiranu prisutnost receptora na membrani te služi u kontroli HER signalizacije (123). Opisani dinamički proces HER receptora važan je u mehanizmu djelovanja imunoterapije trastuzumabom.

1.5.3. Utjecaj receptora HER u karcinogenezi

U velikom broju zloćudnih tumora detektiran je poremećaj signalnog puta HER koji uglavnom postaje prekomjerno aktivan zbog prekomjerne proizvodnje liganda, prekomjerne izraženosti samih receptora ili njihove konstitutivne aktivacije (117). Jasno je da će prekomjerna izraženost receptora HER izazvati progresiju kroz staničnu proliferaciju, pojačati neosjetljivost na čimbenike rasta, transformaciju, preživljavanje, angiogenezu, migraciju i invazivnost stanica. Sve su to obilježja zloćudnih tumorskih stanica, engl. *Hallmarks of cancer* (124).

1.5.3.1. HER1/ErbB1/EGFR

Gen za HER1 receptor smješten je na kromosomu 7p11.2 i prvi je receptor iz obitelji receptora HER koji je povezan s kancerogenim učinkom. Vezanjem liganda na receptor HER1 uglavnom dolazi do autofosforilacije koje uzrokuju aktivacije GRB 2 (eng. *growth factor receptor bound protein 2*) ili SHC (eng. *src-homology 2 containing*) što aktivira RAS-MAPK, a ne može direktno aktivirati PI3K-Akt signalni put (125).

Prekomjerna izraženost HER1 česta je u tumorima mozga gdje je prvi puta i uočen njegov kancerogeni doprinos kod glioma. Prekomjerno je izražen i strukturno promijenjen u velikom broju solidnih tumora od čega 33-50% tumora epitelnog porijekla, među kojima je karcinom pluća (pogotovo karcinom pluća ne-malih stanica u čak 80% slučajeva), karcinom debelog crijeva i karcinom dojke (126). Kancerogeni učinak receptora HER1 može biti posljedica amplifikacije gena ili mutacijskih događaja koji stvaraju promijenjene varijante receptora s neispravnom funkcijom. Tako u varijanti EGFRvIII s delecijom 2-7EGFR/ Δ EGFR nastaje krnji oblik HER1 receptora koji je konstitutivno aktivan. Ta je varijanta mutiranog receptora HER1 pronađena u mnogobrojnim zloćudnim novotvorinama, ali ne u zdravom tkivu. Unutarstanična domena ima devet mjesta fosforilacije (Slika 20) (125, 126).

Prema literaturi, oko 16-45% karcinoma dojke prekomjerno izražava HER1, dok meta-analiza Gonzales-Conchas i sur. utvđuje srednju izraženost od 27% (127-130). Kao prognostički pokazatelj u karcinomu dojke, HER1 je pokazao umjerenu značajnost povezanu s lošijom prognozom u vidu kraćeg preživljenja i veće vjerojatnosti povrata

bolesti (131). Istraživanja su utvrdila i povezanost s većim tumorom, višim gradusom i proliferacijom te većim brojem pozitivnim limfnih čvorova (129). Izraženost HER1 ne smatramo nezavisnim prognostičkim pokazateljem kod karcinoma dojke.

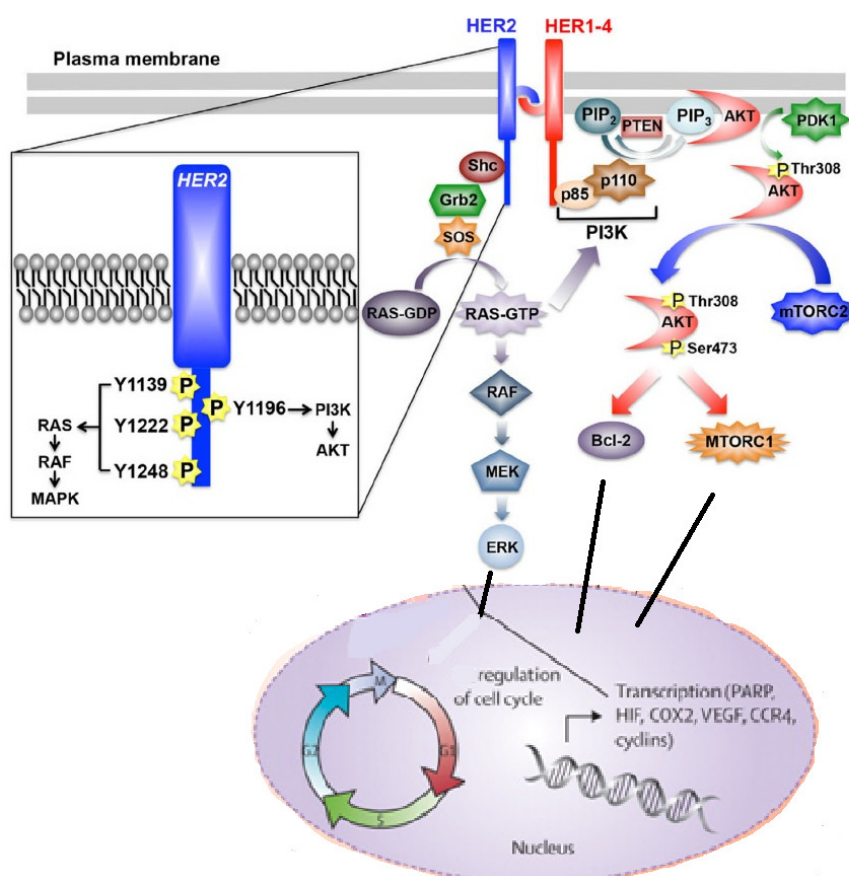
1.5.3.2. *HER2/ErbB2/Neu*

Gen za receptor HER2 je protoonkogen smješten na kromosomu 17q12 i kodira 185kDa velik protein (107, 132). Najveći onkogeni potencijal HER2 receptora leži u činjenici da nema poznati aktivirajući ligand, a ima konformaciju otvorenog tipa (Slika 19). Unutarstanična domena ima 19 poznatih mjesta fosforilacije od kojih je za aktivaciju ključna fosforilacija tirozina na položaju 1248 (Slika 22), a ujedno je to i mjesto autofosforilacije u slučaju prekomjerne izraženosti receptora (133). Najčešći dimerizacijski partner mu je receptor HER3, a HER2/HER3 heterodimer ima najjači onkogeni potencijal. Ukoliko nema prekomjerne izraženosti HER2 stvarati će se manje stabilni heterodimeri i homodimeri ostalih receptora (134, 135). U slučaju prekomjerne izraženosti HER2 može stvarati konstitutivno aktivne homodimere koji djeluju karcinogeno (136).

Prekomjerna izraženost HER2 receptora i/ili amplifikacija gena utvrđena je u mnogim tumorima. Klinički je najvažnija njegova izraženost u karcinomima dojke s udjelom 10-34%, od čega se češće pojavljuje u duktalnim invazivnim i *in situ* karcinomima gradusa III, nego u lobularnim invazivnim karcinoma (81, 137).

Povezanost prekomjerne izraženosti HER2 u karcinomima dojke s prognozom bolesnica je vrlo istraživano područje, ali rezultati još uvijek nisu potpuno uniformni. Već je spomenuto da se način očitavanja imunohistokemijske i hibridizacijske reakcije mijenjao nekoliko puta tijekom posljednjih deset godina. Većina istraživanja dokazala su povezanost prekomjerne izraženosti HER2 s visokim histološkim gradusom, gubitkom izraženosti hormonskih receptora, aneuploidijom, povećanom mitotičkom aktivnošću, većim brojem zahvaćenih limfnih čvorova i udaljenim metastazama u bolesnica koje nisu primile terapiju (130). Karcinomi dojke s amplifikacijom gena HER2 pokazuju i veću gensku nestabilnost (81). HER2 pozitivni karcinomi češće se pojavljuju u premenopauznih žena, često bez istovremene izraženosti steroidnih receptora (ER–, PR–), pokazuju slabiju diferenciranost i brži rast te su povezani s lošijom kliničkom slikom i kraćim preživljenjem (49).

Unatoč svom prognostičkom značaju, važniji je prediktivni značaj HER2 u svrhu odabira terapije (86, 87, 92, 130). Sve bolesnice s prekomjerno izraženim HER2 karcinomima primaju anti-HER2 terapiju trastuzumabom ili nekim drugim HER2 inhibitorom. Iako karcinomi s izraženim HER2 pokazuju dobar odgovor na antracikline, u kombinaciji s trastuzumabom pojačava se kardiotoksični učinak (86, 87). Kod HER2 pozitivnih karcinoma s izraženim steroidnim receptorima primjenjuje se kombinirana terapija jer su signalni putevi receptora HER2 i ER u interakciji (79). Izraženost HER2 se tijekom kemoterapije može promijeniti, najčešće je to gubitak izraženosti ili rezistencija na terapiju trastuzumabom iako su potvrđeni i slučajevi suprotnog (139, 140).



Slika 22. Shematski prikaz aktivacije različitih signalnih puteva kao posljedice dimerizacije i fosforilacije HER2 na različitim fosforilacijskim mjestima (Preuzeto i modificirano iz: Gollamudi i sur. Cancer Manag Res. 2016;8:21-31)

1.5.3.3. *HER3/ErbB3*

Receptor HER3 je kodiran genom na kromosomu 12q13. Kao i HER2 ključan je u embrionalnom razvoju srca i živaca (142). Njegovi ligandi su heregulin/neuregulin 1β i 2β. Jedini je član obitelji receptora HER koji ne posjeduje tirozin-kinaznu aktivnost zbog čega ne može pokrenuti signalni put homodimerizacijom. Novija literatura je ipak dokazala da ima slabu kinaznu aktivnost jer može vezati ATP (143). Njegova prekomjerna izraženost ne dovodi samostalno do transformacije nego su mu za to potrebni dimerizacijski partneri. Prekomjerna izraženost receptora HER3 je regulirana na transkripcijskoj razini dok je amplifikacija gena rijetka (144). Receptor HER3 je najpotentniji aktivator PI3K/Akt puta jer sadrži 6 veznih mjesta koja izravno vežu i aktiviraju PI3K te potiče agresivni tumorski fenotip (Slika 20) (115, 145). Prekomjerno je izražen u mnogim solidnim tumorima, u rasponu od 20% do više od 60% kod kolorektalnih karcinoma (CRC, eng. *colorectal cancer*). Izraženost receptora HER3 uglavnom ima lošiju prognozu kod većine karcinoma, a istraživanja pokazuju da aktivacija receptora HER3 uzrokuje rezistenciju na cetuksimab ili vemurafenib kod CRC ili na kemoterapiju kod karcinoma ovarija (107, 146).

Prognostički značaj prekomjerne izraženosti receptora HER3 u karcinomu dojke još uvijek nije jasan. HER3 je izražen u oko 50% karcinoma dojke i preferencijalni je partner za dimerizaciju, a u embrionalnom razvoju je ključan za razvoj mliječnih žlijezda (109). Mutacije HER3 gena česte su kod lobularnih karcinoma (109). Brojne studije za sada imaju suprotstavljene rezultate u procjeni utjecaja na preživljenje bolesnika. Većina literature ukazuje na njegov negativan utjecaj na ishod bolesti. Najučestalija je prekomjerna izraženost receptora HER3, njegovih liganda ili nekih drugih tirozin-kinaza poput *c-met* (74, 146). Kod karcinoma dojke prekomjerna izraženost HER3 upućuje na lošiju prognozu posebno kod HER2 pozitivnih i ER negativnih karcinoma (146).

1.5.3.4. *HER4/ErbB4*

Gen za receptor HER4 se nalazi na kromosomu 2q34. Funkcionalni receptor ima kompleksan i specifičan mehanizam aktivacije. Receptor HER4 se pojavljuje u dva para izoformi, nastalih alternativnim prekrajanjem HER4 mRNA, koje se razlikuju po

membranskoj (JM, engl. *juxtamembrane*) i citoplazmatskoj (CYT) domeni (148). Citoplazmatska izoforma 1 (CYT-1) ima vezno mjesto za PI3K-Akt pa aktivacijom tog signalnog puta stanica može izbjeći apoptozu, inducirati proliferaciju i smanjiti diferencijaciju, za razliku od CYT-2 izoforme koja aktivira GRB2 i SHC (119, 149, 150). Smatra se da polimorfizam u jednom nukleotidu CYT-1 gena, zbog kojeg dolazi do nemogućnosti aktivacije HER4 preko neuregulina 1, utječe na razvoj shizofrenije (151).

Točan mehanizam djelovanja i značaj kod karcinoma još uvijek je nejasan i dvojak. Aktivacijom receptora dolazi do proteolitičke razgradnje receptora i otpuštanja 4ICD fragmenta u citoplazmu (engl. *HER4 intercellular domain*) koji je odgovoran za djelovanje receptora (148). Najviše su istraživani učinci 4ICD domene koji su se pokazali ovisni o njenoj lokalizaciji na mitohondrijima ili u jezgri (150). Domena 4ICD u mitohondrijima može djelovati proapoptotički dok smještena u jezgri potiče rast i proliferaciju, ko-aktivacijom preko ER (152, 153). Prekomjerno je izražen u manje od 20% dok su mutacije HER4 zabilježene u 3% CRC-a s lošijom prognozom a visoka izraženost, oko 90%, HER4 zabilježena je kod seroznih adenokarcinoma ovarija. Anti-HER4 terapija nakon kemoterapije, kod karcinoma pločastih stanica glave i vrata, smanjuje povrat bolesti (108).

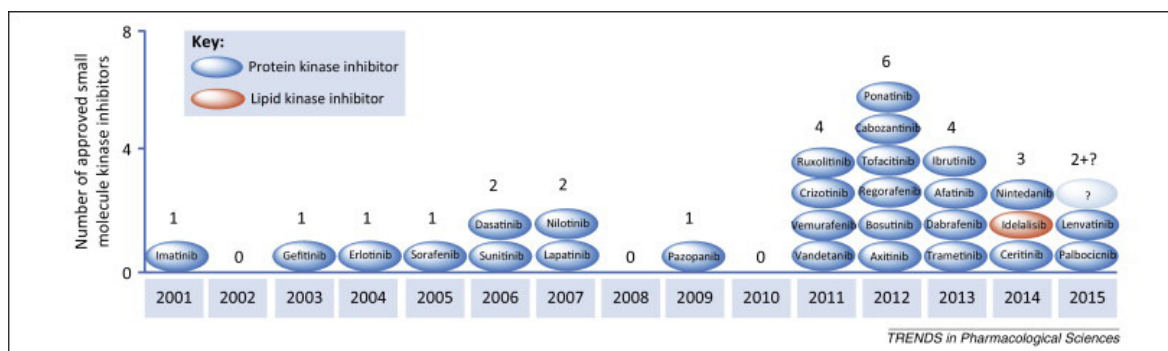
Receptor HER4 je neophodan u razvoju mliječne žlijezde i laktaciji. Za razliku od ostalih receptora HER, prekomjerna izraženost HER4 u karcinomima dojke povezana je s bolje diferenciranim tumorima nižeg histološkog gradusa, izraženošću hormonskih receptora i većom stopom preživljenja (154-157). Iako je HER2/HER4 drugi najpotentniji heterodimer, smatra se da HER4 antagonizira učinak HER2 te je u zloćudnim novotvorinama čak manje izražen nego u dobroćudnim (158). Sartor i sur. su zaključili da HER4 ima antiproliferativni učinak, ali isključivo u odsutnosti receptora HER2 (159).

4ICD domena posrednik je djelovanju tamoksifena. Tamoksifen narušava interakciju 4ICD s ER α pa se 4ICD akumulira u mitohondriju i inducira apoptozu (160). Zbog tog mehanizma postoji mogućnost da je gubitak izraženosti HER4 odgovoran za razvoj rezistencije na taj lijek (152).

Heterogenost rezultata o prognostičkom značaju HER4 može nastati zbog korištenja različitih metoda detekcije na razini mRNA i/ili upotrebom različitih klonova protutijela za receptor te detekcije lokalizacije 4ICD fragmenta (117, 150).

1.6. Terapija usmjerena na receptore HER

Terapije koje za ciljnu molekulu imaju obitelj receptora HER ili njihove signalne puteve možemo podijeliti na nekoliko osnovnih skupina: monoklonska protutijela, inhibitori dimerizacije kao analozi faktora rasta, male molekule kao inhibitori aktivnosti tirozin-kinaze i njihovih signalnih puteva, inhibitori šaperona (74). Dok monoklonska protutijela specifično blokiraju pojedini receptor iz HER obitelji jer se vežu na njegovu izvanstaničnu domenu, male molekule mogu ući u stanicu te inhibiraju protein kinaze i sprječavaju fosforilaciju citoplazmatskog dijela receptora. Na taj način male molekule direktno inhibiraju aktivaciju signalnog puta te imaju višestruki učinak. Prvo ciljano liječenje započelo je u terapiji karcinoma dojke s trastuzumabom (Herceptin®), humaniziranim monoklonskim protutijelom usmjerenim na receptor HER2. Od tada je u posljednjih 20 godina razvijeno oko 70 novih monoklonskih protutijela u terapijama raznih bolesti od kojih se četiri koriste u terapiji karcinoma dojke te oko 30 inhibitora kinaze (161). Osim kod karcinoma dojke, terapija inhibitorima HER receptora koristi se kod terapije medularnog karcinoma štitnjače, karcinoma pluća nemalih stanica, karcinoma želuca, karcinoma debelog crijeva, karcinoma prostate te karcinoma pločastih stanica glave i vrata.



Slika 23. FDA odobreni inhibitori kinaze u liječenju malignih bolesti (Preuzeto iz: Wu i sur. Trends Pharmacol Sci. 2015;36(7):422-39)

Panitumumab (Vectibix) i cetuximab (Erbix) su monoklonska protutijela usmjerena protiv HER1 receptora koji se koriste u terapiji karcinoma debelog crijeva u slučaju ne

postojanja mutacije (*wild type*) u KRAS i NRAS genima. Osimertinib (Tagrisso) se koristi kod karcinoma pluća u slučaju mutacije EGFR gena (mutacija p. T790M). Erlotinib (Tarceva® Roche), gefitinib (Iressa) i afatinib (Gilotrif) su inhibitori tirozin kinaze a koriste se u terapiji karcinoma pluća nemalih stanica u slučaju mutacija EGFR gena (delecija eksona 19 ili supstitucije eksona 21). Dacomitinib je inhibitor tirozin kinaze koji djeluje na HER1, HER2 i HER4 homodimere ili heterodimere s jačom inhibicijom nego gefitinib/erlotinib (161). Obzirom na njihov učinak i na blokadu HER2 postoji mogućnost njihove primjene kod metastatskih karcinoma dojke.

Trenutno je u kliničkim ispitivanjima desetak potencijalnih lijekova usmjerenih na HER3 receptor ili njegov signalni put koji će omogućiti kombiniranu ciljanu terapiju i smanjiti pojavu rezistencije na lijekove. Neki od tih lijekova su monoklonska protutijela seribantumab (Sanofi/Merrimack Pharmaceuticals) i patritumab (klinička faza II) koji djeluje i kao imunomodulator koji pojačava osjetljivost stanica karcinoma na zračenje (radiosenzitivnost) (161).

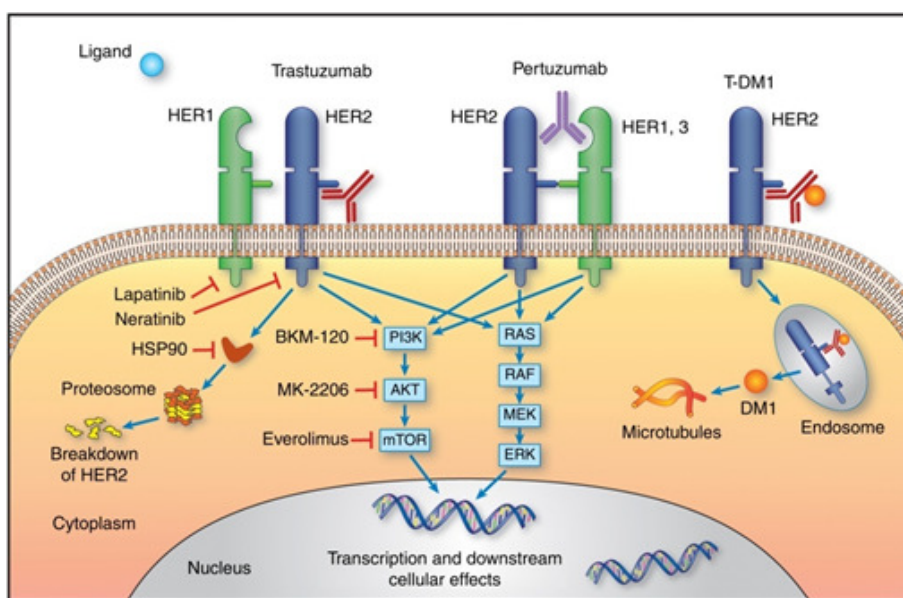
Terapija usmjerena protiv receptora HER2 najviše se koristi kod karcinoma dojke te u novije vrijeme kod karcinoma želuca. U oba tipa karcinoma potrebno je dokazati prekomjernu izraženost HER2 receptora u tumorskim stanicama. Za sada su u primjeni tri monoklonska protutijela, trastuzumab (Herceptin®), ado-trastuzumab-emtasin (Kadcyla®) i pertuzumab (Perjeta®) te male molekule, inhibitori tirozin kinaze, lapatinib (Tykerb®) i neratinib (Nerlynx®).

Bolesnice s HER2 pozitivnim karcinomima dojke primaju terapiju trastuzumabom uz hormonsku ili kemoterapiju u trajanju od 1 godine (17 ciklusa), ali na žalost statistika govori da se rezistencija na tu terapiju razvija već 5-9 mjeseci od početka primjene (162). Trastuzumab se veže na izvanstaničnu regiju IV receptora HER2 te uglavnom sprječava homodimerizaciju. Djelovanje trastuzumaba poboljšano je njegovom konjugacijom s citotoksičnim agensom u ado-trastuzumab-emtasin. Trastuzumab-DM1 (T-DM1) je molekula trastuzumaba konjugirana s inhibitorom polimerizacije mikrotubula, emtasinom (DM1) dok je sam emtasin izuzetno citotoksičan. Trastuzumab se veže na receptor HER2, a potom se kompleks internalizira i unese unutar stanice gdje se oslobađa citotoksična tvar. Uz taj citotoksični učinak, djelovanje tog lijeka pojačava i standardni mehanizam djelovanja samog trastuzumaba (163).

Pertuzumab je također monoklonsko protutijelo koje se veže na izvanstaničnu regiju II receptora HER2 koja je odgovorna za heterodimerizaciju, najčešće s receptorom HER3. Primjenjuje se u kombinaciji s trastuzumabom i kemoterapijom citotoksičnim

docetakselom kod metastatskih karcinoma dojke, ali i za neoadjuvantno liječenje bolesnika s HER2 pozitivnim, lokalno uznapredovalim, upalnim rakom ili rakom dojke u ranom stadiju s velikim rizikom od recidiva.

Kod karcinoma dojke odobren je lapatinib (Tykerb®) kao terapija usmjerena na receptor HER1. Lapatinib je inhibitor tirozin-kinazne (veže se na ATP mjesto kinaze) usmjeren na aktivnost heterodimera HER1/HER2. Danas se koristi za tretiranje metastatskih karcinoma dojke pozitivnih na hormonske receptore koji uz to pokazuju i prekomjernu izraženost receptora HER2 te terapiju metastatskih HER2 pozitivnih karcinoma rezistentnih na trastuzumab, antracikline i taksane. Lapatinib je inhibitor protein-kinaze HER1/HER2 heterodimera i veže se na ATP vezno mjesto heterodimera čime sprječava autofosforilaciju dok neratinib reducira HER2 autofosforilaciju i inhibira ciklin D1, a time i proliferaciju. Na žalost, učinak lapatiniba je reverzibilan zbog slabih kovalentnih veza te se prema novijim istraživanjima čini da afatinib i neratinib imaju jači učinak (164). Nakashoji i sur. (165) su meta-analizom dokazali da kemoterapija+trastuzumab+pertuzumab ima najbolji učinak na patološki kompletni odgovor u neoadjuvantnoj terapiji bolesnica s HER2 pozitivnim karcinomima.

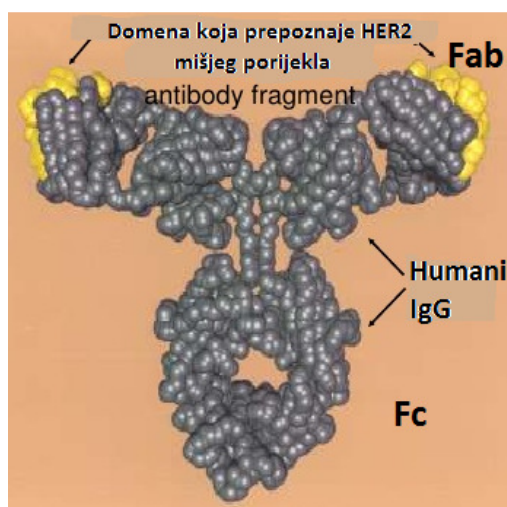


Slika 24. Terapijske opcije usmjerene protiv receptora HER obitelji kod karcinoma dojke (Preuzeto iz: Singh i sur. Br J Cancer. 2014;111,1888-98)

1.6.1. Trastuzumab (Herceptin®)

HER2 pozitivni karcinomi dojke, najčešće duktalni invazivni, javljaju se u manje od 25% bolesnica. Bez adekvatne terapije, takav tip karcinoma pripadao je prognostički najlošijem karcinomu dojke s velikom agresivnošću, bržim rastom i kraćim vremenom preživljenja bolesnica. Ti podaci jasno govore o potrebi razvoja nove i ciljane terapije usmjerene protiv tog receptora (167).

Trastuzumab (Herceptin®, Hoffmann-La Roche, Švicarska) je humanizirano rekombinantno monoklonsko protutijelo usmjereno protiv receptora HER2 (Slika 25). Većina molekule je IgG humanog porijekla (humanizirano) i oko 10% proteina mišjeg porijekla (mišje monoklonsko protutijelo) i to u specifičnoj domeni Fab koja prepoznaje vezno mjesto na HER2 receptoru pa trastuzumab pokazuje slabi imunogeni potencijal za stvaranje vlastitih protutijela na trastuzumab (168).



