# Ekspresija Nectin-4 proteina u luminalnim B, HER2 negativnim karcinomima dojke

**Rajc, Jasmina**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:312080

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Jasmina Rajc**

# Ekspresija Nectin-4 proteina u luminalnim B, HER2 negativnim karcinomima dojke

Doktorska disertacija

Osijek, 2017.

Mentor: prof. dr. sc. Damir Gugić, dr. med.

Rad ima 62 lista.

# SADRŽAJ

1. Uvod ..... 1
1.1. Epidemiologija i etiologija karcinoma dojke ..... 1
1.2. Podjela karcinoma dojke ..... 1
1.2.1. Histopatološka podjela ..... 2
1.2.2. TNM klasifikacija ..... 3
1.2.3. Molekularna klasifikacija (St. Gallen) ..... 5
1.3. Prognostički pokazatelji kod karcinoma dojke ..... 6
1.3.1. Veličina tumora ..... 6
1.3.2. Histološki gradus ..... 7
1.3.3. Status hormonskih receptora i HER2 ..... 7
1.3.4. Status pazušnih limfnih čvorova ..... 8
1.3.5. Dob ..... 8
1.4. Nectin-4 ..... 8
2. Hipoteza ..... 11
3. Cilj istraživanja ..... 12
4. Materijal i metode ..... 13
4.1. Materijal ..... 13
4.2. Imunohistokemijska analiza ..... 15
4.3. Statistička analiza ..... 16
5. Rezultati ..... 17
5.1. Patohistološke i kliničke karakteristike ispitivane skupine ..... 17
5.2. Korelacija ER, PR i Ki-67 s ostalim parametrima ..... 20
5.3. Raspodjela Nectin-4 proteina u ispitanoj skupini ..... 27
5.4. Usporedba Nectina-4 s ostalim patohistološkim i kliničkim karakteristikama ..... 28
5.5. Analize preživljenja (Kaplan-Meier i Cox regresijski model) ..... 32
6. Rasprava ..... 38
6.1. Nectin-4 u karcinomu dojke ..... 39
6.2. Luminalni B (HER2 negativni) tumori s niskim intenzitetom ER i PR ..... 40
6.3. Prognostička vrijednost ekspresije Nectina-4 ..... 43
6.4. Povezanost Nectina-4 s ostalim prognostičkim parametrima ..... 43
6.5. Nectin-4 kao tumorski biljeg u terapiji onkolitičkim virusima ..... 45
7. Zaključci ..... 47
8. Sažetak ..... 49

9. Summary ..... 50
10. Literatura ..... 51
11. Životopis ..... 61

# 1. Uvod

## 1.1. Epidemiologija i etiologija karcinoma dojke

Rak dojke još je uvijek najčešći zloćudni tumor ženske populacije u svijetu, stoga predstavlja važan javno zdravstveni problem (1). Prema podatcima Registra za rak Hrvatske (Hrvatski zavod za javno zdravstvo), stope incidencije i mortaliteta za rak dojke u Hrvatskoj, u stalnom su porastu posljednja dva desetljeća i rastu s dobi bolesnica, a karcinom dojke je u ženskoj populaciji na prvom mjestu i po incidenciji i po mortalitetu, u odnosu na druga primarna sjela malignih bolesti. Godišnje se u Hrvatskoj otkrije oko 1400 novih slučajeva, s tendencijom stalnog porasta, kao što je slučaj i u svijetu, a iz epidemioloških podataka vidljivo je da Hrvatska pripada zemljama visokog rizika za obolijevanje od raka dojke (1, 2).

Etiološki čimbenici vezani za nastanak raka dojke do danas nisu potpuno poznati, no epidemiološka istraživanja značajno ukazuju na tri moguće skupine genetičkih, endokrinih i vanjskih čimbenika (3, 4). Genetske promjene se primarno odnose na dokazane mutacije pojedninih gena (*BRCA1, BRCA2, ATM, CDH1, CHEK2, MRE11A, NBN, PALB2, PTEN, RAD50, RAD51C i TP53*), a bitna je i aktivacija protoonkogena HER2/neu. Zbog toga je oko 5-10 % karcinoma dojke naslijedno, a najveći rizik nose žene čije su majke imale obostrani karcinom dojke prije menopauze, i imaju rizik oko 9 puta veći od ostale populacije (5, 6).