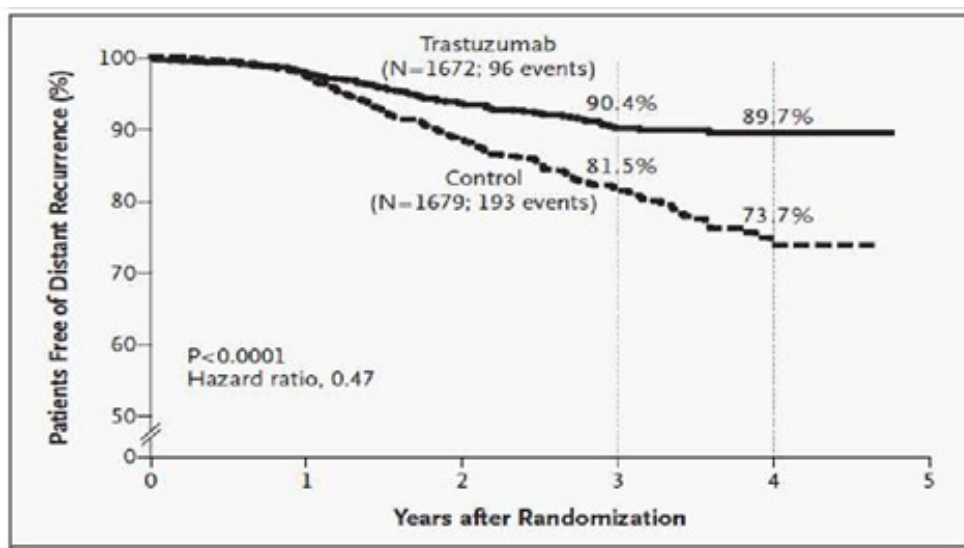
Slika 25. Shematska građa humaniziranog mišjeg monoklonskog protutijela (trastuzumab). Fab, domena mišjeg porijekla koja prepoznaje i veže se na HER2 receptor (žuto), Fc, humani IgG (sivo) (Preuzeto i modificirano iz: Ross i sur. 2009;14:320-368)

Odobren je 1998. godine od FDA (engl. *Food and Drug Administration*) u terapiji metastatskog karcinoma dojke. Danas se primjenjuje uz kemoterapiju i/ili antihormonsku terapiju dok kao samostalna terapija ima slabiji učinak i u monoterapiji se primjenjuje samo kao treća linija nakon najmanje dva ciklusa kemoterapije koja mora uključivati antracikline

i taksane (Europska agencija za lijekove). Od 2008. godine uveden je u prvu liniju liječenja HER2 pozitivnog primarnog karcinoma dojke u kombinaciji s kemoterapijom docetakselom i karboplatinom, a danas se primjenjuje i u kombinaciji s neoadjuvantnom terapijom nakon koje slijedi adjuvantna terapija lijekom Herceptin za lokalno uznapredovalu bolest ili tumore promjera > 2 cm (166-170).

Njegov terapijski učinak povećava ukupno preživljenje bolesnica te smanjuje rizik od recidiva odnosno produžava razdoblje do pojave progresije bolesti (Slika 26). Terapija trastuzumabom povećala je medijan preživljenja bolesnica za 25%, u donosu na kemoterapiju, što je činilo medijan produljenja života više od 9 mjeseci (169).

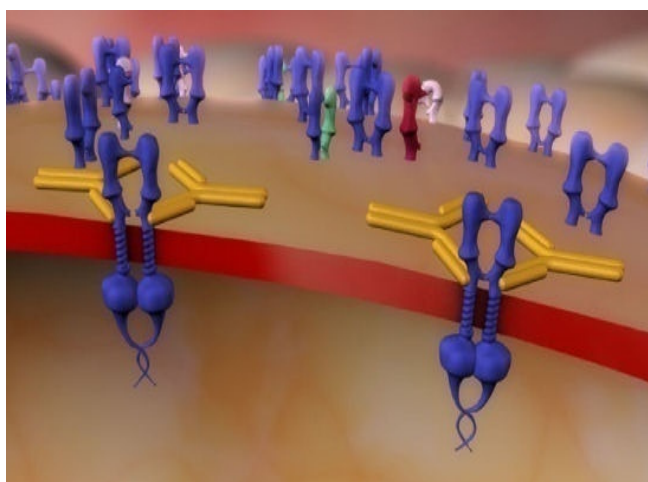
Učinak trastuzumaba kod HER2 pozitivnih karcinoma dojke je neosporan, a kasnije nezavisne studije su pokazale nešto objektivniji učinak trastuzumaba (Slika 26) (167). Prednost trastuzumaba je njegova visoka selektivnost prema tumorskim stanicama s izraženim HER2 receptorom. U korist terapije trastuzumabom govori i činjenica da je većina nuspojava slična ostalim nuspojavama citotoksičnih lijekova (mučnine, povraćanje, simptomi groznice), dok su kardiotoksičnost (u 5-30% slučajeva) i pojava alergijskih reakcija teže nuspojave (89, 90). Trastuzumab se koristi i u terapiji HER2 pozitivnog karcinoma želuca (84).



Slika 26. Kaplan-Meierova krivulja učinka trastuzumaba na period do pojave udaljenih metastaza kod bolesnica koje su primale terapiju u odnosu na kontrolnu skupinu bez terapije trastuzumabom (Preuzeto iz: Piccart-Gebhart i sur. N Engl J Med 2005;353:1659-72)

1.6.1.1. Mehanizmi djelovanja trastuzumaba

Trastuzumab se visokoafinitetnom specifičnošću veže za rubno-membransku domenu IV izvanstaničnog dijela HER2 receptora (engl. *extracellular domain*, ECD) (Slika 27). Njegovim vezanjem za HER2 spriječava se spontano proteolitičko cijepanje ECD domene i njeno otpuštanje što predstavlja aktivacijski mehanizam HER2. Time se inhibira HER2 signalni put fosfatidilinositol 3-kinaze (PI3K) koji je neovisan o ligandu te inducira nekoliko molekularnih mehanizma kojima djeluje na HER2-pozitivne tumorske stanice putem izvanstaničnih i unutarstaničnih učinaka (170).



Slika 27. Shematski prikaz vezanja trastuzumaba (žuto) na izvanstaničnu domenu homodimera receptora HER2 (plavo) (Preuzeto iz: Cho i sur. Nature. 2003;421:756-760)

- I. Blokira vezanje HER2 na druge receptore HER obitelji, posebno stvaranje homodimera. Inhibicija homodimerizacije i redukcija fosforilacije receptora HER2 ima za posljedicu blokiranje signalnih puteva MAPK i PI3K, povećavajući time razinu tumor-supresora p27 i PTEN te uzrokujući zastoje staničnog ciklusa i apoptozu (122)
- II. Aktivira imunoodgovor, staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima (ADCC, eng. *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) koja nastaje kao posljedica imunološke reakcije NK stanica. Vezanjem NK stanica za slobodni Fc fragment trastuzumaba otpuštaju se spojevi koji izazivaju apoptozu tumorskih stanica (Slika 25) (89, 90)

- III. Smanjuje broj receptora HER2 na membrani uzrokujući njegovu internalizaciju i degradaciju. Time se sprječava aktivacija proteina p21 i smanjuje sposobnost popravka DNA tumorske stanice pa se posljedično povećava osjetljivost tumorskih stanica na kemoterapiju i radioterapiju (107)
- IV. Trastuzumab inhibira spontanu proteolizu izvanstanične domene receptora HER2, ali može nastati i oštećeni „krnji“ HER2 receptor (p95), koji ima tirozin kinaznu aktivnost i sposobnost trajne aktivacije s posljedicom proliferacije
- V. Obzirom da receptor HER2 aktivira angiogenezu, vezanjem trastuzumaba dolazi do smanjene signalizacije za vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), a time se smanjuje HER2 angiogenezni učinak i smanjuje gustoća tumorskih krvnih žila

1.6.1.2. Mehanizmi rezistencije na trastuzumab

Rezistenciju na lijekove možemo pratiti kako primarnu ili sekundarnu. Primarna rezistencija je dominantiji oblik rezistencije i podrazumijeva odsutnost pozitivnog odgovora na apliciranu terapiju. Sekundarna rezistencija razvija se nakon primarno pozitivnog odgovora na terapiju, a može nastati i vrlo rano, već nakon nekoliko ciklusa terapije pa sve do godinu-dvije od inicijalne aplikacije.

Unatoč tome što kombinacija trastuzumaba i kemoterapije daje uspješniji terapijski odgovor, više od 30% bolesnica pokazuje rezistenciju i metastatsku progresiju za vrijeme terapije, a u slučaju liječenja metastatske bolesti učinak terapije je još slabiji (86, 172, 173). Stoga je jasno da razumijevanje mehanizama pojave rezistencije pridonosi njenom razumijevanju i pronalasku modela za njeno prevladavanje.

Do sada istraženi mehanizmi rezistencije uključuju:

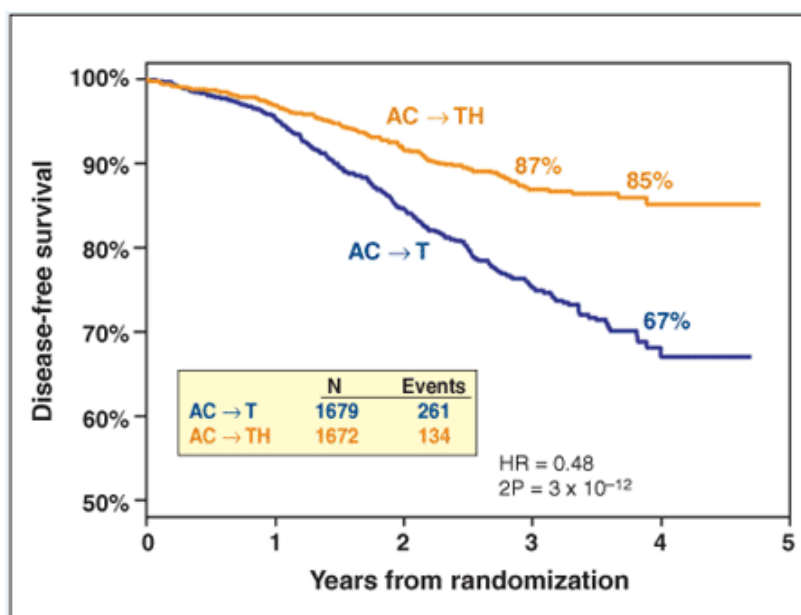
- I. Prostorno zaklanjanje izvanstanične domene receptora HER2 drugim membranskim faktorima (npr. mucin), koji može „maskirati“ epitopnu domenu IV HER2 receptora na koju se veže trastuzumab

- II. Spontano stvaranje oštećenog („krnjeg“) receptora HER2 koji ne posjeduje ekstracelularnu domenu (eng. *loss of ECD*). Takav krnji receptor poznat kao protein p95 (p95 ErbB2) može nastati zbog poremećaja u translaciji ili na posttranslacijskoj razini, ali i nedovoljne degradacije HER2 na koji je vezan trastuzumab. On ima sposobnost autofosforilacije i trajne aktivacije HER2 signalnog puta, a može fosforilirati i ostale receptore HER obitelji.
- III. Moguće mutacije na genu HER2 koje rezultiraju molekularnim promjenama receptora. To mogu biti točkaste mutacije ('missense'), male delecije ili insercijske 'in frame' mutacije na HER2 genu. Takve mutacije mijenjaju strukturu HER2 receptora čime može postati neprepoznatljiv za protutijelo, a ipak ostati funkcionalan i trajno aktivan (174). Takve su mutacije se javljaju u oko 4% bolesnika koje primaju monoklonsku terapiju trastuzumabom (175).
- IV. Nastanak mutacija na nizvodnim genima signalnog puta receptora HER2 i to nekoliko aktivacijskih mutacija protoonkogenima (PI3K, Akt, mTOR) ili inaktivacijskih mutacija tumor supresorskih gena (PTEN, p27) čime se zaobilazi potreba za aktivacijom preko receptora.
- V. Aktivacija preko drugih signalnih puteva (ukrštena komunikacija, eng. *cross-talk*). Iako je HER2 čest dimerizacijski partner, aktivacija signalnih puteva može ići i preko drugih heterodimera (HER1/HER3) ili homodimera (HER1) (176). Pored toga trastuzumab ne blokira dimerizaciju HER2 receptora već uglavnom njegovu homodimerizaciju (koja je najčešća kod prekomjerne izraženosti HER2) pa čak i u inaktivnoj formi HER2 može ligand-ovisno dimerizirati s ostalim HER receptorima (176). Također, funkciju receptora HER2 može preuzeti receptor IGF-1 vršeći njegovu fosforilaciju i posljedično aktivaciju nizvodnih signalnih komponenti. Utvrđeno je i postojanje ukrštene komunikacije između steroidnog estrogenskog i HER2 signalnog puta jer oba aktiviraju Akt i MAPK signalni put. Ta komunikacija je dvosmjerna i kompenzacijska pa često HER2 pozitivni tumori imaju slabije izražene steroidne receptore (89, 90).

VI. Prekomjerna izraženost proangiogenoznog vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i povezanost s rezistencijom na trastuzumab ukazuju na moguću kliničku korist upotrebom dvostruke inhibitorne terapije protiv VEGF i HER2 (177).

Navedeni mehanizmi rezistencije na trastuzumab mogu se zaobići uvođenjem dodatne inhibicije HER2 receptora drugim lijekovima, lapatinibom ili pertuzumabom. Od 2007. godine FDA je odobrio lapatinib u primjeni kod bolesnica rezistentnih na trastuzumab dok je od 2012. godine odobren i pertuzumab.

Kako bi se pojačao učinak trastuzumaba te smanjila učestalost pojave rezistencije danas se primjenjuje i trastuzumab emtanzin (Kadcila® Roche), konjugat protutijela i lijeka koji sadrži trastuzumab kovalentno vezan s inhibitorom mikrotubula DM1 (derivat maitanzina). DM1 se veže se za tubulin i zaustavljaju rast stanica u fazi G2/M staničnog ciklusa, što dovodi do apoptoze.



Slika 28. Preživljenje bez povrata bolesti nakon terapije HER2 pozitivnih bolesnica (godine); AC- doksorubicin (adriamicin/ciklofosfamid); T- paklitaksel (Taxol); TH- (paklitaksel/trastuzumab, Herceptin); HR- engl. *hazard ratio* (omjer rizika) (Preuzeto iz: Romond i sur. N Engl J Med. 2005;353(16):1673-84)

U istraživanju najboljeg terapijskog modaliteta ne smije se zanemariti heterogenost karcinoma dojke. U tom slučaju može se dogoditi progresija bolesti iz drugog klona stanica koje ne izražavaju HER2. Takav oblik rezistencije ne može se izbjeći, a javlja se u oko 10% bolesnica s HER2 pozitivnim karcinomima dojke (181). Potrebno je spomenuti da na osjetljivost/rezistentnost na terapiju mogu utjecati i individualni genski polimorfizmi, bilo na samom receptoru HER2, bilo gena odgovornih za učinkovitost ADCC mehanizma imunološke eliminacije ili pak gena uključenih u metaboličke procese inaktivacije i eliminacije Herceptina (176).

Prema navedenom je vidljivo da postoji potreba za dobrim biomarkerima koji će što detaljnije definirati osjetljivost ili rezistentnost na terapiju trastuzumabom (92). To svakako uključuje detekciju razine ekstracelularne domene (ECD) receptora HER2 ili aktiviranog (fosforiliranog) statusa receptora HER2 (pHER2), utvrđivanje razine drugih receptora HER obitelji i detekciju mutacija nizvodnih komponenti signalnih puteva aktiviranih preko receptora HER2.

2. HIPOTEZA

Prekomjerna izraženost receptora HER2 na membrani tumorskih stanica je uvjet za primjenu terapije trastuzumabom, ali ipak dio bolesnica nema pozitivan odgovor na terapiju. Stoga postoji potreba za pronalaskom dodatnih biomarkera koji bi na pouzdaniji način omogućili selekciju onih bolesnica koje bi imale korist od terapije trastuzumabom.

U hipotezi ovog rada pretpostavljamo:

- 1) izraženost fosforiliranog oblika receptora HER2 (pHER2) predstavlja pravi biljeg receptorske aktivnosti
- 2) karcinomi dojke sa slabo izraženim fosforiliranim receptorom HER2 razvijaju rezistenciju na terapiju trastuzumabom, odnosno jaka fosforilacija HER2 predodređuje dobar odgovor na terapiju trastuzumabom
- 3) receptori HER1, HER3 i HER4 utječu na nastanak rezistencije

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Obzirom da fosforilirani oblik receptora HER2 (Tyr1248-pHER2) predstavlja biljeg receptorske aktivnosti i funkcionalnosti, a isto tako može biti i biljeg rezistencije na terapiju, cilj našeg istraživanja je u stanicama HER2 pozitivnog duktalnog invazivnog karcinoma dojke utvrditi:

- stupanj izraženost fosforiliranog receptora HER2 (pHER2)
- stupanj izraženost receptora HER1, HER3 i HER4
- povezanost izraženosti pHER2 s rezistencijom na trastuzumab
- povezanost izraženosti pHER2 s izraženošću HER1, HER3 i HER4 i značaj s pojavom rezistencije na trastuzumab
- povezanost izraženosti pHER2 i ostalih HER receptora s prognostičkim čimbenicima: veličina tumora, histološki gradus i zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, izraženost steroidnih receptora (ER i PR) i proliferacijskog biljega Ki-67

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Bolesnice

Istraživanje je provedeno na uzorcima tumorskog tkiva 124 bolesnice s dijagnosticiranim HER2 pozitivnim (HER2+) duktalnim invazivnim karcinomom dojke neovisno o intrinzičkom tipu (Luminal B/HER2 pozitivan i HER2 tip) koje su operirane i liječene u Klinici za tumore, Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu, u razdoblju od 2008. do 2010. godine a čiji su uzorci primarnih karcinoma dojke arhivirani u Odjelu za onkološku patologiju Klinike za tumore.

Sve bolesnice uključene u istraživanje primale su adjuvantnu terapiju trastuzumabom, simultano ili nastavno nakon kemoterapije, u predviđenom trajanju od najmanje godinu dana (17 trodnevnih ciklusa). Iz arhivske baze podataka i povijesti bolesti bolesnica, utvrđena je odsutnost ili pojava rezistencije na terapiju trastuzumabom. Bolesnice koje su dobro reagirale na terapiju trastuzumabom nisu imale metastatsku progresiju bolesti dok su bolesnice koje su pokazale rezistenciju na terapiju imale radiološko i/ili ultrazvučno vidljivu metastatsku progresiju bolesti nakon primjene terapije trastuzumabom. Metastatska progresija bolesti u bolesnica koje su pokazale rezistenciju na trastuzumab, evidentirana je pojavom hepatalnih, moždanih ili koštanih sekundarizama. Bolesnice smo pratili najmanje pet godina te je zabilježeno vrijeme u mjesecima od postavljanja dijagnoze do pojave progresije bolesti.

Podaci o dobi bolesnica kao i patohistološka obilježja tumora: veličina tumora, histološki gradus, imunohistokemijska izraženost receptora za estrogen i progesteron te Ki-67 proliferacijskog biljega i zahvaćenost limfnih čvorova u pazušnoj jami, preuzeti su iz patohistoloških nalaza pohranjenih u arhivi Odjela za onkološku patologiju Klinike za tumore.

4.2. Metode

4.2.1. Konstruiranje tkivnih „mikročipova“ (Tissue microarray)

Istraživanje je provedeno na uzorcima tumorskog tkiva koje je u rutinskom postupku obrade, prethodno fiksirano u 10% puferiranom formalinu, dehidrirano i uklopljeno u parafin. Parafinski blokovi (donorski blok) čuvaju se u arhivi Odjela za onkološku patologiju, Klinike za tumore Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“.

Pregledom arhiviranih histoloških stakala odabranih uzoraka, patolog je obilježio područje tumorske mase te je pomoću 'šuplje igle' izdvojen dio tumora iz donorskog bloka. Po dva cilindra promjera 3 mm iz svakog donorskog uzorka preneseno je u već pripremljen recipijentski parafinski blok koji sadrži prethodno formirane cilindrične praznine jednakog promjera (Tissue-Tek Quick Ray System). Popunjeni recipijentski blok sadržavao je 30 različitih tumorskih uzoraka. Tako popunjen recipijentski parafinski blok ukalupili smo unutar kazete zagrijavanjem na 60 °C, oko 30 min, te dodali parafin, koji se ravnomjerno rasporedio unutar kazete i nakon hlađenja omogućio rezanje na mikrotomu.

Na taj način omogućena je istovremena analiza više tumorskih uzoraka (tkivni mikročip) (Slika 29).



Slika 29. Konstruiranje tkivnog mikročipa

4.2.2. Imunohistokemijsko bojenje

Od svakog pripremljenog tkivnog „mikročipa“ izrezana su po četiri reza debljine 3 µm te su razvučeni na predmetna stakalca za imunohistokemijsko bojenje i osušeni u termostatu na 60 °C oko 60 minuta. Prije daljnje obrade osušeno tumorsko tkivo je deparafinirano u seriji ksilola te rehidrirano u silaznom nizu alkohola do vode.

U biološkom materijalu fiksiranom formalinom, stvaraju se molekularne interakcije, pa je tkiva potrebno obraditi prije imunohistokemijske reakcije kako bi željeni epitopi (antigeni) postali slobodni i dostupni za protutijela. Termičkom obradom tkiva u puferu pH 9,0 (DakoCytomation Target Retrieval Solution, No S 2368), u vodenoj kupelji na 97 °C, 20 minuta pripremili smo tkivo za daljnji postupak.

Imunohistokemijskim postupkom bojenja utvrdili smo izraženost četiri receptora upotrebom slijedećih primarnih protutijela razrjeđenih puferskom otopinom za razrjeđivanje i smanjenje pozadinskog obojenja (DakoCytomation No S3022).

Tablica 4. Tehnički podaci o primarnim protutijelima upotrebljenim u istraživanju

Primarno protutijelo	Klon ili kat. br.	Proizvođač	Razrjeđenje
Tyr-1248 fosforilirani HER2	klon PN2A	Dako, Danska	1 : 25
HER1/EGFR	klon E30	Dako, Danska	1 : 50
HER3	klon DAK-H3-IC	Dako, Danska	1 : 50
HER4	kat. br. sc-283	Santa Cruz, USA	1 : 40

Proces imunohistokemijskog bojenja proveden je u automatiziranom uređaju Dako Autostainer na sobnoj temperaturi. Reakciji prethodi tretiranje tkiva s 3% vodikovim peroksidom u svrhu inhibicije endogenih peroksidaza. Nakon ispiranja aplicirano je odgovarajuće primarno protutijelo 60 minuta, prema kriterijima prikazanim u Tablici 4. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom te ispiranja, nastali antigen–protutijelo kompleks vizualiziran je sekundarnim protutijelom konjugiranim s peroksidazom, a sve

sadržano u vizualizacijskom kitu Dako EnVision Flex High pH (K8010) u trajanju od 45 minuta. Konačno, 10 minutnom inkubacijom s DAB (diaminobenzidin) kromogenom omogućena je vizualizacija specifične reakcije te kontrastno obojenje hematoksilinom kako bi bile vidljive sve histološke strukture.

4.2.3. Evaluacija imunohistokemijskih podataka

Prema smjernicama proizvođača imunohistokemijska reakcija je membransko/citoplazmatsko obojenje. Za HER1 i HER3 membransko obojenje je jače izraženo, a citoplazmatsko bojenje je slabo (zanemareno), ali je kod imunohistokemijske reakcije HER4 receptora veća prisutnost citoplazmatskog obojenja zbog poliklonalnog protutijela koje smo koristili u istraživanju.

Obzirom da ne postoji standardizirani sustav bodovanja niti granična vrijednost pozitivnog/negativnog rezultata za sve istraživane receptore, sistem bodovanja (eng. *scoring*) korišten pri evaluaciji imunohistokemijskih obojenja svih istraživanih uzoraka pratio je iste kriterije interpretacije kao HercepTestTM kojim se određuje stupanj izraženosti receptora HER2, a prema načinu očitavanja uzoraka korištenih u istraživanju na sljedeći način:

- 0** : potpuna odsutnost obojenja ili slabo obojenje u manje od 10% tumorskih stanica
- 1+** : djelomično membransko/citoplazmatsko obojenje slabog intenziteta prisutno u više od 10% tumorskih stanica
- 2+** : kompletno membransko/citoplazmatsko obojenje umjerenog intenziteta prisutno u više od 10% tumorskih stanica
- 3+** : kompletno membransko/citoplazmatsko obojenje jakog intenziteta prisutno u više od 10% tumorskih stanica

4.3. Metode statističke analize

U istraživanju smo koristili Hi kvadrat test (χ^2), multivarijatni test Pearsonove korelacije i Kaplan-Meirovu krivulju preživljenja s Log-rank testom. Za potrebe analize preživljenja bolesnice s progresijom bolesti zabilježene su kao kompletne, a bolesnice bez progresije bolesti kao cenzorirane. Preživljenje bolesnica pratili smo u mjesecima.

Za potrebe χ^2 analize istraživane karakteristike izrazili smo kao binarne i to: 1) dob bolesnica: <60 godina i ≥ 60 godina; 2) veličina tumora: <20 mm i ≥ 20 mm; 3) histološki gradus: I /II i III; 4) proliferacijski status Ki-67 kao <20 i ≥ 20 ; 5) status receptora za estrogen i progesteron kao pozitivno/negativno na osnovi granice od 10% izraženosti receptora u jezgrama tumorskih stanica preuzeto iz patohistološkog nalaza; 6) status limfnih čvorova kao pozitivno/negativno preuzeto iz patohistološkog nalaza; 7) pojava progresije bolesti kao pozitivno/negativno.

Sve istraživane receptore, pHER2, HER1, HER3 i HER4 izrazili smo linerano na osnovi semikvantitativne izraženosti (0 do 3+) i binarno kao pozitivno/negativno na osnovi granice intenziteta izraženosti od 2+ i 3+ (pozitivno).

Statistički značajnu povezanost ispitivanih karakteristika izrazili smo P vrijednošću manjom od 0,05.

U svrhu istraživanja značaja istovremene izraženost svih receptora HER obitelji koristili smo Pearsonov test korelacije a rezultate smo izrazili koeficijentom korelacije r_p ($-1 < r < +1$) i stupnjem statističke značajnosti P manjim od 0,05.

5. REZULTATI

Istraživanje izraženosti fosforiliranog HER2 receptora provedeno je na 124 uzorka HER2 pozitivnog duktalnog invazivnog karcinoma dojke. Tablica 5 prikazuje kliničke i patohistološke karakteristike bolesnica i tumora praćenih u istraživanju.

Prosječna starost bolesnica u trenutku operacije bila je 56,5 godina (u rasponu od 26 do 83 godine). Kod većine bolesnica tumori su bili veći od 20 mm (medijan 21 mm; raspon od 7 do 115 mm), histološkog gradusa III (55,7%), te pozitivnih estrogenskih receptora (54%). Prema intrinzičkoj klasifikaciji 70 karcinoma (56,5%) svrstavamo u Luminal B/HER2 pozitivan tip dok ih 54 (43,5%) pripada skupinu čistih HER2 pozitivnih koji nemaju izražene streoidne receptore.

Jedanaest bolesnica (8,9%) imalo je imunohistokemijsku izraženost HER2 2+ s potvrđenom amplifikacijom HER2 gena metodom kromogene *in situ* hibridizacije (CISH). Četrdeset devet bolesnica nije imalo lokalno uznapredovalu bolest u trenutku dijagnosticiranja, dok je 75 bolesnica (60,5%) imalo pozitivne limfne čvorove u pazušnoj jami (median 4; raspon od 1 do 32).

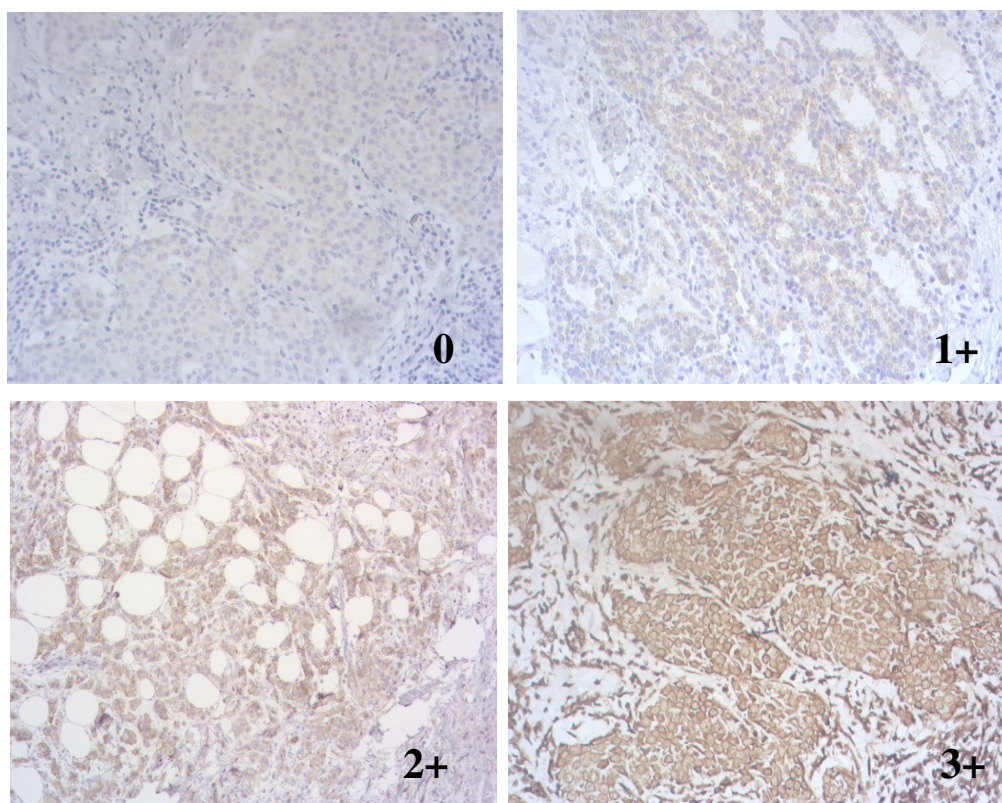
Nulto vrijeme za praćenja bolesnica je datum operacije te su bolesnice praćene najviše sedam godina. Kod 34 bolesnice (27,4 %) utvrđena je progresija bolesti, a sve su bolesnice primile najmanje 17 ciklusa terapije trastuzumabom, a kod većine njih (64,7%) progresija bolesti je nastupila unutar 24 mjeseca od operacije.

Tablica 5. Podaci o bolesnicama i patohistološke karakteristike HER2 pozitivnih tumora dojke uključenih u istraživanje

Karakteristika	Broj slučajeva (%)
Dob bolesnica	
< 60 godina	77 (62,1)
≥ 60 godina	47 (37,9)
Veličina tumora	
< 20 mm	50 (40,3)
≥ 20 mm	74 (59,7)
Histološki gradus	
I	2 (1,6)
II	53 (42,7)
III	69 (55,7)
Ki-67 %	
< 20	36 (29,0)
≥ 20	88 (71,0)
Estrogenski receptori	
Pozitivni	67 (54,0)
Negativni	57 (46,0)
Progesteronski receptori	
Pozitivni	50 (40,3)
Negativni	74 (59,7)
Intrinzički tip	
Luminal B/HER2 poz	70 (56,5)
HER2 poz. tip	54 (43,5)
Status limfnih čvorova	
Pozitivni	75 (60,5)
Negativni	49 (39,5)
Progresija bolesti	
Prisutna	34 (27,4)
Odsutna	80 (64,6)

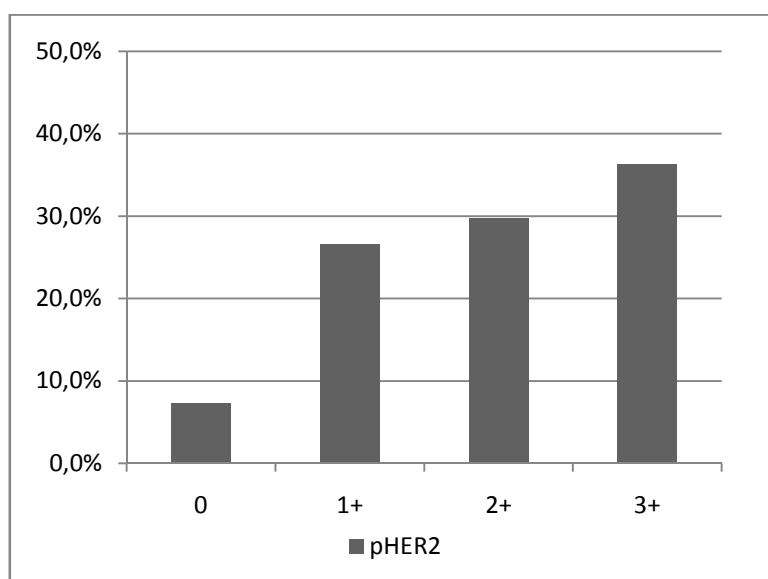
5.1. Izraženost fosforiliranog receptora HER2

Kao što je spomenuto, fosforilacija na poziciji Tyr-1248 u receptoru HER2 predstavlja njegov aktivni oblik. Stoga je izraženost fosforiliranog receptora HER2 imunohistokemijskom metodom analizirana u 124 uzorka HER2+ karcinoma dojke te su rezultati membranskog obojenja intenziteta 2+ i 3+ u više od 10 % tumorskih stanica smatrani pozitivnim (prema kriteriju Hercep testa). Izostanak membranskog obojenja (0) ili nekompletno/nekontinuirano membransko obojenje (1+) u manje od 10% tumorskih stanica smatrani su negativnim (Slika 30).



Slika 30. Mikrofotografija imunohistokemijske izraženosti receptora pHER2 (Povećanje 100x).

Većina HER2 pozitivnih tumora nalazi se u aktivnom/fosforiliranom obliku te su 82 (66,2%) tumora pokazala pozitivan status pHER2 (pHER2+) dok su 42 (33,8%) tumora bila negativna (pHER2-). Potpuni izostanak obojenja (0) pokazalo je samo 9 uzoraka (7,2%), 33 uzorka (26,6%) pokazala su slabo membransko obojenje (1+), 37 uzoraka (29,8%) pokazalo je umjereno obojenje (2+) dok je 45 uzoraka (36,4%) pokazalo jako membransko obojenje (3+) (Slika 31).



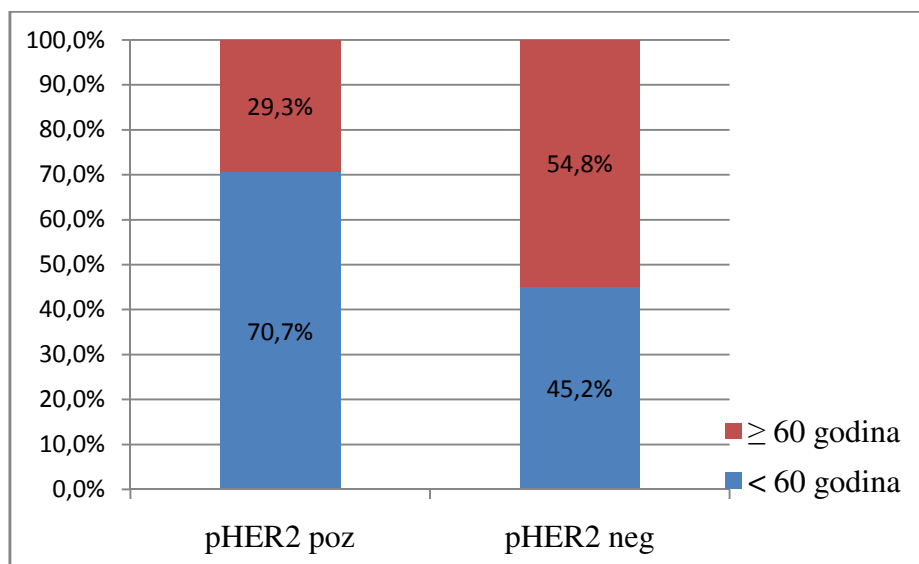
Slika 31. Raspodjela intenziteta imunohistokemijske izraženosti receptora pHER2

Fosforilirani HER2 tumori češće se pojavljuju kod mlađih bolesnika (46,8%) prosječne starosti 55 godina u odnosu na 60 godina prosječne starosti bolesnika s pHER2– karcinomima ($P=0,01$) (Slika 32). Iako su pHER2+ karcinomi češće veći od 20 mm, nije utvrđena značajna razlika u prosječnoj veličini tumora između pHER2+ (25,2 mm) i pHER2– karcinoma (26,1 mm). Također nismo utvrdili značajnu razliku u histološkom gradusu, stupnju proliferacije niti pojavi metastaza u regionalne limfne čvorove između pHER2+ i pHER2– karcinoma (Tablica 6). Karcinomi s pHER2– statusom nešto češće su imali metastaze u limfne čvorove aksile (64,3%) nego pHER2+ karcinomi (58,5%), ali s gotovo istim prosječnim brojem pozitivnih limfnih čvorova (7 vs. 6,5) (Tablica 6).

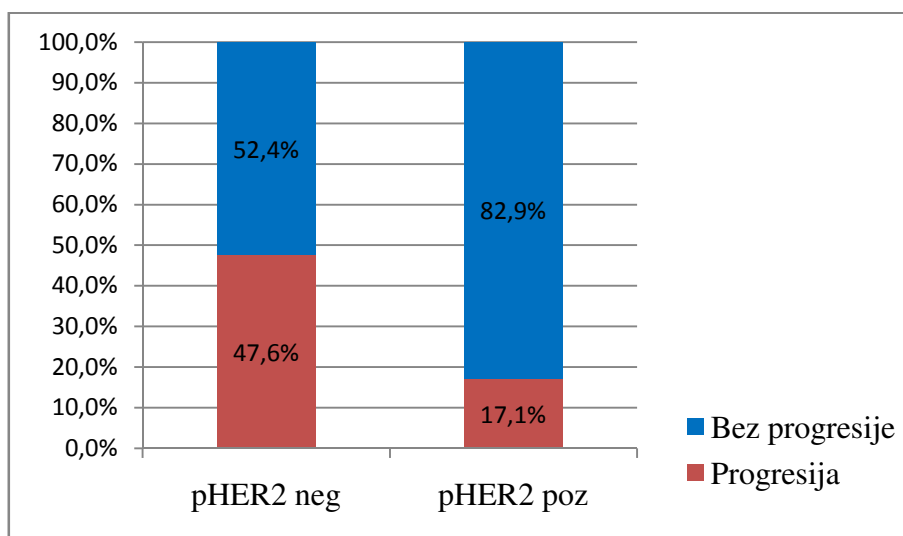
Tablica 6. Prikaz raspodjele istraživanih karakteristika prema izraženosti pHER2 i rezultata njihove statističke značajnosti analizirani χ^2 testom.

Karakteristika	pHER2 pozitivni N = 82 (%)	pHER2 negativni N = 42 (%)	χ^2 test (P)
Dob bolesnica			
< 60 godina	58 (70,7)	19 (45,2)	6,62
$\geq$ 60 godina	24 (29,3)	23 (54,8)	(0,010)
Veličina tumora			
< 20 mm	32 (39,0)	18 (42,9)	0,05
$\geq$ 20 mm	50 (61,0)	24 (57,1)	(0,827)
Histološki gradus			
I /II	35 (43,9)	18 (42,9)	0,02
III	46 (56,1)	24 (57,1)	(0,877)
Ki-67 %			
< 20	25 (30,5)	11 (26,2)	0,08
$\geq$ 20	57 (69,5)	31 (73,8)	(0,772)
Estrogenski receptori			
Pozitivni	40 (48,8)	27 (64,3)	2,69
Negativni	42 (51,2)	15 (35,7)	(0,101)
Progesteronski receptori			
Pozitivni	32 (39,0)	18 (42,9)	0,17
Negativni	50 (61,0)	24 (57,1)	(0,68)
Intrinzički tip			
Luminal B/HER2 poz	43 (52,4)	27 (64,3)	1,59
HER2 poz tip	39 (47,6)	15 (35,7)	(0,208)
Status limfnih čvorova			
Pozitivan	48 (58,5)	27 (64,3)	0,18
Negativan	34 (41,5)	15 (35,7)	(0,670)
Progresija bolesti			
Prisutna	14 (17,1)	20 (47,6)	11,53
Odsutna	68 (82,9)	22 (52,4)	(<0,001)

Značajna korelacija pHER2 s dobi bolesnika ($P=0,01$) i pojavom progresije bolesti ($P<0,001$) koju smatramo rezistencijom na terapiju trastuzumabom potvrđena je analizom χ^2 testom (Tablica 6). Bolesnice s pHER+ karcinomima u 17,1% slučajeva imale su pojavu recidiva u donosu na bolesnice s pHER2– karcinomima kod kojih se u 47,6% slučajeva pojavio recidiv bolesti ($P<0,001$) (Slika 33).

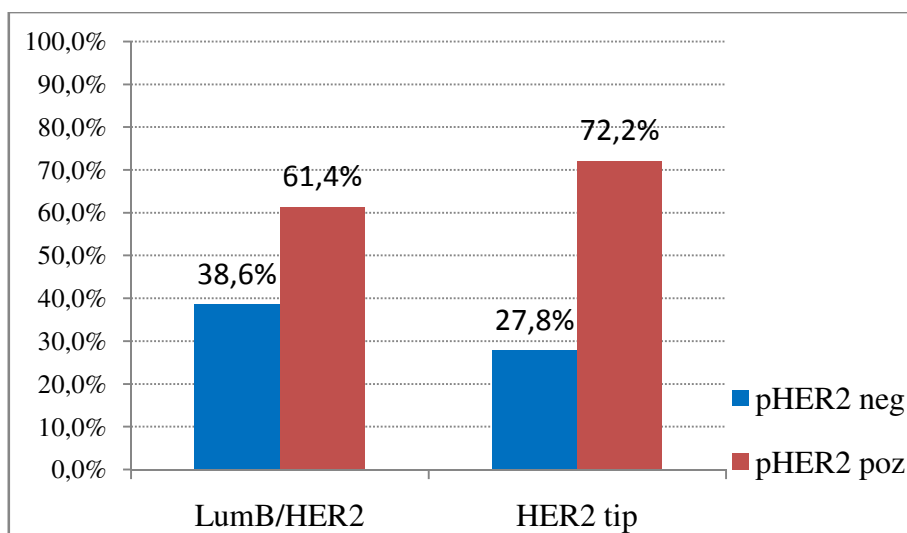


Slika 32. Raspodjela izraženosti pHER2 po dobnim skupinama bolesnika

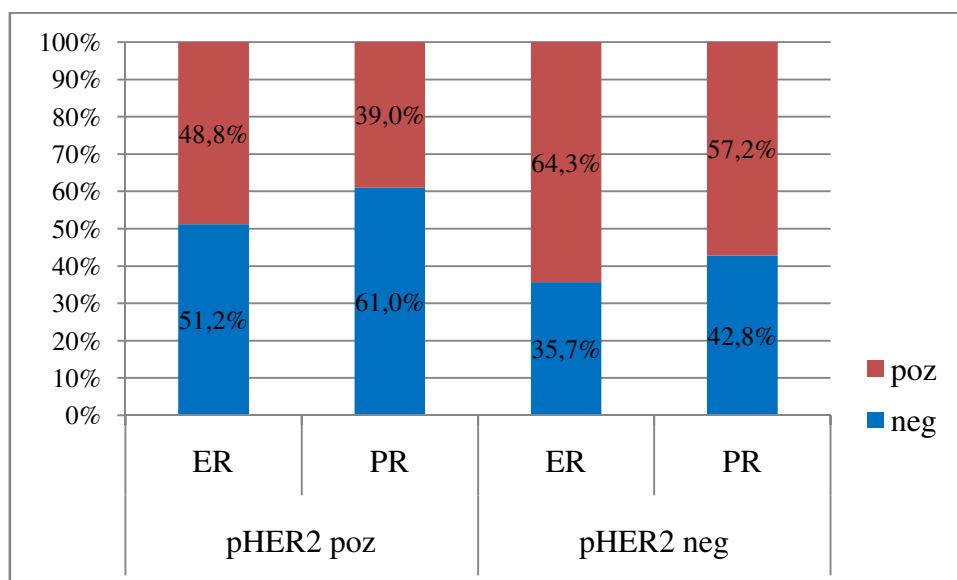


Slika 33. Raspodjela izraženosti pHER2 prema progresiji bolesti

Karcinomi HER2 intrinzičkog podtipa su češće pHER2+ (72,2%) od LumB/HER2 podtipa (61,4%) (Slika 34), a iz stupićastih grafova (Slika 37) je vidljivo da češće imaju negativne ER i PR u odnosu na pHER2–, ali te razlike ipak nisu statistički značajne (Tablica 6) (Slika 35).



Slika 34. Raspodjela izraženosti pHER2 prema intrinzičkom podtipu karcinoma dojke

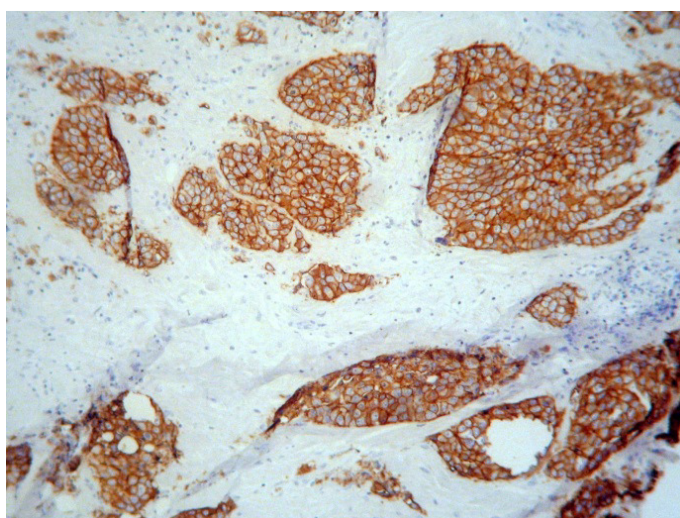


Slika 35. Raspodjela statusa receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR) prema izraženosti fosforiliranog receptora HER2 (pHER2)

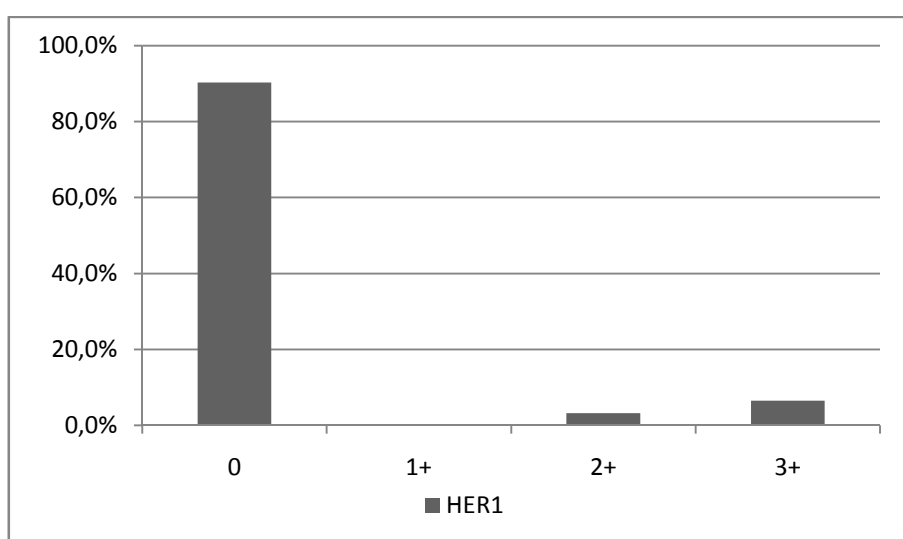
5.2. Izraženost receptora HER obitelji

5.2.1. Izraženost receptora HER1

Imunohistokemijska izraženost receptora HER1 utvrđena je u 12 (9,7%) uzoraka (Slika 36). Od toga 4 uzorka pokazuju umjereni, a 8 uzoraka jaki intenzitet membranskog obojenja (Slika 37). Izraženost HER1 nije pokazala korelaciju s ostalim istraživanim karakteristikama tumora, ali je χ^2 testom utvrđena korelacija s pHER2 ($\chi^2=3,87$; $P=0,049$).



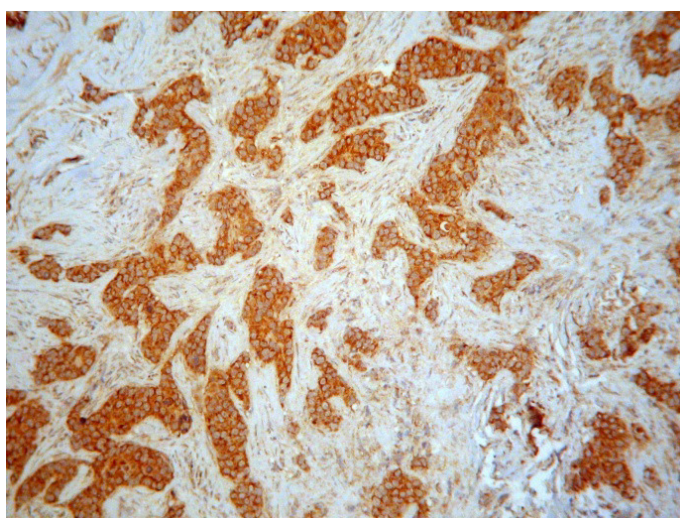
Slika 36. Imunohistokemijski jaka membranska reakcija receptora HER1 (3+)



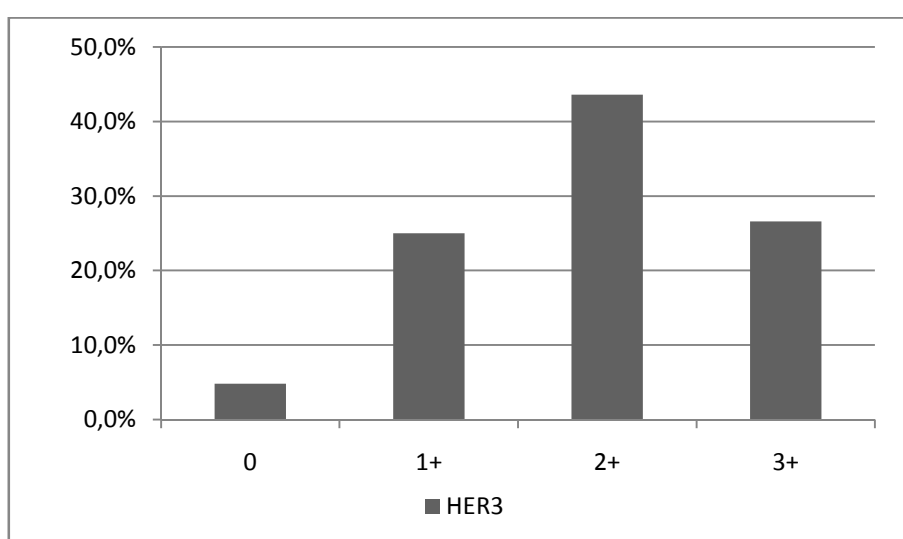
Slika 37. Raspodjela intenziteta imunohistokemijske izraženosti receptora HER1

5.2.2. Izraženost receptora HER3

Imunohistokemijska izraženost receptora HER3 utvrđena je u 87 (70,2%) uzoraka (Slika 38). Od ukupnog uzorka, 6 (4,8%) uzoraka pokazuju potpunu odsutnost obojenja (0), slabo obojenje pokazao je 31 (25%) uzorak, 54 uzorka (43,6%) pokazala su umjereno membransko obojenje (2+) dok su 33 uzorka (26,6%) pokazala jako membransko obojenje (3+) (Slika 39).