Najčešće spominjani endokrini rizični čimbenici su: endogeni hiperestrinizam, dugo trajanje generativnog razdoblja (menarha prije 12 g. i menopauza nakon 50 g.), ukupno trajanje reprodukcijskog perioda, neplodnost, kasna dob pri rađanju prvog djeteta, gojaznost, uzimanje oralnih kontraceptiva i hormonsko nadomjesno liječenje (4,7–11)

Vanjski čimbenici vezani su za virusne infekcije, povećano konzumiranje alkohola, izloženost ionizacijskom zračenju (prirodnom i umjetnom), pušenje, dugotrajno bojenje kose i stres(12–14).

S druge strane, postoje slučajevi karcinoma dojke kod kojih se ne može dokazati utjecaj niti jednog od navedenih čimbenika.

## 1.2. Podjela karcinoma dojke

Brojne su klasifikacije zloćudnih tumora dojke. Pojedine klasifikacije odnose se na histpatološki izgled i karakteristike tumora (histopatološka), dok druge uzimaju uobzir

kliničke parametre u stupnju širenja bolesti (TNM). Najnovija molekularna istraživanja međutim, pridonijela su novim podjelama, a među njima se danas najčešće koristi tzv. St. Gallenska, u praksi prisutna unazad nekoliko godina. Sve podjele primarno u cilju imaju adekvatnan odabir onkološke terapije, koja je prilagođena pojedinim skupinama karcinoma, a trebala bi omogućavati dovoljno agresivnu terapiju za tumore koji to zahtjevaju, a također i spriječiti neželjene učinke onkološke terapije u pacijenata koji imaju šanse za bolji ishod bolesti i kod kojih takva terapija nije nužna. Sve klasifikacije uz to bi trebale imati i što točniju prognostičku vrijednost u odnosu na sveukupno preživljenje ili preživljenje bez povrata bolesti u određene skupine pacijentica bez terapije, odnosno predvidjeti vjerojatnost odgovora na specifično onkološko liječenje.

### 1.2.1. Histopatološka podjela

Postoje brojne klasifikacije karcinoma dojke u odnosu na histolopatolški izgled tumora, a jedna od najčešće upotrebljavanih je klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2012. godine (15) (tablica 1.1.)

Tablica 1.1. WHO klasifikacija (2012)

| |
|---|
| **Neinvazivni**<br>**1. Intraduktalni karcinom**<br>**2. Intraduktalni papilarni karcinom**<br>**3. Lobularni karcinom in situ** |
| |
| **Invazivni**<br>**1. Invazivni duktalni karcinom – bez posebnih karakteristika ( NOS)**<br>**2. Invazivni lobularni karcinom**<br>**3. Medularni karcinom**<br>**4. Koloidni karcinom (mucinozni karcinom)**<br>**5. Pagetova bolest**<br>**6. Tubularni karcinom**<br>**7. Adenoidni cistični karcinom**<br>**8. Invazivni komedo karcinom**<br>**9. Apokrini karcinom**<br>**10. Invazivni papilarni karcinom** |

Najčešći patohistološki tip karcinoma dojke je invazivni duktalni karcinom (preko 80 % svih karcinoma dojke), zatim slijede, po učestalosti, invazivni lobularni (10 %) pa medularni karcinom (5 %).

Treba spomenuti i histopatološko stupnjevanje karcinoma dojke Nottinghamskim sustavom stupnjevanja (modifikacija Scarff-Bloom- Richardson sustava prema Elston-Ellisu), koje pokazuje način rasta duktalnog invazivnog karcinoma i citološke osobine diferenciranosti (tablica 1.2.) (16).