Slika 38. Imunohistokemijski jaka membranska reakcija receptora HER3 (3+)

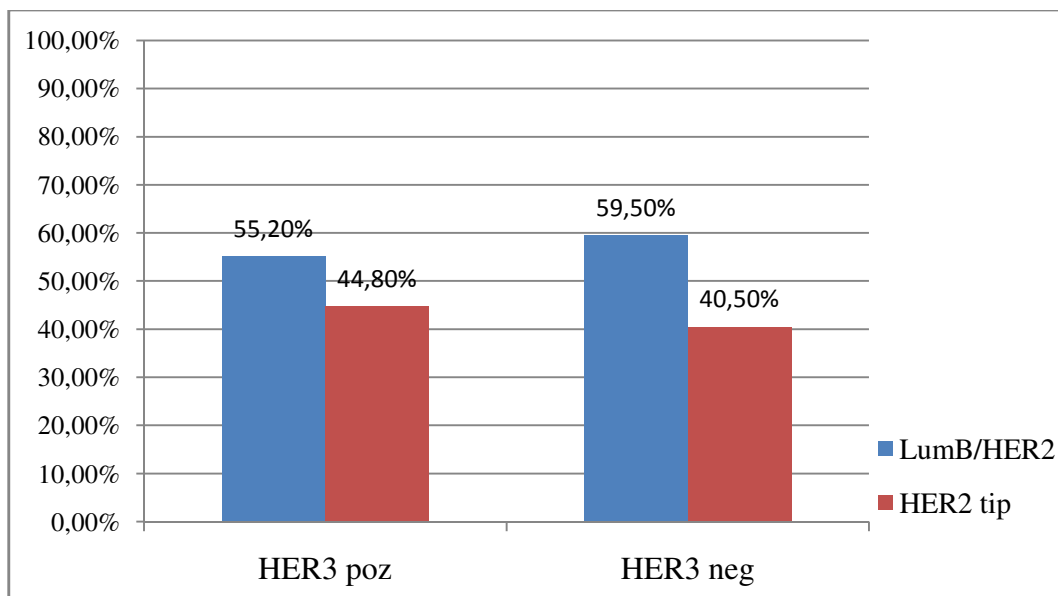


Slika 39. Raspodjela intenziteta imunohistokemijske izraženosti receptora HER3

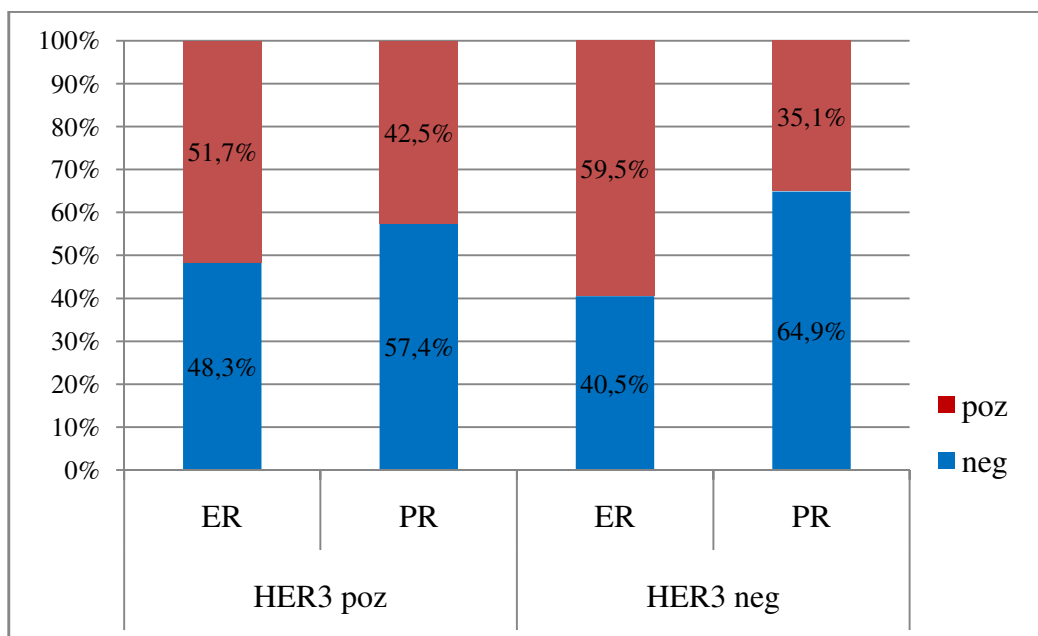
Tablica 7. Prikaz raspodjele istraživanih karakteristika prema izraženosti HER3 i rezultate njihove statističke značajnosti analizirani χ^2 testom.

Karakteristika	HER3 pozitivni N=87	HER3 negativni N=37	χ^2 test (P)
Dob bolesnica			
< 60 godina	58	19	2,59
$\geq$ 60 godina	29	18	(0,108)
Veličina tumora			
< 20 mm	34	16	0,19
$\geq$ 20 mm	53	21	(0,666)
Histološki gradus			
I /II	41	13	1,52
III	46	24	(0,218)
Ki-67 %			
< 20	23	13	1,23
$\geq$ 20	65	23	(0,267)
Estrogenski receptori			
Pozitivni	45	22	0,63
Negativni	42	15	(0,429)
Progesteronski receptori			
Pozitivni	37	13	0,59
Negativni	50	24	(0,443)
Intrinzički tip			
Luminal B/HER2 poz.	48	22	0,19
HER2 poz. tip	39	15	(0,657)
Status limfnih čvorova			
Pozitivan	50	25	1,11
Negativan	37	12	(0,293)
Progresija bolesti			
Prisutna	23	11	0,14
Odsutna	64	26	(0,707)

Statističkom analizom χ^2 testom nije utvrđena značajna razlika istraživanih karakteristika u odnosu na izraženost receptora HER3. HER3 negativni karcinomi češće imaju pozitivne ER i češće su LumB/HER2 tipa u odnosu na HER3 pozitivne (Slike 40 i 41).



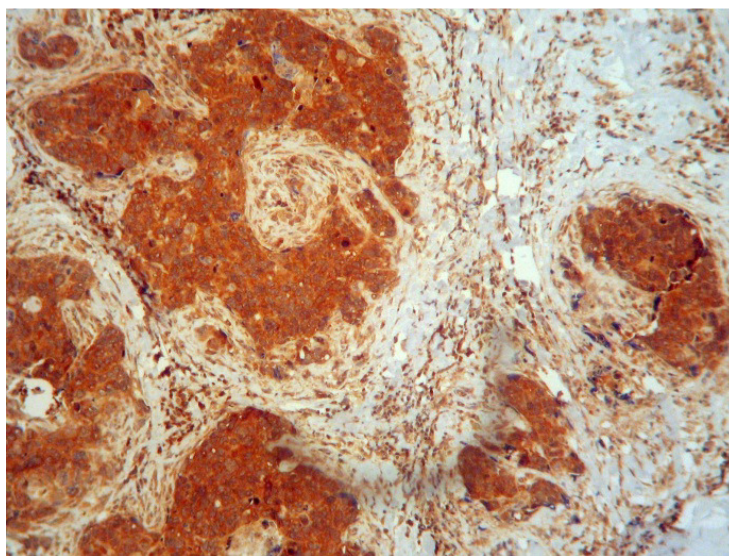
Slika 40. Raspodjela izraženosti HER3 prema intrinzičkom podtipu karcinoma dojke



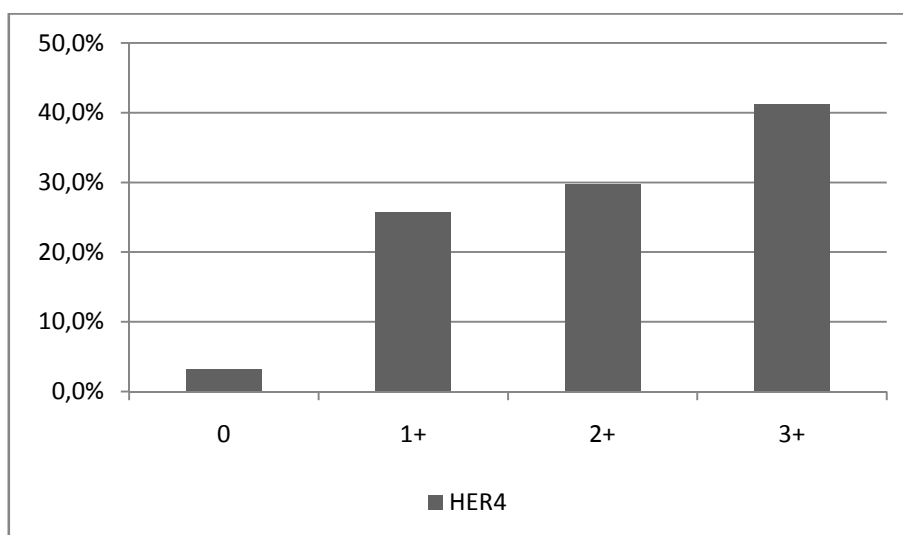
Slika 41. Raspodjela izraženosti receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR) prema izraženosti HER3

5.2.3. Izraženost receptora HER4

Imunohistokemijska izraženost receptora HER4 utvrđena je u 88 (71,0%) uzoraka (Slika 42). Od ukupnog uzorka, 4 uzorka (3,2%) pokazuju potpunu odsutnost obojenja (0), slabo obojenje pokazala su 32 uzorka (25,8%), 37 uzoraka (29,8%) pokazalo je umjereno obojenje (2+) dok je 51 uzorak (41,2%) pokazao jako obojenje (3+) (Slika 43).



Slika 42. Imunohistokemijski jaka reakcija receptora HER4 (3+)

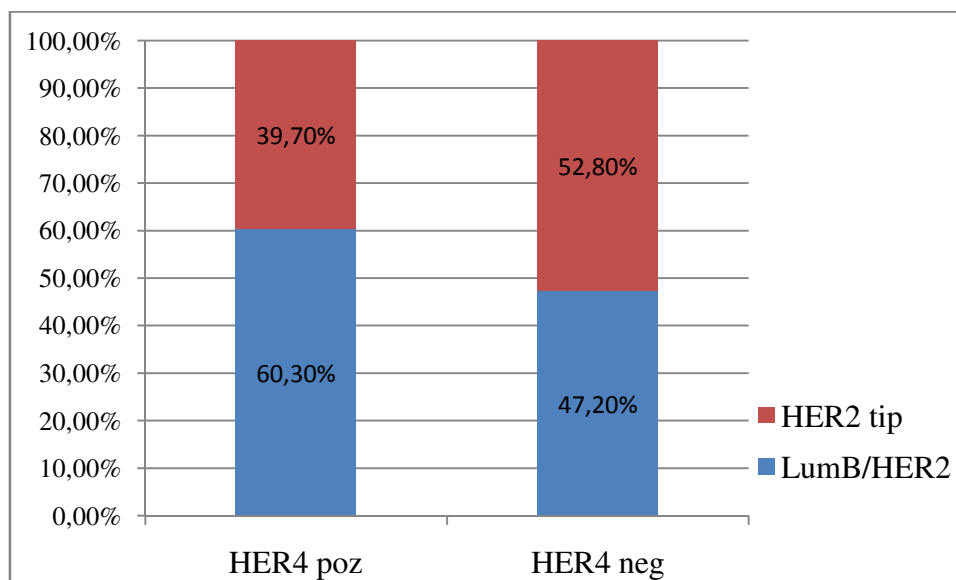


Slika 43. Raspodjela intenziteta imunohistokemijske izraženosti receptora HER4

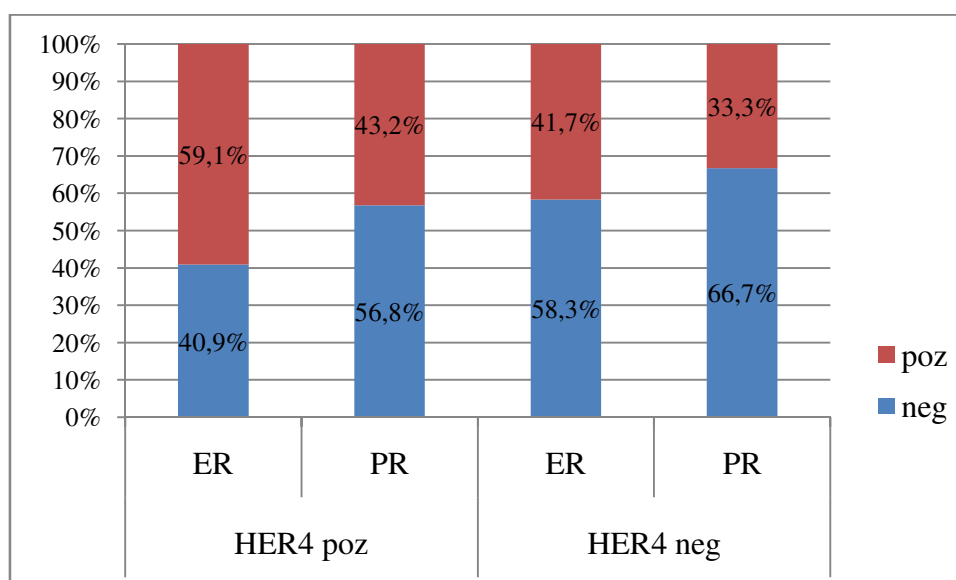
Tablica 8. Prikaz raspodjele istraživanih karakteristika prema izraženosti HER4 i rezultate njihove statističke značajnosti analizirani χ^2 testom.

Karakteristika	HER4 pozitivni N=88	HER4 negativni N=36	χ^2 test (P)
Dob bolesnica			
< 60 godina	57	20	0,92
$\geq$ 60 godina	31	16	(0,337)
Veličina tumora			
< 20 mm	34	16	0,36
$\geq$ 20 mm	54	20	(0,549)
Histološki gradus			
I /II	41	13	1,14
III	47	23	(0,285)
Ki-67 %			
< 20	19	17	8,15
$\geq$ 20	69	19	(0,004)
Estrogenski receptori			
Pozitivni	52	15	3,12
Negativni	36	21	(0,077)
Progesteronski receptori			
Pozitivni	38	12	1,03
Negativni	50	24	(0,31)
Intrinzički tip			
Luminal B/HER2 poz.	53	17	1,76
HER2 poz. tip	35	19	(0,185)
Status limfnih čvorova			
Pozitivan	54	21	0,10
Negativan	34	15	(0,754)
Progresija bolesti			
Prisutna	27	7	1,62
Odsutna	61	29	(0,203)

Iako χ^2 testom nije utvrđena statistički značajna razlika izraženosti ER između HER4+ i HER4- karcinoma, primjećujemo da korelacija ima tendenciju ka statističkoj značajnosti ($\chi^2=3,12$; $P=0,077$) (Tablica 8). HER4+ karcinomi imaju ER pozitivne u 59,1% slučajeva (Slika 45) te su češće LumB/HER2 tipa (Slika 44) s visokim stupnjem proliferacije ($Ki-67 \geq 20$) u 79,3% slučajeva.



Slika 44. Raspodjela izraženosti HER4 prema intrinzičkom podtipu karcinoma dojke



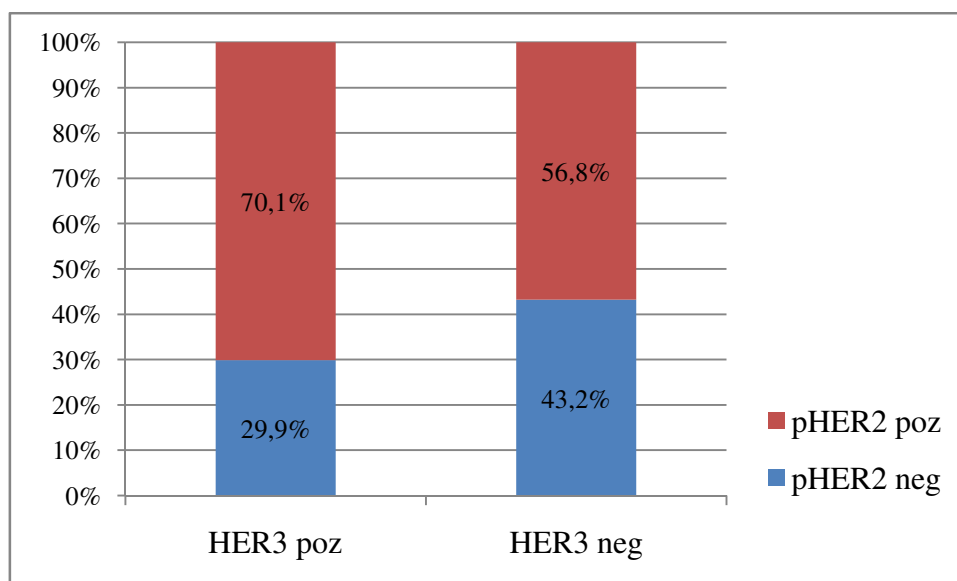
Slika 45. Raspodjela statusa receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR) prema izraženosti HER4

5.3. Istovremena izraženost receptora HER obitelji

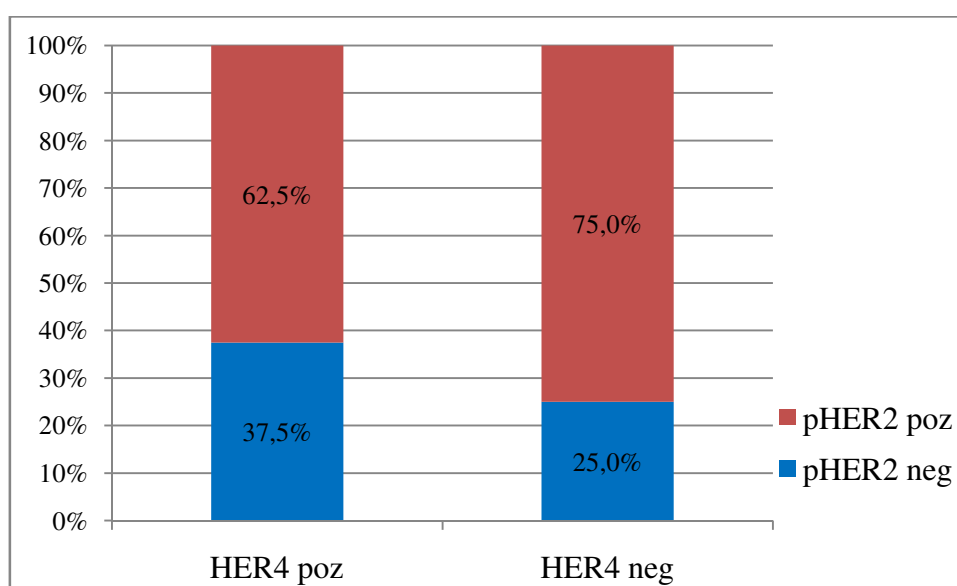
HER1 receptor je izražen u malom broju HER2 pozitivnih karcinoma (9,7%) dok su HER3 i HER4 izraženi u velikoj većini HER2 pozitivnih karcinoma (70,2% i 71%). Iako je iz Tablice 9 vidljivo da χ^2 testom nije utvrđena statistički značajna razlika u izraženosti receptora HER1, HER3 i HER4 između pHER2+ i pHER2– karcinoma iz stupićastih grafova je vidljivo da su pHER2+ karcinomi češće i HER3 pozitivni dok su HER4 pozitivni karcinomi češći u pHER2– skupini (Slike 46 i 47).

Tablica 9. Prikaz raspodjele receptora HER obitelji i rezultati statističke značajnosti analizirani χ^2 testom.

Receptor	pHER2 pozitivni N=82 (%)	pHER2 negativni N=42 (%)	χ^2 test (P)
HER1			
poz.	11 (13,4)	1 (2,4)	0,57
neg.	71 (86,6)	41 (97,6)	(-)
HER3			
poz.	61 (74,4)	26 (61,9)	2,07
neg.	21 (25,6)	16 (38,1)	(0,15)
HER4			
poz.	55 (67,1)	33 (78,6)	1,78
neg.	27 (32,9)	9 (21,4)	(0,182)



Slika 46. Raspodjela izraženosti pHER2 receptora statusa receptora HER3



Slika 47. Raspodjela izraženosti pHER2 receptora statusa receptora HER4

Uspoređujući značajnost izraženosti pHER2 i ostalih HER receptora, analizom Pearsonove korelacije, utvrdili smo statistički značajnu pozitivnu povezanost pHER2 s HER3 ($r_p = 0,227$; $P=0,013$) dok korelacija pHER2 i HER1 receptora nije statistički značajna, ali pokazuje tendenciju ka statističkoj značajnosti, što može ovisiti i o malom uzorku HER1 pozitivnih karcinoma ($r_p = 0,172$; $P=0,055$) (Tablica 10). Povezanost izraženog pHER2 s negativnim HER4 nije statistički značajna ($r_p = -0,12$; $P = 0,185$).

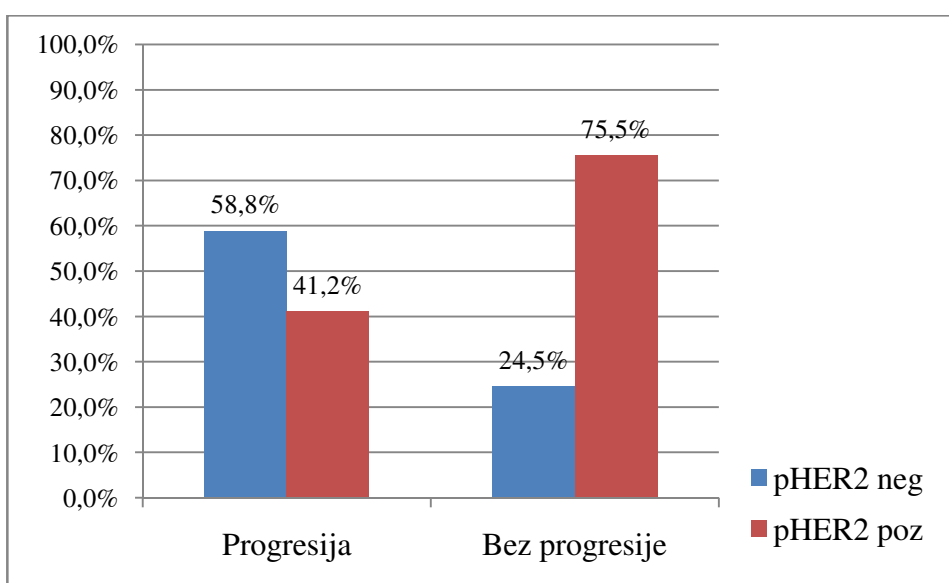
Tablica 10. Odnos izraženosti pHER2 prema izraženosti ostalih receptora HER obitelji analizirani Pearsonovim testom korelacija.

	Pearson koef. (r_p)	P
pHER2 vs. HER1	0,172	0,055
pHER2 vs. HER3	0,227	0,013
pHER2 vs. HER4	– 0,120	0,185

5.4. Rezistencija na trastuzumab

U ukupnom uzorku od 124 bolesnica koji su primile terapiju trastuzumabom, prema standardnom protokolu, progresija bolesti uočena je kod njih 34 (27,4%). Prosječno vrijeme od trenutka operacije do pojave progresije bolesti je 28,2 mjeseca.

Kod bolesnica s progresijom bolesti u 58,8% slučajeva karcinomi su imali pHER2– status za razliku od 24,5% pHER2– slučajeva kod bolesnica bez recidiva, što je i statistički značajna razlika uočena χ^2 testom ($\chi^2 = 11,53$; $P < 0,001$) (Slika 48).



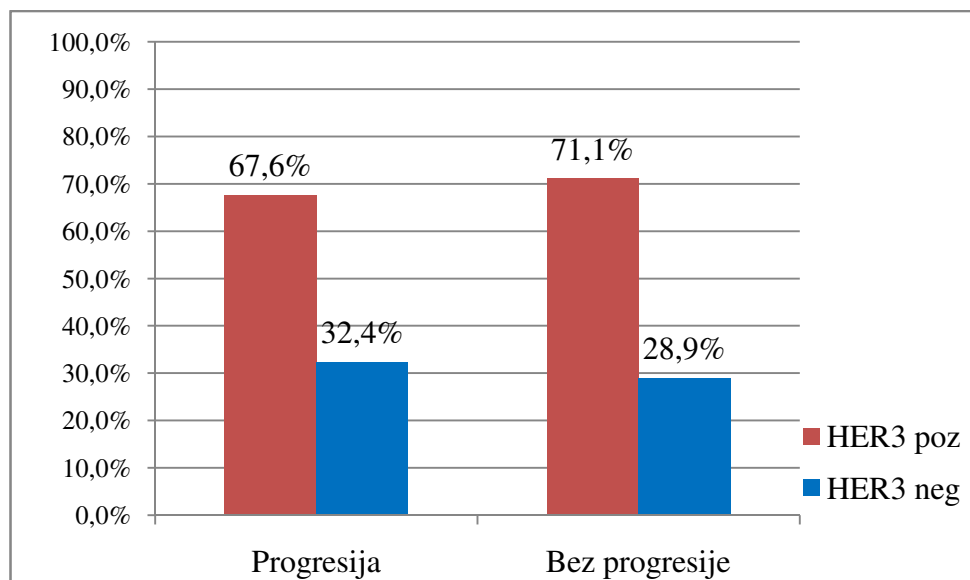
Slika 48. Raspodjela izraženosti pHER2 receptora prema progresiji bolesti

Bolesnice koje su pokazale rezistenciju na trastuzumab u 67,6% slučajeva su bile mlađe od 60 godina, češće s negativnim statusom ER (55,9%) i PR (67,6%) i HER2 intrinzičkog podtipa (52,9%) te najčešće s metastazama u limfne čvorove u trenutku operacije (85,3%), tumorima većim od 20 mm (73,5%) i histološkog gradusa III (82,4%), što je i statistički značajno (Tablica 11).

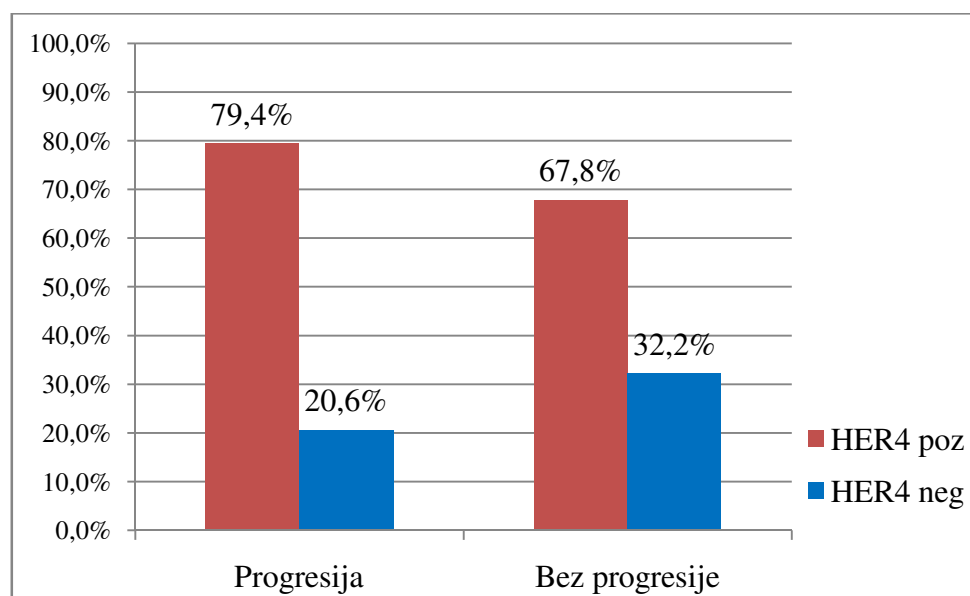
Tablica 11. Utjecaj patohistoloških karakteristika na pojavu progresije bolesti/rezistencije na terapiju trastuzumabom

Karakteristika	S progresijom N=34	Bez progresije N=90	χ^2 test (P)
Dob bolesnica			
< 60 godina	23	54	0,61
$\geq$ 60 godina	11	36	(0,433)
Veličina tumora			
< 20 mm	9	41	3,74
$\geq$ 20 mm	25	49	(0,053)
Histološki gradus			
I /II	8	46	7,64
III	26	44	(0,006)
Ki-67 %			
< 20	8	28	0,69
$\geq$ 20	26	62	(0,407)
Estrogenski receptori			
Pozitivni	15	52	1,85
Negativni	19	38	(0,173)
Progesteronski receptori			
Pozitivni	11	39	1,24
Negativni	23	51	(0,266)
Intrinzički tip			
Luminal B/HER2 poz.	16	54	1,68
HER2 poz. tip	18	36	(0,195)
Status limfnih čvorova			
Pozitivan	29	46	12,06
Negativan	5	44	(<0,001)

Analizom χ^2 testa nije utvrđena značajna korelacija izraženosti receptora HER1, HER3 ($\chi^2 = 0,14$; $P = 0,707$) niti HER4 ($\chi^2 = 1,62$; $P = 0,203$) s pojavom rezistencije (Slike 49 i 50).



Slika 49. Raspodjela izraženosti HER3 receptora prema progresiji bolesti



Slika 50. Raspodjela izraženosti HER4 receptora prema progresiji bolesti

Analizom Pearsonove korelacije (Tablica 12) potvrdili smo značajnu negativnu korelaciju pHER2 s rezistencijom. Pojava rezistencije veća je u slučajevima kada je smanjena fosforilacija HER2 uz istovremenu jaku izraženost jednog ili više ostalih HER receptora. HER1 je negativan u većini slučajeva s rezistencijom (94,1%).

U pHER2 negativnoj skupini koja pokazuje rezistenciju, HER3 receptor je izražen u 65%, a HER4 u 80% slučajeva te su u 12 slučajeva (60%) rezistencije karcinomi bili pHER2–/HER3+/HER4+. U tri slučaja (15%) zabilježen je trostruko HER negativni karcinom (pHER2–/HER3–/HER4–) i sva tri karcinoma su imala izražene ER i PR.

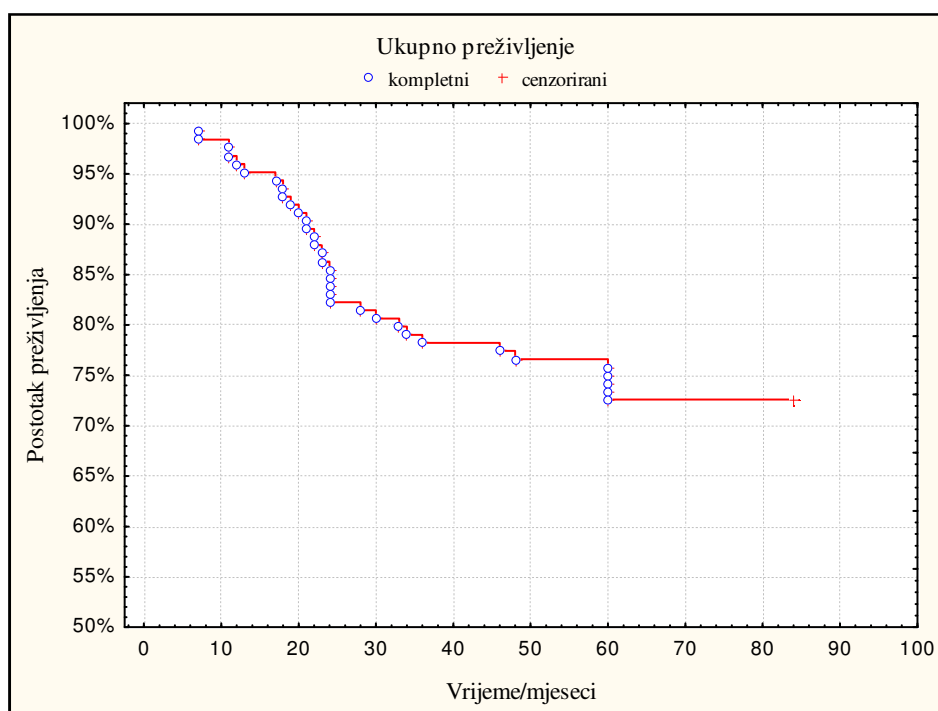
U skupini pHER2 pozitivnih karcinoma s rezistencijom na trastuzumab, HER3 receptor je izražen u 71,4%, a HER4 u 78,5% slučajeva te su u sedam slučajeva (50%) karcinomi bili trostruko HER pozitivni (pHER2+/HER3+/HER4+). Nije zabilježen niti jedan HER dvostruko negativni karcinom.

Tablica 12. Značajnost istovremene izraženosti receptora HER obitelji s pojavom progresije bolesti (rezistencija) analizirani Pearsonovim testom korelacija

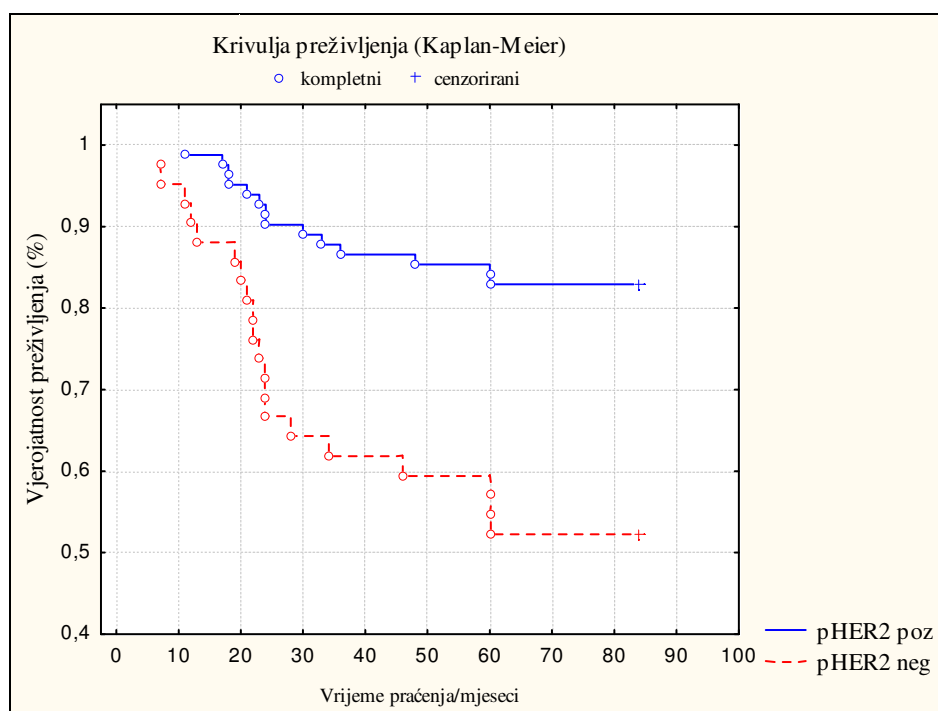
	Pearson koef. (r_p)	P
Rezistencija vs. pHER2	– 0,345	<0,001
Rezistencija vs. pHER2/HER1	– 0,306	<0,001
Rezistencija vs. pHER2/HER3	– 0,287	0,001
Rezistencija vs. pHER2/HER4	– 0,244	0,006

5.5. Preživljenje bolesnica

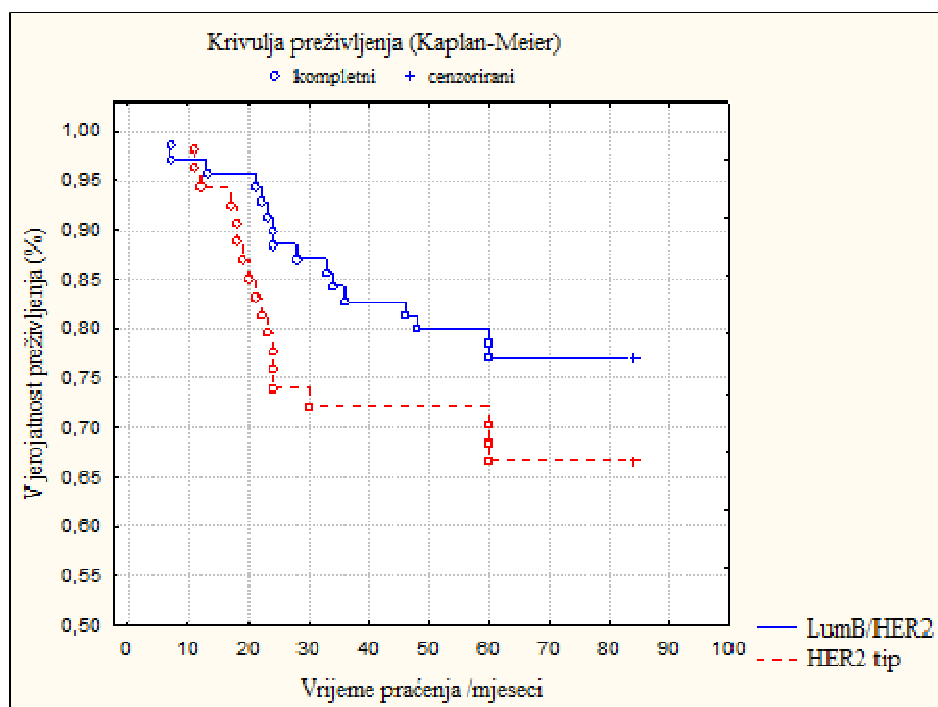
Preživljenje bez povrata bolesti (relapsa) zabilježeno je kod 90 bolesnica (72,6%). Sve bolesnice su praćene duže od 5 godina od trenutka operacije s medijanom vremena do povrata bolesti od 23,5 mjeseci. Od toga je 64,7% bolesnica imalo progresiju bolesti unutar 24 mjeseca (medijan 20,5 mjeseci).



Slika 51. Krivulja ukupnog preživljenja do progresije bolesti bolesnica s HER2 pozitivnim karcinomom dojke



Slika 52. Krivulja preživljenja bolesnica prema statusu fosforilacije HER2 (RR 1,95; 95% CI 1,2-3,2)

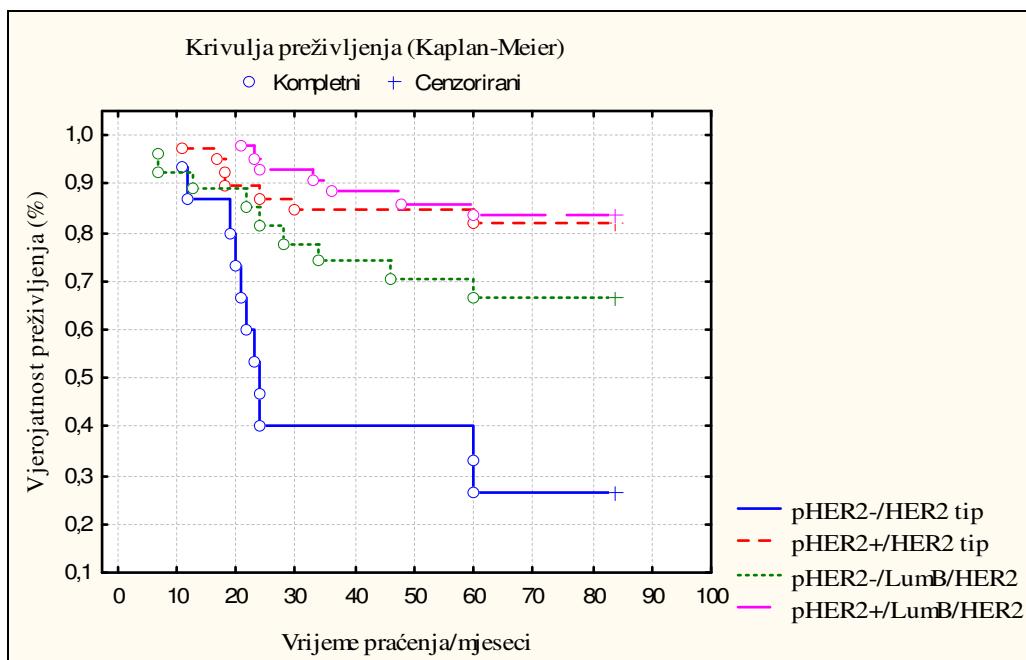


Slika 53. Krivulja vjerojatnosti preživljenja bolesnica prema intrinzičkom podtipu karcinoma dojke (RR 1,45; 95% CI 0,8-2,6)

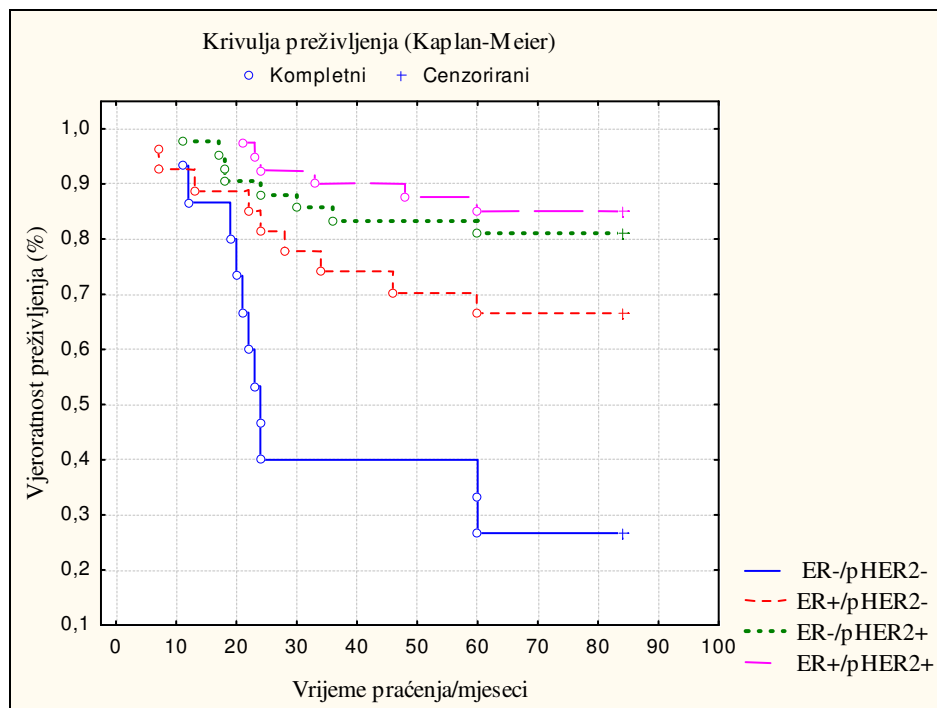
Prosječno preživljenje bolesnica s pHER2– karcinomima je 56,8 mjeseci u usporedbi s 74,8 mjeseci kod pHER2+ bolesnica. U pHER2– skupini, progresiju bolesti imalo je 47,6% bolesnica za razliku od 17,1% bolesnica s pHER2 pozitivnim karcinomom (Log rank –3,65; $P < 0,001$) (Slika 52).

Karcinomi HER2 intrinzičkog podtipa imaju lošije preživljenje, iako razlika u odnosu na LumB/HER2 nije statistički značajna (Log rank –1,39; $P = 0,164$) (Slika 53). Bolesnice s HER2 intrinzičkim podtipom imaju progresiju bolesti u 33,3% slučajeva u odnosu na progresiju bolesti u 22,5% bolesnica s LumB/HER2 pozitivnim podtipom.

Kada razlučimo intrinzičke podtipove karcinoma prema izraženosti pHER2, iz Kaplan-Meierove krivulje postaje vidljivo da je pHER2 negativan status loš prediktivni biljeg u obje intrinzičke skupine, a razlike u preživljenju bolesnica među skupinama su statistički značajne ($\chi^2 = 21,58$; $P < 0,001$) (Slika 54). Najlošije preživljenje imaju bolesnice HER2 intrinzičkog tipa s negativnim pHER2 statusom jer je u toj skupini 73,4% bolesnica imalo progresiju bolesti s medijanom relapsa od 22 mjeseca (Slika 54).



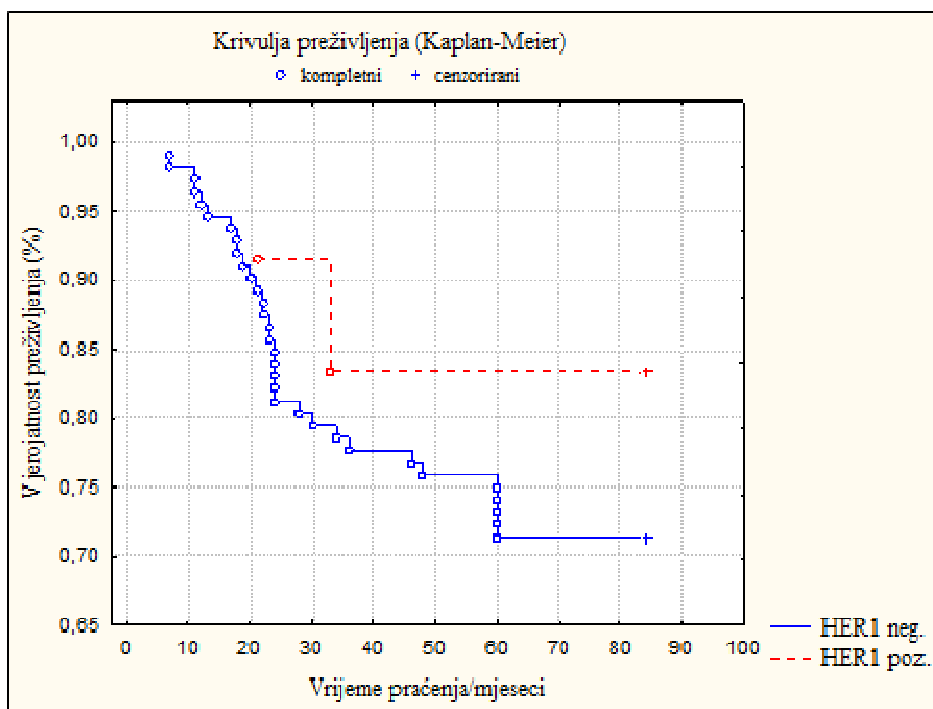
Slika 54. Krivulja preživljenja bolesnica prema intinzičkom podtipu i istovremenom statusu pHER2



Slika 55. Krivulja preživljenja bolesnica prema istovremenom statusu ER i pHER2

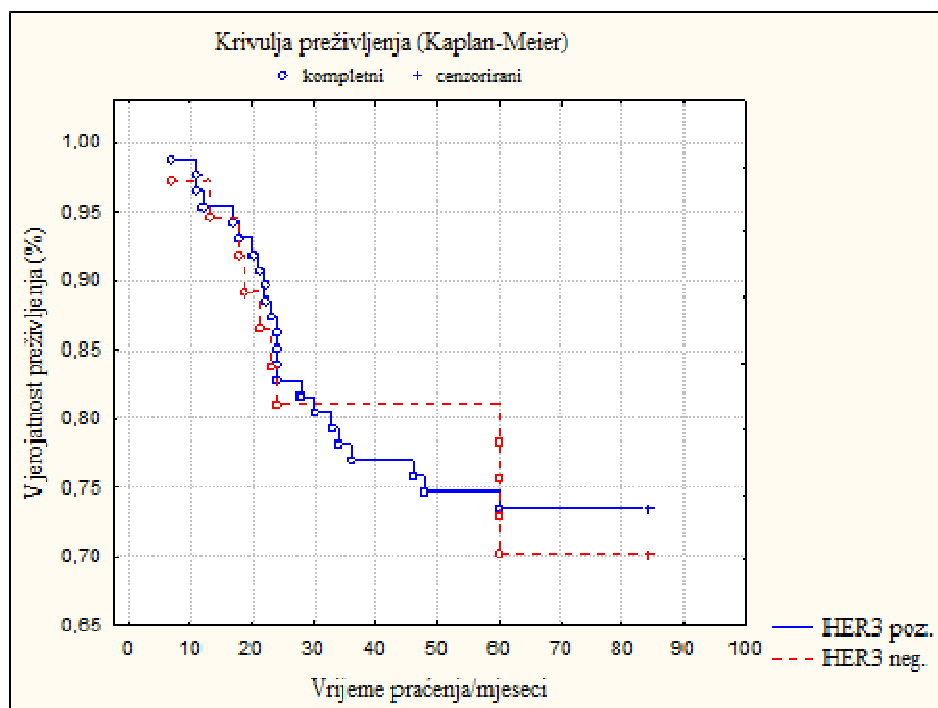
Iz krivulje na Slici 55 vidljivo je da pHER2 negativan status određuje loš odgovor na terapiju kod ER negativnih bolesnica ($\chi^2=21,75$; $P<0,001$).

Veće razlike u preživljenju bolesnika primjećene su obzirom na izraženost receptora HER obitelji. Bolesnice s karcinomima koji imaju pozitivne receptore HER1 imaju bolje preživljenje od HER1 negativne skupine jer je kod njih u samo dva slučaja detektirana pojava recidiva bolesti (Log rank 0,87; $P=0,381$), ali je broj bolesnica mali ($n=12$) (Slika 56).

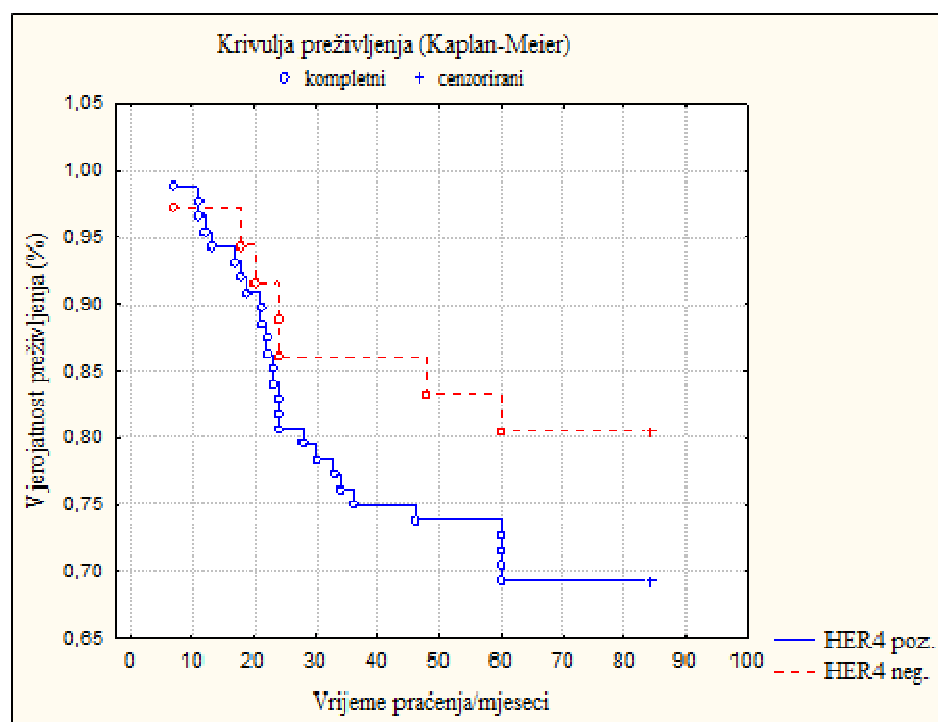


Slika 56. Krivulja preživljenja bolesnica prema statusu HER1 receptora

Status HER3 receptora ne pokazuje značajnu razliku u preživljenju bolesnica (Log rank $-0,31$; $P=0,753$) (Slika 57). Isto tako i status HER4 receptora ne pokazuje statistički značajnu povezanost s progresijom bolesti (Log rank 1,27; $P=0,205$), ali je iz krivulje na Slici 58 vidljivo da pozitivan status HER4 receptora utječe na lošije preživljenje. Ipak, niti jedan HER receptor nema samostalni prediktivni ni prognostički značaj.

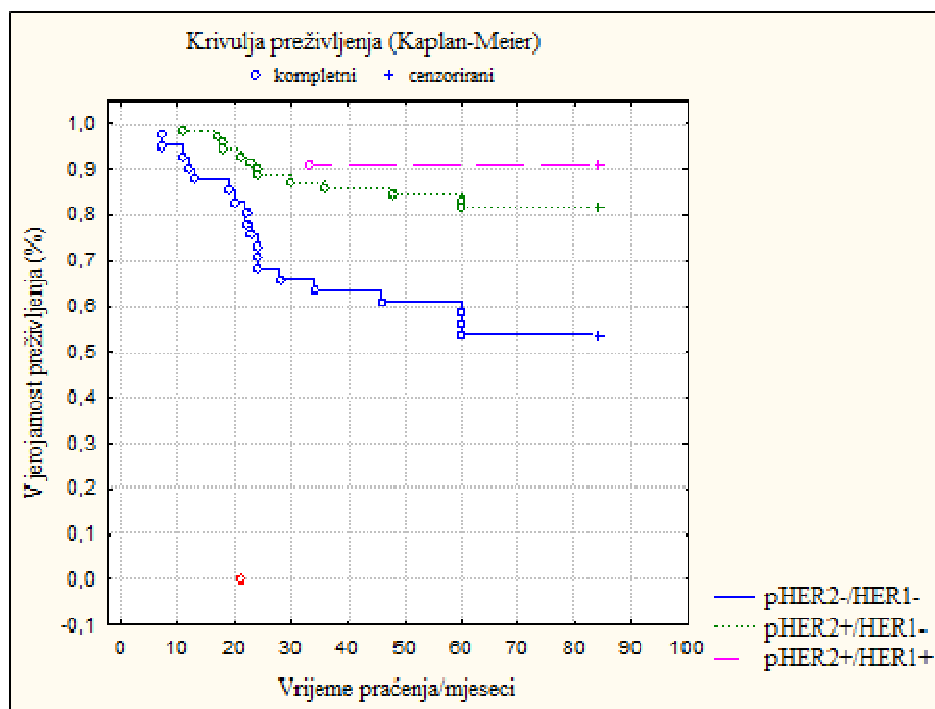


Slika 57. Krivulja preživljenja bolesnica prema statusu HER3 receptora



Slika 58. Krivulja preživljenja bolesnica prema statusu HER4 receptora

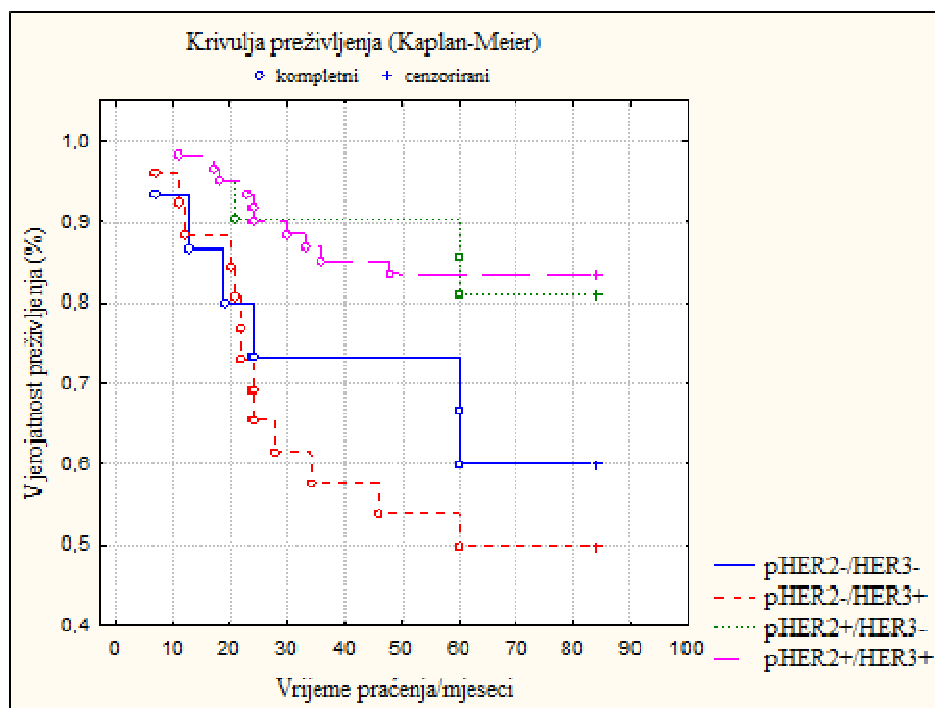
Kako bi utvrdili značaj istovremene izraženosti fosforiliranog HER2 s ostalim receptorima HER obitelji karcinome smo grupirali u četiri skupine prema njihovim statusima i pratili preživljenje bolesnika. Istovremeni negativni status pHER2 i HER1 pokazao je značajno lošije preživljenje bolesnika u odnosu na ostale dvije skupine ($\chi^2=15,70$; $P=0,001$) (Slika 59). Skupina pHER2–/HER1+ zabilježena je u samo jednom slučaju.