Tablica 1.2. Nothinghamski sustav stupnjevanja (modificiran prema Elston-Ellisu)

| **Stvaranje žlijezda** | **Pleomorfizam jezgara** | **Mitoze/ 10 hpf** |
|---|---|---|
| **1-Više od 75 %** | 1-Blaga polimorfija | 1-Manje od 9 |
| **2-10-75 %** | 2-Umjerena polimorfija | 2-10-19 |
| **3-Manje od 10 %** | 3-Izrazita polimorfija | 3-više od 20 |
| | | |
| **Nakon zbrajanja bodova svih parametara određuje se stupanj diferenciranosti po sljedećoj shemi:**<br>**G1 Dobro diferenciran (3-5 bodova)**<br>**G2 Umjereno diferenciran (6-7 bodova)**<br>**G3 Slabo diferenciran (8-9 bodova)** | | |

### 1.2.2. TNM klasifikacija

Za prognozu i liječenje raka dojke, osim histopatološke slike, važno je znati i klinički stupanj proširenosti tumora. Danas je prihvaćena TNM klasifikacija UICC (International Union against Cancer) koja je rezultat kliničkog, radiološkog i laboratorijskog pregleda (tablica 1.3.) (17).

Tablica 1.3. TNM klasifikacija raka dojke

| |
|---|
| **Tx Primarni tumor se ne može dokazati** |
| **T0 Nepalpabilan tumor** |
| **Tis Preinvazivni rak (carcinoma in situ), neinfiltrirajući intraduktalni rak ili Pagetova bolest bradavice bez znakova tumora** |
| **T1 Tumor s najvećim promjerom do 2 cm** |
| **T1a Tumor s najvećim promjerom do 0,5 cm** |
| **T1b Tumor s najvećim promjerom između 0,5 i 1 cm** |
| **T1c Tumor s najvećim promjerom između 1 i 2 cm** |
| **T2 Tumor s najvećim promjerom između 2 i 5 cm** |
| **T3 Tumor s najvećim promjerom većim od 5 cm** |
| **T4 Tumor bilo koje veličine s direktnim širenjem na zid prsnog koša ili kožu (Zid prsnog koša obuhvaća: rebra, interkostalnu muskulaturu i musculus serratus anterior, ali ne i pektora-lni mišić)** |
| **T4a Zahvaćen zid prsnog koša** |
| **T4b Edem, prožimanja ili ulceracija kože dojke (uključujući i peau d'orange) ili okolni kožni čvorići, u području iste dojke** |
| **T4c Obuhvaća T4a i T4b** |
| **T4d Upalni karcinom** |
| **PNx Regionalni limfni čvorovi se ne mogu odrediti** |
| **pN0 Reg. Limfni čvorovi nisu zahvaćeni** |
| **pN1 Istostrani pazušni limfni čvorovi su zahvaćeni i pomični** |
| **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)** |
| **pN1a mikrometastaze, manje 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 prelazi kapulu limfnog čvora i manji je od 2 cm** |
| **pN1bIV metastaze u limfnom čvoru veličine 2 cm ili veće** |