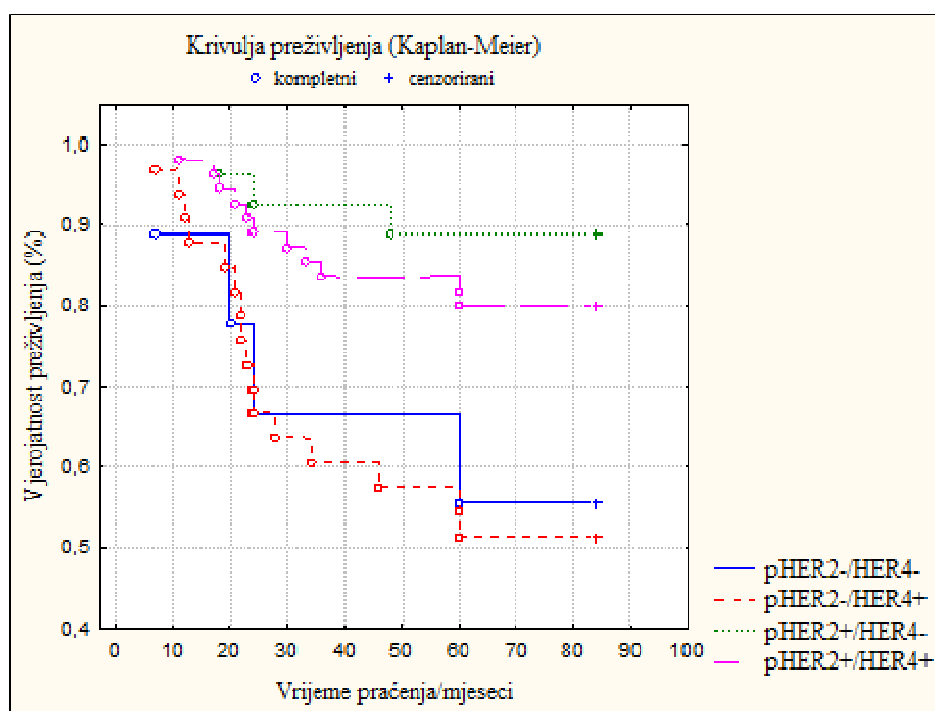
Slika 59. Krivulja preživljenja bolesnica prema istovremenom statusu pHER2 i HER1

Praćenjem istovremene izraženosti pHER2 i HER3 također smo utvrdili da je pHER2 negativan status pokazatelj lošijeg preživljenja, ali istovremeno pozitivan HER3 receptor doprinosi još lošijem preživljenju. U slučaju pHER2–/HER3+ bolesnica, 50% bolesnica je imalo progresiju bolesti (medijan 22 mjeseca), a razlika u vremenu preživljenja bez povrata bolesti među skupinama je statistički značajna ($\chi^2=12,90$; $P=0,005$) (Slika 60).

Istovremena izraženost pHER2 i HER4 receptora definira pHER2–/HER4+ kao skupinu s najlošijim preživljenjem dok pHER2+/HER4– skupina ima najbolje preživljenje ($\chi^2=14,19$; $P=0,003$) (Slika 61).



Slika 60. Krivulja preživljenja bolesnica prema istovremenom statusu pHER2 i HER3 ($\chi^2=12,90$; $P=0,005$)



Slika 61. Krivulja preživljenja bolesnica prema istovremenom statusu pHER2 i HER4 ($\chi^2=14,19$; $P=0,003$)

6. RASPRAVA

Rezultati istraživanja pokazuju da je HER2 receptor uglavnom prisutan u svojoj aktivnoj/fosforiliranoj formi te je imunohistokemijskom metodom uvrđen pozitivitet u 66,2% slučajeva pri čemu je potpuni izostanak obojenja zabilježen u samo 7,2% slučajeva. Time smo potvrdili našu pretpostavku da je fosforilacija HER2 (pHER2) biološki značajniji pokazatelj njegove funkcionalnosti od prekomjerne izraženosti HER2 na membrani. Prema Paulettiju i sur. (178) u više od 90% slučajeva uzrok prekomjernoj izraženosti receptora HER2 je amplifikacija gena a primarni mehanizam karcinogenog djelovanja je homodimerizacija neovisna o ligandu. Eksperiment Ginestiera i sur. (180) proveden *in vitro* na kulturama stanica karcinoma dojke potvrđuje da je u slučajevima HER2 pozitivnih tumorskih linija receptor uglavnom u fosforiliranom stanju. Visoku korelaciju HER2+ i pHER2+ pokazuju i druga istraživanja na kliničkim uzorcima tumora ali postoje neslaganja u postotku fosforilacije. Tako je u nekoliko studija pHER2 pozitivnost detektirana u 12% do 20% HER2+ populacije (182-185). Međutim, u studiji Cicenasa i sur. ELISA metodom ustanovljena je pozitivnost pHER2 u 68% HER2+ pacijentica, Hayashi i sur. su osjetljivijom metodom RPPA (eng. *reverse-phase protein analysis*) detektirali 65,3% pozitivnih pHER2, dok su Singer i sur. imunohistokemijskom metodom detektirali 68% pHER2+ što je slično našem rezultatu (186-188). Wulfkühle i sur. (189) su potvrdili fosforilaciju u 80% HER2+ karcinoma koristeći smrznuto tkivo pa možemo pretpostaviti da tijekom sporog procesa difuzije formalina (0,1 mm/h) u tkivo tijekom fiksacije dolazi do djelomične degradacije fosfata. Unutar istraživane skupine nismo utvrdili značajnu korelaciju izraženosti pHER2 s patohistološkim karakteristikama osim s mlađom dobi bolesnika. Međutim, prethodno objavljeni rezultati našeg istraživanja, koje smo proveli na skupinama bolesnika s HER2– i HER2+ karcinomima dojke potvrđuju značajnu povezanost fosforilacije HER2 s negativnim ER ($\chi^2 = 11,16$; $P < 0,001$) (190).

Obzirom na pozitivan HER2 status svih uzoraka, u ovo istraživanje su uključene samo dvije intrinzičke podskupine: Luminal B/HER2 pozitivan (LumB/HER2+) i čisti HER2 pozitivni tip. Pozitivni estrogenski i progesteronski receptori češće su detektirani kod pHER2– karcinoma, iako korelacija nije bila statistički značajna. Stoga je fosforilacija češće detektirana u HER2 pozitivnoj intrinzičkoj skupini (72,2%) nego u LumB/HER2+ skupini. Thor i sur. (182) su utvrdili korelaciju izraženosti fosforiliranog HER2 s mlađom dobi bolesnika, većim tumorom i višim histološkim gradusom, većim brojem pozitivnih

limfnih čvorova te negativnim statusom ER, ali je istraživanje provedeno na preko 800 karcinomima dojke svih intrinzičkih skupina. Slične rezultate su dobili i Hayasi i sur. (187) koji su utvrdili loše preživljenje kod bolesnica s detektiranom fosforilacijom HER2 koje nisu primile anti-HER2 terapiju.

Istraživanje Hayashi i sur. (187), kao i naše prethodno istraživanje Ramić i sur. (190), utvrdilo je i pozitivan fosforilacijski status HER2 kod HER2 negativnih karcinoma. Uglavnom se radi o skupini HER2 2+ „umjereno“ pozitivnih karcinoma koji nemaju amplifikaciju gena pa nisu kandidati za terapiju trastuzumabom.

Prije svega, ne smijemo zaboraviti da su HER2 pozitivni karcinomi zapravo vrlo heterogena skupina koja obuhvaća i ER+ i ER– karcinome. Gledajući iz perspektive molekularne klasifikacije neka su istraživanja naglasila činjenicu da intrinzička klasifikacija ipak ne odgovara u potpunosti stvarnoj pripadnosti na osnovi izraženosti specifičnih skupina gena Tako su deRonde i sur. (98) objavili da Luminalni-HER2 pozitivni karcinomi imaju lošiji odgovor na neoadjuvantnu terapiju trastuzumabom s patološki kompletnim odgovorom (pCR) od 8% u odnosu na pCR od 54% u HER2 pozitivnoj skupini. Istraživanja su također nametnula značaj prisutnosti biljega bazalnih stanica (CK5/6 i CK14) kod HER2 pozitivnih karcinoma upućujući na postojanje Bazalnog-HER2 pozitivnog tipa karcinoma koji može biti odgovoran za primarnu rezistenciju (191).

Nepodudarnost u literaturi prvenstveno može nastati zbog heterogenosti same skupine HER2 pozitivnih karcinoma, zatim upotrebom različitih metoda detekcije, modifikacijama u imunohistokemijskom bojenju (različiti klonovi antitijela, različite metode pripreme tkiva i vizualizacijske metode), nereprezentativnom uzorkovanju bolesnica, ali i različitim IHC kriterijima evaluacije pozitivnih rezultata te najvjerojatnije utjecajem fiksacije na vezani fosfat.

Međutim, u svim studijama je neosporno dokazano postojanje tumora s prekomjernom izraženošću receptora HER2, a istovremeno bez aktivacije. Biološki gledano moguće je da aktivacija tumora preko HER2 započinje u ranoj genezi tumora pa udio aktivnih receptora ovisi o fazi nastajanja tumora. Takvu pretpostavku iznosi i DiGiovanna i sur. (184) obzirom da neinvazivni duktalni karcinomi (*in situ*) pokazuju jaču izraženost pHER2 nego invazivni. Ne treba zanemariti niti aktivaciju putem slabijih fosforilacijskih mjesta koji upotrebom P2NA antitijela, specifičnog za Tyr-1248 fosforilacijsko mjesto, ne mogu biti detektirani.

Heterogenost izraženosti pHER2 i HER2 ukazuje na činjenicu da pHER2 ne može biti surogat za HER2 izraženost.

U našem istraživanju prekomjernu izraženosti HER1 receptora pokazao je mali broj karcinoma (9,2%) te nije utvrđena povezanost s patohistološkim karakteristikama, ali je utvrđena pozitivna korelacija s fosforilacijom HER2 ($\chi^2=3,87$; $P=0,049$). Prekomjerna izraženost receptora HER1 je među prvima dovedena u vezu s kancerogeneзом dojke. Abd El-Rehim i sur. (192) povezali su njegovu prekomjernu izraženost s višim histološkim gradusom i većim promjerom tumora koji ga izražavaju, izostankom izraženosti receptora za estrogen i općenito manjim preživljenjem bolesnika. Wiseman i sur. (180) potvrdili su manju izraženost hormonskih receptora za estrogen i progesteron i viši histološki gradus u HER1 pozitivnim tumorima. U novijoj literaturi je izraženost HER1 detektirana u rasponu od 15% do 21% dok je u ranijim istraživanjima bila i do 65% (129, 194-198). Međutim, zabilježeni trend smanjivanja postotka izraženosti prema istraživanjima novijeg datuma može se pripisati razvoju i optimizaciji primjenjene metodologije. Čak je u određenim istraživanjima utvrđen niži stupanj izraženosti HER1 u karcinomima nego u zdravom tkivu, a Choong i sur. su utvrdili progresivni gubitak izraženosti HER1 s napredovanjem tumora (145, 199, 200). Nizak stupanj izraženosti HER1 u našim rezultatima možemo objasniti i činjenicom da je HER1 najjače izražen u trostruko negativnim karcinomima dojke dok je naša skupina isključivo HER2 pozitivna (201, 202). Osim toga prema literaturi heterodimeri s HER2 dobivaju mogućnost internalizacije te zbog toga imaju konstantan obrat receptora na membrani mnogo brži nego za druge heterodimere (117, 203).

Prekomjerno izražen receptor HER3 detektirali smo u 70,2% slučajeva dok smo potpuni izostanak reakcije detektirali u manje od 5% HER2 pozitivnih karcinoma. Time smo utvrdili da HER2 pozitivni karcinomi imaju većinom izražene i HER3 receptore. Iako su HER3 pozitivni karcinomi češće imali pozitivan pHER2 nego HER3 negativni (70,1% vs. 56,8%), χ^2 testom nismo utvrdili statistički značajnu razliku ($\chi^2=2,07$; $P=0,15$). Međutim, praćenjem više parametara Pearsonovom analizom utvrdili smo statistički značajnu pozitivnu korelaciju HER3 s pHER2 ($r_p=0,227$; $P=0,013$).

Iako su HER3 pozitivni karcinomi bili nešto veći i češći kod bolesnika mlađih od 60 godina te višeg proliferacijskog indeksa Ki-67 od HER3 negativnih, nismo utvrdili statistički značajnu korelaciju s patohistološkim karakteristikama. Zabilježili smo pojavu

ER pozitivnih, ali PR negativnih receptora, češće kod HER3 negativnih karcinoma te je HER3- status bio češći kod LumB/HER2+ intrinzičkog tipa međutim, bez statistički značajne razlike (Tablica 7).

U literaturi je prekomjerna izraženost receptora HER3 povezana s višim histološkim gradusom i metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (144, 204). Abd el Rehim i sur. (192) utvrdili su povezanost HER3 pozitiviteta s nižim recidivom primarnog tumora, a s druge strane s višim histološkim gradusom, većim brojem zahvaćenih limfnih čvorova i invazijom u krvožilni sustav, ali također bez značajne korelacije s ER. Isto istraživanje je pokazalo prisutnost HER2/HER3 heterodimera u 50% HER2 pozitivnih karcinoma te povezanost s kraćim preživljenjem i bržim relapsom bolesti. Witton i sur. (205) su utvrdili u HER3 pozitivnim tumorima manju izraženost receptora za estrogen, ali nisu pronašli povezanost sa histološkim gradusom.

Mnoga istraživanja su pokazala da HER2 i HER3 receptori nisu neovisni jedan o drugom te da su aktivacijski najjači heterodimer. Alimandi i sur. (206) pokazali su da HER2 i HER3 heterodimer sudjeluje u neoplastičnoj transformaciji *in vitro* putem PI3K signalnog puta. Holbro i sur. (135) su prikazali da tumorske stanice bez prekomjerno izraženog receptora HER3 pokazuju istu razinu fosforilacije HER2 kao kontrolne HER2+/HER3+. Sličan zaključak prikazali su Lee-Hoeflich i sur. (207) koji su primijetili da je za poticanje proliferacije *in vitro* i *in vivo* ponajviše odgovoran HER2/HER3 heterodimer dok HER2 homodimeri ipak nisu pokazali jednak učinak. Transkripcijska i postranslacijska regulacija mRNA proteina HER3 kompenzira funkciju HER2 koji je blokiran terapijom inhibitorima kinaze što je i jedan od uzroka rezistencije na te lijekove (208, 209).

Prekomjerno izražen receptor HER4 detektirali smo u 71% slučajeva dok smo potpuni izostanak reakcije detektirali u manje od 5% HER2 pozitivnih karcinoma. Iako nismo dokazali statistički značajnu povezanost izraženosti receptora HER4 s pHER2, utvrdili smo da je fosforilacija HER2 bila češća u skupini HER4 negativnih karcinoma nego u skupini HER4+ karcinoma (75,0% vs. 62,5%) ($\chi^2 = 1,78$; $P = 0,182$). HER4 pozitivni karcinomi koreliraju s višim proliferacijskim biljegom Ki-67 ($\chi^2 = 8,15$; $P = 0,004$). Iako nije statistički značajno, HER4 + pokazuje tendenciju ka značajnoj korelaciji s pozitivnim receptorima za estrogen ($\chi^2 = 3,12$; $P = 0,077$) te su češće LumB/HER2+ intrinzičkog tipa, što je u suglasnosti s literaturom (205, 210, 211).

Mehanizmi djelovanja receptora HER4 su najveća nepoznanica unutar obitelji HER receptora. Najvjerojatniji razlog je postojanje funkcionalno različitih izoformi istog

receptora (212). Svaka od četiri izoforme, prolazi proteolitička cijepanja, a pri svakom od tih koraka nastaju domene s različitim biološkim učincima. Stoga ne možemo isključiti postojanje pojedinih izoformi u zdravom tkivu kao i u karcinomima dojke. Prema literaturi izraženost HER4 u karcinomima dojke varira od niske (11,9%) do vrlo visoke (82%) a također postoje i razilaženja u povezanosti s ostalim patohistološkim karakteristikama (156, 205, 211). Veći broj istraživanja pripisuju antiproliferativni učinak receptoru HER4, povezanost s nižim histološkim gradusom tumora, bolje preživljenje bolesnica i bolji odgovor na terapiju trastuzumabom (155, 159, 213). Međutim, Abd El-Rehim i sur. (192) su utvrdili HER4 pozitivitet u 79,3% karcinoma dojke i najveću prisutnost HER3/HER4 heterodimera (13,7%), a receptor HER4 korelira s višim histološkim gradusom, metastazama u limfnim čvorovima i krvožilnom invazijom dok su Bianchi i sur. (195) utvrdili izostanak bilo kakve povezanosti HER4 s ostalim prognostičkim čimbenicima.

Analizirajući hipotezu našeg istraživanja o odnosu izraženosti pHER2 i pojavnosti rezistencije na trastuzumab, utvrdili smo da su bolesnice rezistentne na trastuzumab češće imale neaktivni/nefosforilirani oblik receptora HER2 u odnosu na senzitivne. U pHER2–skupini, progresiju bolesti imalo 47,6% bolesnica za razliku od 17,1% bolesnica s pHER2 pozitivnim karcinomom ($\chi^2=11,53$; $P<0,001$). Bolesnice s HER2 pozitivnim, ali pHER2–receptorom, imale su daleko lošije preživljenje uz gotovo dva puta veći rizik povrata bolesti u odnosu na pHER2+ bolesnice (RR 1,95; 95% CI 1,2-3,2). Time smo potvrdili da je izraženost Tyr-1248 fosforiliranog HER2 dobar biljeg trastuzumab-senzitivnih karcinoma. Slaba izraženost pHER2 ukazuje na biološki slabo aktivan receptor, a samim time na neučinkovitost terapije trastuzumabom (rezistencija). U istraživanoj skupini HER2 pozitivnih karcinoma dojke rezistencija je zabilježena kod 27,4% bolesnica s medijanom vremena do povrata bolesti (relapsa) od 23,5 mjeseci. Od standardnih patohistoloških karakteristika progresija bolesti korelira s većim tumorom i višim histološkim gradusom tumora te najviše s pozitivnim statusom limfnih čvorova u podpazušnoj jami. Pozitivni limfni čvorovi već upućuju na agresivniji karcinom, a metastatski karcinomi lošije reagiraju na trastuzumab pa bi možda korelaciju rezistencije s pojavom metastaza u čvorovima pazušne jame trebalo pažljivije interpretirati. Naše istraživanje je provedeno na primarnim karcinomima, kao i većina istraživanja iz literature pa bi možda isto istraživanje na metastazama istih bolesnica donijelo drugačije rezultate.

Progresiju bolesti češće smo zabilježili u HER2 intrinzičkoj skupini (52,9%) u odnosu na LumB/HER2+, ali razlika nije bila statistički značajna. Međutim ako te dvije intrinzičke

skupine grupiramo prema fosforilacijskom statusu HER2 (Slika 52) postaje vidljivo da negativan fosforilacijski status u obje intrinzičke skupine stratificira bolesnice s najlošijim preživljenjem. Bolesnice HER2 intrinzičkog tipa s negativnim pHER2 statusom imaju progresiju bolesti u 73,4% slučajeva s medianom do relapsa bolesti od 22 mjeseca. Razlog tomu zapravo leži u činjenici da je negativan status ER uz negativan fosforilacijski status HER2 pokazatelj najlošijeg preživljenja u cijelom istraživanju ($\chi^2=21,75$; $P<0,001$). Rezultati drugih istraživanja također su utvrdili korelaciju izraženosti fosforiliranog HER2 s mlađom dobi bolesnica, većim histološkim gradusom i veličinom tumora te većim brojem pozitivnih limfnih čvorova i negativnim statusom ER (182, 184, 214).

Literatura u kojoj je istraživao utjecaj pHER2 na predviđanje učinkovitosti terapije trastuzumabom, potvrdila je da fosforilirani HER2 tumori pokazuju bolji odgovor na terapiju trastuzumabom i duže preživljenje bez progresije bolesti. Prema studiji Hudelista i sur. preživljenje bez progresije bolesti nakon terapije trastuzumabom udvostručeno je kod pHER2+ bolesnica u odnosu na pHER2–, a prema studiji Giuliana i sur. 89% pHER2+ bolesnica pokazalo je korist od terapije trastuzumabom za razliku od samo 49% pHER2– (126, 172). Njihovi zaključci odgovaraju rezultatima naše studije.

Thor i sur. (182) su utvrdili da je desetogodišnje preživljenje bolesnica s HER2– karcinomima bilo neznatno bolje od preživljenja bolesnica s HER2+/pHER2– karcinomima (više od 50%) dok su bolesnice s HER2+/pHER2+ karcinomima imale puno lošije preživljenje (oko 30%). Rezultati njihovog istraživanja su vrlo značajni imajući u vidu da istraživana skupina ima veliki broj bolesnica koje su liječene prije 1990. godine te nisu primile terapiju trastuzumabom. Naši rezultati se podudaraju s istraživanjem Hudelista i sur. koji su utvrdili da je preživljenje bolesnica s metastatskim karcinomom dojke nakon terapije trastuzumabom puno lošije u slučaju kada im je fosforilacijski status bio negativan (183). Oni su također utvrdili Tyr-1248 kao najjače fosforilacijsko mjesto u procesu aktivacije kao i korelaciju povišenog ECD HER2 fragmenta u serumu s rezistencijom na endokrinu terapiju, a Hayashi i sur. su potvrdili da je pHER2 pozitivan status lošiji prognostički pokazatelj u skupini bolesnica koje nisu primale anti-HER2 terapiju (187).

Iako je cilj našeg istraživanja detekcija utjecaja izraženosti svih receptora HER obitelji kao i njihova međusobno istodobna izraženost (ko-izraženost) s utjecajem na pojavu rezistencije u istraživanju nismo utvrdili statistički značajan pojedinačni učinak HER1, HER3 niti HER4 receptora na pojavu rezistencije. Iako razlike nisu statistički značajne,

analizom preživljenja utvrdili smo da bolje preživljenje imaju bolesnice s HER1+ ili HER4– karcinomima dok pozitivan/negativan status HER3 nije pokazao nikakvu razliku. Ipak, niti jedan HER receptor nema samostalni prediktivni ni prognostički značaj.

Međutim, svjesni činjenice da receptori obitelji HER dimeriziraju nakon aktivacije, te promatrajući pojavu rezistencije i preživljenje bolesnica u odnosu na heterodimerne kombinacije došli smo do zanimljivih otkrića. Multivarijatnom analizom više faktora koji utječu na pojavu rezistencije na terapiju trastuzumabom utvrdili smo da svaki od tri heterodimera ima statistički značajnu korelaciju s pojavom rezistencije. Heterodimer pHER2+/HER1+ pokazuje najjaču korelaciju ($r_p = -0,306$; $P < 0,001$), no zbog malog broja slučajeva taj podatak moramo uzeti s krajnjim oprezom. Heterodimeri pHER2+/HER3+ ($r_p = -0,287$; $P = 0,001$) i pHER2+/HER4+ ($r_p = -0,244$; $P = 0,006$) pokazuju značajnu korelaciju s pojavom rezistencije.

Analizom preživljenja bolesnica u odnosu na učestalost ko-izraženosti vidimo da najbolje preživljanje imaju bolesnice s pHER2+/HER1+ a zatim pHER2+/HER4– dok najlošije preživljenje imaju bolesnice s pHER2–/HER3+ i pHER2–/HER4+ karcinomima. Sve razlike među podskupinama su statistički značajne.

Najveća nepoznanica u našem istraživanju pojavila se pregledom raspodjele HER3 i HER4 s pHER2 prema pojavi rezistencije. Unutar pHER2 negativne skupine, 60% karcinoma koji nisu reagirali na terapiju trastuzumabom unatoč HER2 pozitivnom statusu, imali su HER3+ i HER4+, dakle pHER2–/HER3+/HER4+ imunofenotip.

Unutar pHER2 pozitivne skupine, 50% karcinoma koji nisu reagirali na terapiju trastuzumabom također su imali pozitivne receptore HER3 i HER4, dakle pHER2+/HER3+/HER4+ imunofenotip. U ovoj skupini pojavila su se i tri karcinoma koji su imali pHER2–/HER3–/HER4– imunofenotip, ali su sva tri imala pozitivne ER i PR.

U našem istraživanju je izraženost HER1 receptora pokazala dvojbene rezultate najvjerojatnije zbog malog broja karcinoma koji su pokazali HER1 pozitivitet. Tako je naš podatak o dobrom odgovoru na trastuzumab kod bolesnica s HER2+/HER1+ imunofenotipom kontradiktoran rezultatima iz literature iz kojih je vidljiv negativan učinak prekomjerne izraženosti receptora HER1 na preživljenje bolesnica koji se pripisuje njegovoj dimerizaciji s HER2 (156, 213, 215). Suo i sur. su analizirali izraženost receptora obitelji HER te pratili ishod bolesti u razdoblju od 7 do 11 godina nakon dijagnoze. Prema njihovim rezultatima bolesnice s istovremeno izraženim receptorima HER1 i HER2 pokazuju najkraće preživljenje u usporedbi s ostalim kombinacijama receptora. Na preživljenje iste skupine utječe i izraženost receptora HER4 koji, ukoliko je prisutan,

antagonizira nepovoljnom učinku tog dimera. Navedeni autori smatraju da je upravo izraženost receptora HER4 odgovorna za čitav spektar varijacija rezultata u različitim istraživanjima (156). U postojećoj literaturi dimerne kombinacije HER1/HER3 i HER1/HER4 nisu se pokazale značajnima niti učestalošću, niti povezanošću s ostalim patohistološkim čimbenicima u karcinomima dojke (192).

Obzirom da smo jako izražen HER3 receptor detektirali u skupini HER2 pozitivnih karcinoma dojke, njegov negativni učinak posebno se ističe praćenjem njihove istovremene izraženost. Naši rezultati ukazuju na vjerojatnu heterodimerizaciju receptora HER2 i HER3 i njihovu suradnju pri signalizaciji koja vodi kancerogenezi kod bolesnica s rezistencijom na trastuzumab. Najlošije petogodišnje preživljenje bez povrata bolesti (50%) imaju bolesnice s pHER2–/HER3+ statusom koje bi možda imale koristi od dodatne terapije inhibitorima kinaze.

HER2/HER1 i HER2/HER3 heterodimeri imaju sinergistički učinak na diobu stanica i transformaciju. Kada HER2 ne može direktno aktivirati PI3K/Akt signalni put njegovu ulogu preuzima HER2/HER3 heterodimer (117). U istraživanju Abd El-Rehim i sur. bolesnice s izraženim dimerima HER2/HER3 pokazale su lošije preživljenje od onih s homodimernom kombinacijom HER2/HER2 (192). S druge strane receptor HER3 izražen s receptorom HER4 pokazuje bolje preživljenje i dulje vrijeme do povratka bolesti (192). Stoga karcinogeni učinak HER2 u velikoj mjeri leži u njegovoj interakciji s HER3, a u takvom kompleksu receptor HER3 doprinosi i HER2 uvjetovanom razvoju rezistencije na lijek tamoksifen (194, 205, 216). Još uvijek ostaje otvoreno pitanje može li HER2 i HER3 status, obzirom na njihov zajednički karcinogeni učinak, biti značajan u slučajevima kada je izraženost HER2 ispod kliničkog kriterija za terapiju.

Naši rezultati nisu dokazali protektivni učinak HER4, već naprotiv, njegova istovremena izraženost s HER2 može doprinjeti kancerogenezi i lošoj prognozi pa nešto veći povrat bolesti unutar pet godina imaju bolesnice s pHER2–/HER4+ karcinomima nego s pHER2–/HER4–. U izostanku izraženosti receptora HER2, receptor HER3 pozitivno korelira upravo s receptorom HER4 (121, 193, 195). Biološki gledano, za HER3/HER4 heterodimerni receptorski kompleks unatoč korelaciji i istovremenoj izraženosti nije potvrđen značajan mitogeni učinak (134). Unatoč toj činjenici Abd El-Rehim i sur. utvrdili su prisutnost HER3/HER4 heterodimera u 13,7% karcinoma s relativno povoljnim ishodom (192). U istom istraživanju HER4 homodimer detektiran je u 9,9% karcinoma dojke s dobrom prognozom dok je HER4 u heterodimernim formama, pogotovo HER2/HER4 imao nepovoljni prognostički značaj. Prema rezultatima Machleidt i sur.

(218) u skupini HER2 pozitivnih bolesnica, HER4 receptor ima bolju prognozu samo u slučajevima pozitivnog statusa ER ali ne i u ER– skupinama. Prema Wangu i sur. (119) heterogenost rezultata izraženosti HER4 i njihovog nejasnog značaja nastaje zbog izoformi receptora koje imaju različite značaje pa i lokalizaciju. Prema njima citoplazmatska izraženosti HER4 je povezana s dužim preživljenjem bez povrata bolesti pogotovo u Luminalnim tumorima. Ta relacija je utvrđena na razini proteinske, ali ne i mRNA izraženosti što Das i sur. (217) objašnjavaju mehanizmom tumorskih stanica da epigenetskim utišavanjem promotora HER4 gena izbjegnu apoptozu.

Bolesnice s ranim rakom dojke nakon adjuvantne primjene trastuzumaba imaju petogodišnje preživljenje bez povrata bolesti veće od 50%, a oko 15% bolesnica pokazuje primarnu rezistenciju na trastuzumab. Kod bolesnica s metastatskim karcinomom dojke velika većina nije imala koristi od terapije pa je brza progresija bolesti zabilježena u više od 70% bolesnica, unatoč terapiji trastuzumabom (191).

Naše istraživanje na primarnim karcinomima dojke dokazalo je da većina bolesnica (82,9%) koje su imale korist od terapije trastuzumabom imaju aktivnu formu receptora HER2 (trastuzumab-senzitivni). U skupini bolesnica s pHER2– statusom i rezistencijom na trastuzumab, kod 75% bolesnica došlo je do progresije bolesti unutar 24 mjeseca od operacije pa možemo pretpostaviti da se radi o primarnoj rezistenciji. Te bolesnice imale su izražen, jedan ili oba receptora HER3 i HER4, sa smanjenom izraženošću ER i PR, prosječno manje od 20%. Kako je petogodišnje preživljenje bez znakova bolesti imalo samo 27% bolesnica s pHER2–/ER–, odnosno pHER2–/HER2 tipom, možemo pretpostaviti da su te bolesnice od samog početka primale neučinkovitu terapiju.

Prema literaturi, mehanizmi rezistencije na trastuzumab mogu biti primarni/intrinzički i sekundarni/stečeni te se razlikuju po dominantnim mehanizmima regulacije (219). Istraživanja pokazuju da primarnu/intrinzičku rezistenciju uzrokuje neaktivan HER2 receptor, a stanice su osjetljive na lapatinib tek u 37% slučajeva dok je kod sekundarne rezistencije aktivna forma HER2 i dalje prisutna, a stanice imaju korist od terapije lapatinibom (180, 220, 221). Mukherjee i sur. (222) su utvrdili da kod trastuzumab rezistentnih karcinoma nije došlo do inhibicije PI3K-Akt signalnog puta. Ti karcinomi imaju izražene HER3 receptore te HER2/HER3 heterodimera, a detektirali su i fosforilaciju HER3 koja je značajno povezana s heterodimerizacijom. HER3 ima sposobnost transfosforilirati HER2, ali zbog toga što sam nema kinaznu domenu njegova inhibicija je slabo učinkovita. Prisutnost liganda HRG aktivira PI3K-Akt signalni put preko

HER2/HER3, a tretiranje lapatinibom pokazalo je značajnu inhibiciju PI3K-Akt signalnog puta. Ritter i sur. (221) su pokazali da inducirane trastuzumab-rezistentne stanice u kulturi pokazuju visoku razinu fosforilacije HER1, HER1/HER2 heterodimera, te visoke razine faktora rasta TGF α , HB-EGF i HRG. Međutim, djelovanje lapatiniba je reverzibilno pa je učinak lijeka kratkotrajan. Inhibitori tirozin-kinaze druge generacije kao neratinib, afatinib i canertinib se ireverzibilno kovalentno vežu na cistein u aktivacijskoj domeni što dovodi do trajne inaktivacije. Nakashoji i sur. (165) su također potvrdili da je nakon neoadjuvantne kombinacije kemoterapija + trastuzumab + lapatinib ili pertuzumab patološki kompletni odgovor bolji nego nakon kemoterapija+trastuzumab modaliteta liječenja. Naravno, rezistencija na HER inhibitore može nastati i zbog mutacije u KRAS genu kao što su dokazali Stanley i sur. (164).

Sukladno rezultatima drugih istraživanja i mi smo utvrdili značajne razlike u dvije ključne skupine HER2 pozitivnih karcinoma: ER pozitivni (LumB/HER2+) i ER negativni (HER2+ tip). HER2 pozitivni ER negativni karcinomi uglavnom bolje reagiraju na terapiju trastuzumabom te je zabilježeno do čak 70% smanjenje rizika za povratak bolesti unutar pet godina (223). Poznato je da ER može biti posrednik u signalnim putevima odgovornim za rezistenciju na trastuzumab, a istovremeno dobrim odgovorom na endokrinu terapiju.

Pogue-Geile i sur. (224) su na osnovi Oncotype DX analize izraženosti 21 gena utvrdili nekoliko gena povezanih s HER2 (*ERBB2*, *c17ORF37*, *GRB7*) i ER (*ESR1*, *NAT1*, *GATA3*, *CA12*, *IGF1R*) koji su povezani s rezistencijom na trastuzumab. Rezultati njihovog istraživanja su utvrdili da karcinomi s jako izraženom mRNA ER receptora, ali umjereno izraženom mRNA HER2 receptora (amplifikacija prisutna), imaju najslabiju korist od terapije trastuzumabom. Također su potvrdili da ER nakon endokrine terapije inducira apoptozu preko Bcl-2 i IGF1R, a prekomjerna izraženost IGF1R heterodimerizira s HER1 i HER2 čime može direktno biti odgovoran za pojavu rezistencije na trastuzumab. Montemurro i sur. (225) sugeriraju da bi bolesnici s HER2+, a ER– (slabo izraženim) karcinomima mogle imati korist od terapije jednim blokatorom HER (trastuzumab ili pertuzumab) dok bi vjerojatno ER+ karcinomi trebali biti ciljani dvostrukom inhibicijom HER2 receptora kao što to navode mnoge nove studije.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je HER2 receptor uglavnom prisutan u svojoj aktivnoj/fosforiliranoj formi te predstavlja skupinu tumora većeg malignog potencijala a time pruža dodatne prognostičke informacije, pored izraženosti HER2 kao dosadašnjeg kliničkog standarda u određivanju terapije i prognoze. Istovremeno je pHER2 dobar

pokazatelj osjetljivosti karcinoma na ciljanu terapiju trastuzumabom te može pomoći u određivanju bolesnica koje će imati koristi od terapije trastuzumabom.

Neosporno je da terapija trastuzumabom ima učinak, ali je naše istraživanje dokazalo da i drugi receptori HER obitelji doprinose pojavi rezistencije na terapiju. Istovremena izraženost pHER2 i drugih HER receptora te njihova korelacija s pojavom rezistencije na trastuzumab upućuju na potrebu ranog uvođenja dualne terapije kod bolesnica s negativnim statusom pHER2, pogotovo u HER2 intrinzičkoj skupini. Dosadašnja saznanja i iskustva omogućila su razvoj mnogih lijekova čije kombinacije preciznije djeluju na biologiju svakog pojedinog karcinoma te bolju prognozu svake pojedine bolesnice. Očigledno je da uvođenje dualne (dvostruke) terapije blokatorima receptora HER obitelji ima dodatnu korist za bolesnice. U našim naporima da pronađemo biološku molekulu koja će jasno prognozirati korist od terapije trastuzumabom, ne smijemo zaboraviti da bolesnice ne mogu čekati rezultate tako složenih istraživanja koja još do danas nisu bliže rješenju.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja izraženosti fosforiliranog receptora HER2 (pHER2) i izraženosti ostalih receptora HER obitelji i njihove povezanosti s pojavom rezistencije na trastuzumab u skupini HER2 pozitivnih duktalnih invazivnih karcinoma dojke utvrdili smo:

- receptor HER2 uglavnom se nalazi u aktivnoj/fosforiliranoj formi (66,2% pHER2+)
- pozitivan pHER2 status pokazatelj je dobrog odgovora na terapiju trastuzumabom jer se progresija bolesti pojavila kod 17,1% bolesnica s pHER2+ karcinomima u odnosu na 47,6% bolesnica s pHER2– karcinomima ($P < 0,001$)
- izraženost pHER2 češća je u HER2 intrinzičkom tipu nego u LuminalB/HER2 pozitivnom tipu karcinoma (72,2% vs. 61,4%)
- najlošije preživljenje imaju bolesnice s negativnim pHER2 u HER2 intrinzičkoj skupini
- receptor HER3 pokazuje statistički značajnu korelaciju s pozitivnim pHER2 ($P = 0,013$)
- HER3 negativni, ali HER4 pozitivni karcinomi, češće su LumB/HER2 tipa
- rezistencija na trastuzumab registrirana je u 35,3% karcinoma s pHER2–/HER3+/HER4+

8. KRATKI SADRŽAJ

Oko 20-25% karcinoma dojke ima prekomjerno izražene receptore HER2, što doprinosi agresivnijem ponašanju tumora i lošijem tijeku bolesti. Uvođenjem anti-HER2 terapije primjenom trastuzumaba poboljšana je ishod bolesti i preživljenje bolesnica. Unatoč visokoj specifičnosti trastuzumaba, značajan dio bolesnica ne reagira na terapiju.

Receptori HER1, HER2, HER3 i HER4 pripadaju obitelji receptora za epidermalne faktore rasta. Vezanje faktora rasta na receptor aktivira proces dimerizacije članova HER obitelji te fosforilaciju na citoplazmatskom dijelu receptora, čime se aktivira signalni put.

Naše istraživanje provedeno je na 124 uzoraka HER2 pozitivnih karcinoma dojke s pretpostavkom da fosforilacija HER2 predstavlja pravi biljeg receptorske aktivnosti, a dimerizacija HER2 s ostalim receptorima HER doprinosi pojavi rezistencije na trastuzumab. U istraživanju smo koristili metodu imunohistokemijskog bojenja upotrebom primarnih protutijela na fosforilirani HER2 receptor i ostale receptore HER obitelji te istražili povezanost međusobne izraženosti i korelaciju s pojavom rezistencije/progresije bolesti.

Rezultati našeg istraživanja utvrdili su da se receptor HER2 uglavnom nalazi u fosforiliranom stanju (66,2% pHER2+), a pozitivan pHER2 status pokazatelj je dobrog odgovora na terapiju trastuzumabom ($P < 0,001$). Negativan status pHER2 je značajan u HER2 intrinzičkoj skupini gdje je 33,3% bolesnica imalo povrat bolesti. Receptori HER1, HER3 i HER4 su izraženi u 9,7%, 70,2% i 71% HER2 pozitivnih karcinoma, a istovremena izraženost pHER2 i HER3 pokazuje statistički značajnu korelaciju ($P = 0,013$). Bolesnice s negativnim pHER2, a pozitivnim HER3 ili HER4, imale su lošije preživljenje odnosno rezistencija je registrirana u 35,3% karcinoma s pHER2-/HER3+/HER4+.

Na osnovi naših rezultata možemo zaključiti da pozitivan fosforilacijski status HER2 određuje bolesnice koje će imati koristi od terapije trastuzumabom. Negativan status pHER2 upućuje na bolesnice kod kojih bi trebalo odmah uvesti dualnu terapiju, pogotovo u HER2 intrinzičkoj skupini karcinoma dojke.

Ključne riječi: fosforilirani HER2, HER1, HER3, HER4, rezistencija na trastuzumab, karcinom dojke

9. SUMMARY

PHOSPHORYLATED HER-2 RECEPTOR AS AN INDICATOR OF BREAST CANCER RESISTANCE TO TRASTUZUMAB

Snježana Ramić

Zagreb, 2018

About 20-25% of breast cancers have over-expressed HER2 receptor, leading to aggressive behavior of cancer and poor disease course. Implementing anti-HER2 therapy with trastuzumab improved disease outcome and survival of patients. Yet, a significant number of patients do not respond to therapy.

HER1, HER2, HER3 and HER4 receptors belong to the epidermal growth factor receptors family. Bonding of growth factor to the receptor activates dimerization of HER receptors, resulting in phosphorylation on cytoplasmic domain and activating the signaling pathway.

Our study was performed on 124 samples of HER2 positive breast cancer with the assumption that HER2 phosphorylation is a true marker of receptor's activity and that HER2 dimerization with other HER receptors contributes to the acquisition of trastuzumab resistance. We performed immunohistochemical staining using specific primary antibodies against phosphorylated HER2, HER1, HER3 and HER4, and investigated the correlation between their expression and correlation with the resistance.

Our results found that HER2 receptor is predominantly phosphorylated (66.2% pHER2+) and positive pHER2 status is a marker of a good response to trastuzumab ($P < 0.001$). Negative phosphorylated status of HER2 is significant in the HER2 intrinsic group where 33.3% of the patients had a disease recurrence. HER1, HER3 and HER4 receptors were expressed in 9.7%, 70.2% and 71% of HER2 positive carcinomas, retrospectively. Co-expression of pHER2 and HER3 showed a statistically significant correlation ($P = 0.013$). Patients with negative pHER2 and positive HER3 or HER4 had poor survival, and resistance was recorded in 35.3% of pHER2- /HER3+/HER4+.

We can conclude that the positive phosphorylation status of HER2 determines patients who will benefit from trastuzumab therapy. Negative status of pHER2 refers to patients who should undergo dual therapy in first line treatment, especially in the HER2 intrinsic breast cancer group.

Key words: phosphorylated HER2, HER1, HER3, HER4, trastuzumab resistance, breast cancer

10. POPIS LITERATURE

1. Speroff L, Glass RH, Kase NG, ur. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 5. izd. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
2. Hall JE, Guyton AC, ur. Guyton and Hall textbook of medical physiology. [Internet] 12. izd. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2011. [Pristupljeno: 31.12.2017]. Dostupno na: <http://jpkc.hactcm.edu.cn/2012yxslx/file/Textbook%20of%20Medical%20Physiology.pdf>
3. Duančić V, Posinovec J. Osnove histologije čovjeka. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga, 1990.
4. Polyak K. On the birth of breast cancer. Biochim Biophys Acta. 2001;1552:1-13.
5. Junqueira LC, Carneiro J. Ženski spolni sustav. U: Osnove histologije, udžbenik i atlas prema 10. američkom izdanju. Zagreb: Školska knjiga; 2005. str. 464-67.
6. Lynch PJ, medicinski ilustrator. Građa dojke [slika s interneta]. 2007. [pristupljeno 22.11.2017] Dostupno na: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Breast_anatomy_normal_scheme.png
7. Jakić-Razumović J. Bolesti dojke. U: Damjanov I, Jukić S, Nola M, ur. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str. 598-99.
8. Böcker W. Preneoplasia of the Breast: A New Conceptual Approach to Proliferative Breast Disease. Munchen: Saunders Elsevier; 2006.
9. National Cancer Institute USA: The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. [Internet]. [pristupljeno: 15.0.2018.]. Dostupno na: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>
10. Tavassoli FA, Devilee P, ur. World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics. Tumours of the breast and female genital organs. Lyon, France: IARC Press; 2003.
11. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, ur. World Health Organisation classification of tumours of the Breast. 4. izd. Lyon, France: IARC Press; 2012.
12. Cotran RE, Kumar V, Collins T, Robbins SL, ur. Robbins pathologic basis of disease. 6. izd. Philadelphia: Saunders; 1999.
13. Šamija M, Juzbašić S, Šeparović V, Vrdoljak D, ur. Tumori dojke. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.

14. Margaritoni M ml., ur. Rak dojke: fiziologija, patologija, prevencija, detekcija, terapija. Zagreb: Školska knjiga; 1993.
15. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C i sur. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210.
16. Tchou J, Morrow M. Available models for breast cancer risk assessment: how accurate are they? *J Am Coll Surg*. 2003;197:1029-35.
17. American cancer society. Breast cancer [Internet]. [Pristupljeno: 12.01.2018.] Dostupno na: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html>.
18. Khodarahmi M, Azadbakht L. The Association Between Different Kinds of Fat Intake and Breast Cancer Risk in Women. *Int J Prev Med*. 2014;5(1):6-15.
19. Michels KB, Mohllajee AP, Roset-Bahmanyar E, Beehler GP, Moysich KB. Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. *Cancer*. 2007;109:2712-49.
20. Pierce JP, Natarajan L, Caan BJ, Parker BA, Greenberg ER, Flatt SW i sur. Influence of a diet very high in vegetables, fruit, and fiber and low in fat on prognosis following treatment for breast cancer: the Women's Healthy Eating and Living (WHEL) randomized trial. *JAMA*. 2007;298:289-98.
21. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA i sur. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA*. 1998;279:535-40.
22. Tretli S. Height and weight in relation to breast cancer morbidity and mortality. A prospective study of 570,000 women in Norway. *Int J Cancer*. 1989;4:23-30.
23. Cleveland RJ, Eng SM, Abrahamson PE, Britton JA, Teitelbaum SL, Neugut AI i sur. Weight gain prior to diagnosis and survival from breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16:1803-11.
24. Greenwald P. The potential of dietary modification to prevent cancer. *Prev Med*. 1996;25:41-43.
25. Hulka BS, Liu ET, Lininger RA. Steroid hormones and risk of breast cancer. *Cancer*. 1994;74:1111-24.
26. Kumle M, Weiderpass E, Braaten T, Persson I, Adami HO, Lund E. Use of oral contraceptives and breast cancer risk: The Norwegian-Swedish Women's Lifestyle and Health Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11:1375-81.

27. Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA*. 2002;288:872-81.
28. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H i sur. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
29. Tokunaga M, Norman JE Jr, Asano M, Tokuoka S, Ezaki H, Nishimori I i sur. Malignant breast tumors among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-74. *J Natl Cancer Inst*. 1979;62:1347-59.
30. Bhatia S, Robison LL, Oberlin O, Greenberg M, Bunin G, Fossati-Bellani F i sur. Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1996;334:745-51.
31. Carmichael A, Sami AS, Dixon JM. Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionising radiation. *Eur J Surg Oncol*. 2003;29:475-79.
32. Palacios J, Robles-Frias MJ, Castilla MA, Lopez-Garcia MA, Benitez J. The molecular pathology of hereditary breast cancer. *Pathobiology*. 2008;75:85-94.
33. Levanat S, Levačić Cvok M. Molekularna osnova raka dojke vezana uz gene BRCA1 i BRCA2: karakteristike i ciljana terapija. *Liječ Vjesn*. 2010;132:34-7.
34. BRCA database. [Internet]. [Pristupljeno:12.11.2017.] Dostupno na: http://arup.utah.edu/database/BRCA/Home/BRCA1_landing.php.
35. Rebbeck TR. The contibution of inherited genotype to breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2002;4:84-8.
36. Borovečki A, Braš M, Brkljačić B, Canki-Klain N, Dedić Plavetić N, Grahovac B i sur. Smjernice za genetičko savjetovanje i testiranje na nasljedni rak dojke i jajnika. *Liječ Vjesn*. 2017;139:107–17.
37. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumors. *Nature*. 2012;490:61-70. doi:10.1038/nature11412.
38. Jemal A, Ward EM, Johnson CJ, Cronin KA, Ma J, Blythe Ryerson A i sur. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2014, Featuring Survival. *JNCI: J Natl Cancer Inst*. 2017;109(9):dix030. doi.org/10.1093/jnci/dix030.
39. Kelsey J., Horn-Rose P. Breast cancer: magnitude of the problem and descriptive epidemiology. *Epidemiol Rev*. 1993;15:7-16.

40. Boyle P, Autier P, Bertelink H, Baselga J, Boffetta P, Burn J i sur. European code against cancer and scientific justification: Third version (2003). *Ann Oncol.* 2003;14:973-1005. doi: 10.1093/annonc/mdg305.
41. Schulz WA, ur. *Molecular biology of human cancers*. Dordrecht: Springer; 2005.
42. Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. *Klinička onkologija*. Zagreb: Globus; 1996.
43. Cancer Research UK. Breast Cancer (C50): 2012-2014. [Internet]. [pristupljeno 22.11.2017]. Dostupno na: http://www.cancerresearchuk.org/sites/default/files/cstream-node/deaths_crude_f_breast_M14.pdf predicted.html
44. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak: Incidencija raka u Hrvatskoj 2014. Šekerija M, ur. [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2016: Bilten 39. [pristupljeno 29.01.2018.]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2014_final.pdf
45. Grgurević-Dujmić E, Janković S, Bobinac A. Značaj preventivne (screening) mamografije. [Internet]. Zagreb: Hrvatski časopis za javno zdravstvo; 2007;3(9). [pristupljeno 21.09.2017]. Dostupno na: <https://www.hcjz.hr/index.php/hcjz/article/download/2190/2163>
46. Castro NP, Osório CA, Torres C, Bastos EP, Mourão-Neto M, Soares FA i sur. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. *Breast Cancer Res.* 2008;10(5):R87. doi: 10.1186/bcr2157.
47. Džono-Boban A, Čale Mratović M, Mašanović M. Analiza rezultata mamografskog probira u Dubrovačko-Neretvanskoj Županiji 2006-2009. *Acta Med Croatica.* 2010;64:453-9.
48. Taghian AG, Smith BL, Erban JK, ur. *Breast cancer: A multidisciplinary approach to diagnosis and management (Current multidisciplinary oncology)*. New York: Demos Medical Publishing; 2009.
49. Esteva FJ, Hortobaghy GH. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004;6:109-18.
50. Sahin AA. Pathology of invasive breast cancer. U: Winchester DJ, Winchester DP, Hudis C, Norton L. *Breast Cancer*. PMPH-USA, 2006;198-201.
51. Pleotus Howel L, Gandour-Edwards R, O'Sullivan D. Application of the Scarff-Bloom-Richardson tumor grading system to fine-needle aspirates of the breast. *Am J Clin Pathol.* 1994;101:262-5.

52. Križanac Š: Invazivni duktalni karcinom. U: Fajdić J. i sur. ur.: Bolesti dojke. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 1998. str. 107-19.
53. Ellis IO, Galea M, Broughton N. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathol.* 1992;20:479-89.
54. Andea AA, Bouwman D, Wallis T, Visscher DW. Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer.* 2004;100:20-7.
55. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up. *Histopathol.* 1991;19:403-10.
56. Le Dousall V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, Brunet M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer.* 1989;64:1914-21.
57. Fletcher CDM. Diagnostic histopathology of tumors. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1995.
58. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ i sur. Breast Cancer - Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(4):290-303.
59. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V i sur. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010;12(4):207. doi: 10.1186/bcr2607.
60. Hadjioucas I, Bundred NI. Axillary surgery: is it necessary? *The Breast.* 2000;9:2-4.
61. Dobrila F, Strčić M, Lovasić F, Jurišić D. Uloga kirurškog odstranjenja aksilarnih limfnih čvorova kod operabilnog raka dojke. U: Prpić I, Unušić J, ur. Bolesti dojke: zbornik radova XI. znanstvenog sastanka „Bolesti dojke“. Zagreb, 2001;93-99.
62. Weaver DL. Sentinel lymph nodes and breast carcinoma. Which micrometastases are clinically significant? *Am J Surg Pathol.* 2003;27:842-45.
63. Gruber CJ, Tschugguel W, Scheenberger C, Huber JC. Production and action of estrogen. *N Engl J Med.* 2002;346:340-52.
64. Scawn R, Shousha S. Morphologic spectrum of estrogen receptor-negative breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(3):325-30.

65. Kreiger N, King WD, Rosenberg L, Clarke EA, Palmer JR, Shapiro S. Steroid receptor status and the epidemiology of breast cancer. *Ann Epidemiol.* 1991;1:513-23.
66. Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin.* 1997;47:28-51.
67. Elston CW, Ellis IO, Goulding H, Pinder SE. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. U: Elston CW, Ellis IO, ur: *The Breast*. London: Churchill Livingstone; 1998. str. 385-433.
68. Alvarez Goyanes RI, Escobar Perez X, Camacho Rodriguez R, Orozco Lopez M, Franco Odio S, Llanes Fernandez L i sur. Hormone receptors and other prognostic factors in breast cancer in Cuba. *MEDICC Rev.* 2010;12:36-40.
69. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. Seventh international conference on adjuvant therapy of primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19:3817-27.
70. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Ann Oncol.* 2009;20:1319-29.
71. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B i Panel sur. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-23.
72. Moinfar F. *Essentials of Diagnostic Breast Pathology*. Berlin: Springer; 2007. str. 2-23.
73. Shilling V, Jenkins V, Falowfield L, Howell T. The effects of hormone therapy on cognition in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;87:1-25.
74. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:463-75.
75. Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA i sur. Classical and novel prognostic markers for breast cancer and their clinical significance. *Clin Med Insights Oncol.* 2010;4:15-34.
76. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010;11:174-83.
77. Penault-Llorca F, Radosevich-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology.* 2017;49(2):166-71.

78. Urruticoechea A, Archer CD, Assersohn LA, Gregory RK, Verrill M, Mendes R, Walsh G, Smith IE, Johnston SR. Mitomycin C, vinblastine and cisplatin (MVP): an active and well-tolerated salvage regimen for advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;92:475-9.
79. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S i sur. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:5287-312.
80. Ács B, Zámbo V, Vízkeleti L, Szász AM, Madaras L, Szentmártoni G i sur. Ki-67 as a controversial predictive and prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Diagn Pathol*. 2017;12:20. doi:10.1186/s13000-017-0608-5.
81. Ellsworth RE, Ellsworth DL, Patney HL, Deyarmin B, Love B, Hooke JA, Shriver CD. Amplification of HER2 is a marker for global genomic instability. *BMC Cancer*. 2008;8:297. doi:10.1186/1471-2407-8-297.
82. Konecny GE, Slamon DJ. HER2 Testing and Correlation With Efficacy of Trastuzumab Therapy. [Internet]. 2002;16:11. [Pristupljeno 21.11.2017] Dostupno na: <http://www.cancernetwork.com/her2-positive-breast-cancer/her2-testing-and-correlation-efficacy-trastuzumab-therapy/page/0/1>
83. Moelans CB, de Weger RA, Van der Wall E, van Diest PJ. Current technologies for HER2 testing in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;80:380-92.
84. Europska agencija za lijekove. Uputa o lijeku: Herceptin. [Internet]. 2017. [pristupljeno 12.10.2017.] Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf
85. Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med*. 2005;353:1652-54.
86. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ i sur. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:118-45.
87. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH i sur. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997-4013.
88. Giordano SH, Temin S, Kirshner JJ, Chandarlapaty S, Crews JR, Davidson NE i sur. Systemic therapy for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-

- positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2014;32(19):2078-99. doi: 10.1200/JCO.2013.54.0948.
89. Nahta R, Esteva FJ. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res*. 2006;8(6):215. [Internet]. 2006. [pristupljeno 22.10.2017.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797036/>
 90. Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva F. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006;3:269-80.
 91. Hoff ER, Tubbs RR, Myles JL, Procop GW. HER2/neu amplification in breast cancer: stratification by tumor type and grade. *Am J Clin Pathol*. 2002;117:916-21.
 92. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Puzal L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. (2009): The HER-2 receptor and breast cancer: Ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*. 2009;14:320-368.
 93. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009;360:790-800.
 94. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H i sur. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*. 2001;98(19):10869-74. doi.org/10.1073/pnas.191367098.
 95. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015;5(10):2929-43. [Internet]. 2015. [pristupljeno 15.11.2017]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4656721/>
 96. Grigoryev Y. Komparativna genska hibridizacija, DNA micro array [slika s interneta]. 2011 Jul 15. [pristupljeno 10.12.2017.]. Dostupno na: <https://bitesizebio.com/7206/introduction-to-dna-microarrays/>
 97. Parise CA, Caggiano V. Breast cancer survival defined by the ER/PR/HER2 subtypes and a surrogate classification according to tumor grade and immunohistochemical biomarkers. *J Cancer Epidemiol*. 2014;469251. dx.doi.org/10.1155/2014/469251.
 98. de Ronde JJ, Hannemann J, Halfwerk H, Mulder L, Straver ME, Vrancken Peeters MJ i sur. Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;119(1):119-26. doi: 10.1007/s10549-009-0499-6.

99. Prat A, Carey LA, Adamo B, Vidal M, Tabernero J, Cortés J i sur. Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(8): dju152. doi: 10.1093/jnci/dju152.
100. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Vina JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev.* 2010;36:206-15.
101. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol.* 2014;5(3):412-24. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.412.
102. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K i sur. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11:5678-85.
103. Cejalvo JM, Martínez de Duenas E, Galvan P, García-Recio S, Burgues Gasi O, Pare L i sur. Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* 2017;77(9);2213–21. doi: 10.1158/0008-5472.
104. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RS, Deutsch M, Fisher ER i sur. Twenty-year follow-up of randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347:1233-41.
105. Cardoso F, Piccart MJ. The best use of chemotherapy in adjuvant setting. *Breast.* 2003;12:522-8.
106. Šamija M, ur. *Onkologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
107. Brown B. The role of receptor tyrosine kinase signaling in HER2-positive cells and trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer. Ph.D. thesis, Dublin City University. [Internet]. 2009. [pristupljeno 2. 12. 2010.]. Dostupno na: http://doras.dcu.ie/637/1/Brigid_Browne_2008.pdf
108. Mota JM, Collier KA, Barros Costa LR, Taxter T, Kalyan A, Leite CA i sur. A comprehensive review of heregulins, HER3, and HER4 as potential therapeutic targets in cancer. *Oncotarget.* 2017; 8(51):89284–306.
109. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2003;284:99-110.
110. Prenzel N, Zwick E, Leserer M, Ullrich A. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res.* 2000;2:184-90.

- 111.Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*. 2003;284:54-65.
- 112.Riese DJ 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays*. 1998;20:41-8.
- 113.Roskoski RJr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*. 2014;79:34-74.
- 114.Lemmon MA. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res*. 2009;315:638-48.
- 115.Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, Lemmon MA, Riese DJ 2nd. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther*. 2009;122(1):1-8. doi: 10.1016/j.pharmthera.
- 116.Arteaga CL, O'Neill A, Moulder SL, Pins M, Sparano JA, Sledge GW i sur. A phase I-II study of combined blockade of the ErbB receptor network with trastuzumab and gefitinib in patients with HER2 (ErbB2)-overexpressing metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6277-83.
- 117.Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:127-37.
- 118.Uberall I, Kolar Z, Trojanec R, Berkovcova J, Hajdich M. The status and role of ErbB receptors in human cancer. *Exp Mol Pathol*. 2008;84:79-89.
- 119.Wang J, Yin J, Yang Q, Ding F, Chen X, Li B i sur. Human epidermal growth factor receptor 4 (HER4) is a favorable prognostic marker of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(47):76693-703.
- 120.Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000;19:3159-67.
- 121.Hudelist G, Singer CF, Manavi M, Pischinger K, Kubista E, Czerwenka K. Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerization candidate in nodal-positive tumors. *Breast Cancer Res Treat*. 2003;80:353-61.
- 122.Hudelist G, Kostler WJ, Attems J, Czerwenka K, Muller R, Manavi M i sur. Her-2/neu-triggered intracellular tyrosine kinase activation: in vivo relevance of ligand-independent activation mechanisms and impact upon the efficacy of trastuzumab-based treatment. *Br J Cancer*. 2003;89:982-91.
- 123.Fry WH, Kotelawala L, Sweeney C, Carraway KL 3rd. Mechanisms of ErbB receptor negative regulation and relevance in cancer. *Exp Cell Res*. 2009;315:697-706.

124. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2003;284:99-110.
125. Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, Azzariti A, Bellizzi A, Paradiso A. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1766:120-39.
126. Guo L, Kozlosky CJ, Ericsson LH, Daniel TO, Cerretti DP, Johnson RS. Studies of Ligand-Induced Site-Specific Phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003;14:1022-31.
127. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M i sur. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol.* 2005;18:1027-33.
128. Koutras AK, Jeffry Evans TR. The epidermal growth factor receptor family in breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2008;1:5-19.
129. Badovinac-Crnjevic T, Jakic-Razumovic J, Podolski P, Pleština S, Sarčević B, Munjas R i sur. Significance of epidermal growth factor receptor expression in breast cancer. *Med Oncol.* 2011;28(1):121-8.
130. Gonzalez-Conchas GA, Rodriguez-Romo L, Hernandez-Barajas D, Gonzalez-Guerrero JF, Rodriguez-Fernandez IA, Verdines-Perez A i sur. Epidermal growth factor receptor overexpression and outcomes in early breast cancer: A systematic review and a meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2018;62:1-8.
131. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer.* 2001;37:9-15.
132. Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U i sur. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science.* 1985;229:976-78.
133. Montgomery RB, Makary E, Schiffman K, Goodell V, Disis ML. Endogenous anti-HER2 antibodies block HER2 phosphorylation and signaling through extracellular signal-regulated kinase. *Cancer Res.* 2005;65:650-56.
134. Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S i sur. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* 1996;16:5276-87.

135. Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF 3rd, Hynes NE. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8933-38.
136. Spears M, Taylor KJ, Munro AF, Cunningham CA, Mallon EA, Twelves CJ i sur. (2011): In situ detection of HER2:HER2 and HER2:HER3 protein-protein interactions demonstrates prognostic significance in early breast cancer. 2012;132(2):463-70. doi: 10.1007/s10549-011-1606-z.
137. Hoff ER, Tubbs RR, Myles J L, Procop GW. HER2/neu amplification in breast cancer: stratification by tumor type and grade. *Am J Clin Pathol*. 2002;117:916-21.
138. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist*. 1998;3:237-52.
139. Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, Meric-Bernstam F, Hunt KK, Dawood S i sur. Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res*. 2009;15:7381-88.
140. Sivarajan L, Sivarajan KM, Ntarelli J, Aijaz F. Change in HER-2/neu Status from Negative to Positive following Treatment in Breast Cancer: A Case Report. *Case Rep Oncol*. 2011;4:19-24.
141. Gollamudi J, Parvani JG, Schiemann WP, Vinayak S. Neoadjuvant therapy for early-stage breast cancer: the clinical utility of pertuzumab. *Cancer Manag Res*. 2016;8:21-31
142. Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*. 1997;389(6652):725-30.
143. Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R, Lemmon MA. "ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation". *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(17):7692-7.
144. Lemoine NR, Barnes DM, Hollywood DP, Hughes CM, Smith P, Dublin E i sur. Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer. *Br J Cancer*. 1992;66:1116-21.
145. Olsen DA, Ostergaard B, Bokmand S, Wamberg PA, Jakobsen EH, Jakobsen A i sur. HER1-4 protein concentrations in normal breast tissue from breast cancer patients are expressed by the same profile as in the malignant tissue. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47:977-84.
146. Ocana A, Vera-Badillo F, Seruga B, Templeton A, Pandiella A, Amir E. HER3 Overexpression and Survival in Solid Tumors: A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:266-73.

- 147.Desbois-Mouthon C. The HER3/ErbB3 receptor: a promising target in cancer drug therapy. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010;34:255-9.
- 148.Elenius K, Corfas G, Paul S, Choi CJ, Rio C, Plowman GD i sur. A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J Biol Chem*. 1997;272:26761-68.
- 149.Kainulainen V, Sundvall M, Maatta JA, Santiestevan E, Klagsbrun M, Elenius K. A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis. *J Biol Chem*. 2000;275:8641-9.
- 150.Jones FE. HER4 intracellular domain (4ICD) activity in the developing mammary gland and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008;13:247-58.
- 151.Silberberg G, Darvasi A, Pinkas-Kramarski R, Navon R. The involvement of ErbB4 with schizophrenia: association and expression studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141B(2):142-8.
- 152.Naresh A, Thor AD, Edgerton SM, Torkko KC, Kumar R, Jones FE. The HER4/4ICD estrogen receptor coactivator and BH3-only protein is an effector of tamoxifen-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2008;68:6387-95.
- 153.Junttila TT, Sundvall M, Lundin M, Lundin J, Tanner M, Harkonen P i sur. Cleavable ErbB4 isoform in estrogen receptor-regulated growth of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65:1384-93.
- 154.Bacus SS, Chin D, Yarden Y, Zelnick CR, Stern DF. Type 1 receptor tyrosine kinases are differentially phosphorylated in mammary carcinoma and differentially associated with steroid receptors. *Am J Pathol*. 1996;148:549-58.
- 155.Kew TY, Bell JA, Pinder SE, Denley H, Srinivasan R, Gullick WJ i sur. C-erbB-4 protein expression in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2000;82:1163-70.
- 156.Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, Willman K, Tierens A, Skovlund E i sur. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol*. 2002;196:17-25.
- 157.Göthlin Eremo A, Tina E, Wegman P, Stål O, Fransén K, Fornander T i sur. HER4 tumor expression in breast cancer patients randomized to treatment with or without tamoxifen. *Int J Oncol*. 2015;47(4):1311-20.
- 158.Suo Z, Emilsen E, Tveit KM, Nesland JM. Type 1 protein tyrosine kinases in benign and malignant breast lesions. *Histopathology*. 1998;33:514-21.

- 159.Sartor CI, Zhou H, Kozłowska E, Guttridge K, Kawata E, Caskey L i sur. HER4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2001;21:4265-75.
- 160.Fujiwara S, Yamamoto-Ibusuk M, Yamamoto Y, Yamamoto S, Tomiguchi M, Takeshita T i sur. The localization of HER4 intracellular domain and expression of its alternately-spliced isoforms have prognostic significance in ER+ HER2- breast cancer. *Oncotarget.* 2014;5(11):3919-30.
- 161.Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(7):422-39.
- 162.Kruser TJ, Wheeler DL. Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp Cell Res.* 2010;316:1083-1100.
- 163.Isakoff SJ, Baselga J. Trastuzumab-DM1: building a chemotherapy-free road in the treatment of human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29:351-4.
- 164.Stanley A, Hossein Ashrafi G, Seddon AM, Modjtahedi H. Synergistic effects of various Her inhibitors in combination with IGF-1R, C-MET and Src targeting agents in breast cancer cell lines. *Scientific Reports.* 2017;7:3964. doi:10.1038/s41598-017-04301-8.
- 165.Nakashoji A, Hayashida T, Yokoe T, Maeda H, Toyota T, Kikuchi M i sur. The updated network meta-analysis of neoadjuvant therapy for HER2-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2018;62:9-17.
- 166.Singh JC, Jhaveri K i Esteva FJ. HER2-positive advanced breast cancer: optimizing patient outcomes and opportunities for drug development. *Br J Cancer.* 2014;111:1888-98. doi:10.1038/bjc.2014.388.
- 167.Weiner LM, Adams GP. New approaches to antibody therapy. *Oncogen.* 2000;19:6144-51.
- 168.Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch B, Untch M, Smith I i sur. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:1659-72.
- 169.Baselga J. Clinical trials of Herceptin® (trastuzumab). *Eur J Cancer.* 2001;37(1):18-24.
- 170.Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;9:16-32.

- 171.Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW i sur. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*. 2003;421:756-60.
- 172.Giuliani R, Durbecq V, Di Leo A, Paesmans M, Larsimont D, Leroy J i sur. Phosphorylated HER-2 tyrosine kinase and Her-2/neu gene amplification as predictive factors of response to trastuzumab in patients with HER-2 overexpressing metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*. 2007;43:725-35.
- 173.Vu T, Claret XF. Trastuzumab: Updated mechanism of action and resistance in breast cancer. *Frontiers in Oncology*. *Front Oncol*. 2012;2:62. doi: 10.3389/fonc.2012.00062
- 174.Ping-Hui T, Wang Y, Weng S, Weng J, Chen C, Breggemeier RW i sur. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor. *Mol Pharmacol*. 2006;70:1534-41.
- 175.Nahta R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol*. 2012;2012:428062. doi: 10.5402/2012/428062.
- 176.Pegram M. (2008): Can we circumvent resistance to ErbB2 agents by targeting novel pathways? *Clinic Breast Cancer*. 2008;8(3):S121-3. doi.org/10.3816/CBC.2008.s.008
- 177.Du Manoir J, Francia G, Man Sh, Mossoba M, Medin J, Hicklin JD i sur. Strategies for delaying or treating in vivo acquired resistance to trastuzumab in human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res*. 2006;12:904-14.
- 178.Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 1996;13:63-72.
- 179.Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE i sur. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1673-84.
- 180.Ginestier C, Adélaïde J, Gonçalves A, Repellini L, Sircoulomb F, Letessier A i sur. ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene*. 2007;26:7163-69.
- 181.Zurrida S, Montagn E, Naninato P, Colleoni M, Goldhirsch A. Receptor status (ER, PgR and HER2) discordance between primary tumor and locoregional recurrence in breast cancer *Annals of Oncology*. 2011;22:479-91.

- 182.Thor AD, Liu S, Edgerton S, Moore D, Kasowitz KM, Benz CC i sur. Activation (tyrosin phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): a study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J Clinic Oncol.* 2000;18:3230-9.
- 183.Hudelist G, Kostler WJ, Czerwenka JK, Kubista E, Attems J, Muller R i sur. Her2/neu and EGFR tyrosine kinase activation predict the efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer.* 2006;118:1126-34.
- 184.DiGiovanna MP, Chu P, Davison TL, Howe CL, Carter D, Claus EB i sur. Active signaling by HER-2/neu in subpopulation of HER-2/neu overexpressing ductal carcinoma in situ: Clinicopathological correlates. *Cancer Res.* 2000;62:6667-73.
- 185.Nieto Y, Nawaz F, Jones RB, Shpall EJ, Nawaz S. Prognostic significance of overexpression and phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and presence of truncated EGFR in locoregionally advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:4405-13.
- 186.Cicenas J, Urban P, Kung W, Vuaroqueaux V, Labuhn M, Wight E i sur. Phosphorylation of tyrosine 1248-ERBB2 measured by chemiluminescence-linked immunoassay is an independent predictor of poor prognosis in primary breast cancer patients. *Eur J Cancer.* 2006;42:636-45.
- 187.Hayashi N, Iwamoto T, Gonzalez-Angulo AM, Ferrer-Lozano J, Lluch A, Niikura N i sur. Prognostic Impact of Phosphorylated HER-2 in HER-2 Primary Breast Cancer. *Oncologist.* 2011;16(7):956-65.
- 188.Singer CF, Gschwantler-Kaulich D, Fink-Retter A, Pfeiler G, Walter I, Hudelist G i sur. HER2 overexpression and activation, and tamoxifen efficacy in receptor-positive early breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135:807-13.
- 189.Wulfkuhle JD, Berg D, Wolff C, Langer R, Tran K, Illi J i sur. Molecular analysis of HER2 signaling in human breast cancer by functional protein pathway activation mapping. *Clin Cancer Res.* 2012;18(23):6426-35. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0452.
- 190.Ramić S, Asić K, Perić-Balja M, Paić F, Benković V, Knežević F. Correlation of phosphorylated HER2 with clinicopathological characteristics and efficacy of trastuzumab treatment for breast cancer. *Anticancer Res.* 2013;33(6):2509-15.
- 191.Martin-Castillo B, Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Moreno JM, Corominas-Faja B i sur. Basal/HER2 breast carcinomas. Integrating molecular taxonomy with cancer stem cell dynamics to predict primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle.* 2013;12(2):225-45.

192. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell JA, Rampaul RS, Blamey RW i sur. Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer*. 2004;91:1532-42.
193. Wiseman SM, Makretsov N, Nielsen TO, Gilks B, Yorida E, Cheang M i sur. Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival. *Cancer*. 2005;103:1770-7.
194. Sassen A, Rochon J, Wild P, Hartmann A, Hofstaedter F, Schwarz S i sur. Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2008;10:R2. doi.org/10.1186/bcr1843.
195. Bianchi S, Palli D, Falchetti M, Saieva C, Masala G, Mancini B i sur. ErbB-receptors expression and survival in breast carcinoma: a 15-year follow-up study. *J Cell Physiol*. 2006;206:702-8.
196. Park K, Han S, Shin E, Kim HJ, Kim JY. EGFR gene and protein expression in breast cancers. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33:956-60.
197. Walker RA, Dearing SJ. Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 1999;53:167-76.
198. Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev*. 1992;13:3-17.
199. Moller P, Mechttersheimer G, Kaufmann M, Moldenhauer G, Momburg F, Mattfeldt T i sur. Expression of epidermal growth factor receptor in benign and malignant primary tumours of the breast. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1989;414:157-64.
200. Choong LY, Lim S, Loh MC, Man X, Chen Y, Toy W i sur. Progressive loss of epidermal growth factor receptor in a subpopulation of breast cancers: implications in target-directed therapeutics. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:2828-42.
201. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z i sur. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5367-74.
202. Niwinska A, Olszewski W, Murawska M, Pogoda K. Triple-negative breast cancer with brain metastases: a comparison between basal-like and non-basal-like biological subtypes. *J Neurooncol*. 2011;105:547-53.
203. Sorkin A, Goh L K. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res*. 2009;315:683-96.

- 204.Naidu R, Yadav M, Nair S, Kutty MK. Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. *Br J Cancer*. 1998;78:1385-90.
- 205.Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol*. 2003;200:290-7.
- 206.Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA i sur. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene*. 1995;10:1813-21.
- 207.Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP i sur. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res*. 2008;68:5878-87.
- 208.Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM i sur. MM. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature*. 2007;445:437-41.
- 209.Garrett JT, Olivares MG, Rinehart C, Granja-Ingram ND, Sanchez V, Chakrabarty A i sur. Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:5021-26.
- 210.Pawlowski V, Revillion F, Hebbar M, Hornez L, Peyrat JP. Prognostic value of the type I growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res*. 2000;6:4217-25.
- 211.Vogt U, Bielawski K, Schlotter CM, Bosse U, Falkiewicz B, Podhajska AJ. Amplification of erbB-4 oncogene occurs less frequently than that of erbB-2 in primary human breast cancer. *Gene*. 1998;223:375-80.
- 212.Gilmour LM, Macleod KG, McCaig A, Gullick WJ, Smyth JF, Langdon SP. Expression of erbB-4/HER-4 growth factor receptor isoforms in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001;61:2169-76.
- 213.Sassen A, Diermeier-Daucher S, Sieben M, Ortmann O, Hofstaedter F, Schwarz S i sur. Presence of HER4 associates with increased sensitivity to Herceptin in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11:R50. doi: 10.1186/bcr2339.
- 214.Frogne C, Laenkholm AV, Lyng MB, Henriksen KL, Lykkesfeldt AE. Determination of HER2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors. *Breast Cancer Res*. 2009;11:1186-1200.

215. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hachitanda Y. Prognostic value of the combination of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in breast cancer. *Surgery*. 2003;133:219-21.
216. Liu B, Ordonez-Ercan D, Fan Z, Edgerton SM, Yang X, Thor AD. Downregulation of erbB3 abrogates erbB2-mediated tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2007;120:1874-82.
217. Das PM, Thor AD, Edgerton SM, Barry SK, Chen DF, Jones FE. Reactivation of epigenetically silenced HER4/ERBB4 results in apoptosis of breast tumor cells. *Oncogene*, 2010;29:5214-19.
218. Machleidt A, Buchholz S, Diermeier-Daucher S, Zeman F, Ortmann O, Brockhoff G. The prognostic value of Her4 receptor isoform expression in triple-negative and HER2 positive breast cancer patients. *BMC Cancer* 2013;13:437.
219. Osborne CK, Schiff R. Mechanism of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*. 2011;62:233–47.
220. O'Brien NA, Browne BC, Chow L, Wang Y, Ginther C, Arboleda J i sur. Activated phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling confers resistance to trastuzumab but not lapatinib. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(6):1489-502.
221. Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, Guix M, Dugger T, Engelman JA i sur. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res*. 2007;13(16):4909-19.
222. Mukherjee A, Badal Y, Nguyen XT, Miller J, Chenna A, Tahir H i sur. Profiling the HER3/PI3K Pathway in Breast Tumors Using Proximity-Directed Assays Identifies Correlations between Protein Complexes and Phosphoproteins. [Internet]. *PLoS One*. 2011;6(1):e16443. doi: 10.1371/journal.pone.0016443.
223. Krop IE, Burstein HJ. Trastuzumab: qui bono? *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(23):1772-5.
224. Pogue-Geile KL, Kim C, Jeong JH, Tanaka N, Bandos H, Gavin PG i sur. Predicting Degree of Benefit From Adjuvant Trastuzumab in NSABP Trial B-31. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(23):1782–88.
225. Montemurro F, Scaltriti M. Biomarkers of drugs targeting HER-family signalling in cancer. *J Pathol*. 2014;232:219-29. doi: 10.1002/path.4269.

11. ŽIVOTOPIS

Snježana Ramić je rođena 31. 01. 1969. godine u Vinkovcima. Osnovnu i srednju školu je završila u Zagrebu. Diplomirala je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, smjer molekularna biologija. Danas radi kao molekularni biolog u Odjelu za onkološku patologiju i kliničku citologiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ KBC „Sestre milosrdnice“.

Autor i koautor je 26 znanstvenih radova od kojih je 19 indeksirano u Current Contents te više od trideset kongresnih sažetaka indeksiranih u ostalim znanstvenim bazama.

Surađivala je na izradi mnogih diplomskih radova i nekoliko doktorskih disertacija. Asistent je u nastavi na kolegijima „Molekularna onkologija“ i „Molekularna patologija“ na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Član je Hrvatskog biološkog društva, Hrvatskog društva biologa u zdravstvu te pridruženi član Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog društva za patologiju i sudsku medicinu.

Udana je i majka troje djece.