### 1.2.3. Molekularna klasifikacija (St. Gallen)

St. Gallen konsenzus jedan je od najutjecajnijih stručnih i znanstvenih skupova vezanih za područje karcinoma dojke koji donosi novu podjeliu karcinoma dojke, baziranu na molekularnoj analizi, s obzirom na profil ekspresije određenih gena (18–20). S obzirom na intrinzičku listu gena razlikuju se luminalni podtipovi (A,B), HER2 podtip te trostruko negativni podtip karcinoma. Luminalni podtipovi (A i B) obilježeni su ekspresijom gena povezanih s luminalnim epitelnim stanicama normalnog tkiva dojke, i unatoč tome što su u obje skupine pozitivni ER i PR receptori, između njih je značajna razlika. Luminal A karcinomi čine oko 40 % svih karcinoma dojke i prognostički su najpovoljniji. Obilježeni su visokom ekspresijom ER skupine gena te niskom ekspresijom gena HER2 skupine i skupine povezane s proliferacijom (21). Luminal B najheterogenija su skupina, čine oko 20 % tumora dojke, s nešto nižom ekspresijom ER skupine gena, varijabilnom eskpresijom HER2 skupine i višom ekspresijom proliferacijske skupine. Ovi tumori imaju lošiju prognozu od onih u luminalnoj A podskupini (22). HER2 podtip obuhvaća oko 10 % do 15 % karcinoma dojke. U ovoj skupini karakteristična je visoka ekspresija HER2 i proliferacijske skupine gena te niska ekspresija luminalne i bazalne skupine. Trostruko negativi podtip obuhvaća oko 15-20 % karcinoma dojke, a povezan je s ekspresijom gena bazalnih epitelnih stanica normalnog tkiva dojke (zbog čega se u pojedinim nomenklaturama naziva i „basal like“). U ovoj podskupini ekspresija luminalne i HER2 skupine gena je niska (21).

Ova je podjela, usvojena na prethodno spomenutom St. Gallenskom konsenzusu, važna jer osim što donosi smjernice za liječenje, objedinjuje značajnije prognostičke čimbenike i na temelju njih određuje rizične skupine bolesnica kod kojih se preporuča provesti određena vrsta terapije.

Budući da je genetsko testiranje nedostupno većini bolesnica s karcinomom dojke zbog visoke cijene, na St. Gallenskoj konferenciji iz 2011. (a s manjim izmjenama potvrđenom na konferencijama 2013. i 2015.) postignut je konsenzus za nadomjesnu klasifikaciju temeljenu na receptorskom statusu, ekspresiji HER2 onkogena i proliferacijskog indeksa Ki-67, koji mogu biti određeni i imunohistokemijskom metodom.( tablica 1.4.)

Tablica 1.4. St Gallenska (molekularno bazirana) klasifikacija karcinoma dojke

| **Luminal A** | **Luminal B HER2 pozitivni** | **Luminal B HER2 negativni** | **HER2 pozitivni** | **Triple negativni** |
|---|---|---|---|---|
| ER i PR pozitivni≥20% | ER i/ili PR pozitivni | ER i/ili PR pozitivni | ER/PR negativni | ER/PR negativni |
| HER2 Negativan | HER2 pozitivan | HER2 negativan | HER2 pozitivan | HER2 negativan |
| Ki 67<20 % | Ki 67 bilo koji | Ki67≥20%(osim kod PR<20%) | Ki 67 bilo koji | Ki 67 bilo koji |

### 1.3. Prognostički pokazatelji kod karcinoma dojke

Prognostički pokazatelji su mjere dostupne u vrijeme operativnog zahvata povezane s preživljenjem u odsustvu adjuvantne terapije, odnosno mjere povezane s prirodnim tijekom bolesti. Prognostički čimbenici imaju prediktivnu ulogu jer su povezani s odgovorom na primjenjenu terapiju te omogućuju odabir odgovarajuće terapije za pojedinog pacijenta. U prognostičke čimbenike ubrajaju se veličina tumora, histološki podtip, histološki gradus, status pazušnih limfnih čvorova, Ki-67 proliferacijski indeks, status hormonskih receptora i dob bolesnice.

#### 1.3.1. Veličina tumora

Veličina tumora važan je prognostički čimbenik. Mjeri se kao najveći promjer invazivne komponente (23, 24). Veličina tumora je prognostički značajno povezana s statusom limfnih čvorova pazuha te je kod tumora manjih od 1 cm, s negativnim pazušnim limfnim čvorovima, desetogodišnje preživljenje 88 %. Postoji linearan odnos između preživljenja bolesnica i veličine tumora. Bolesnice s manjim tumorima imaju bolju prognozu, a stope petogodišnjeg preživljenja su 99 % za tumore manje od 1 cm, 91 % za tumore 1-2 cm, 80 % za tumore veličine 2-5 cm i 63 % za tumore veće od 5 cm (25). Kod bolesnica s negativnim pazušnim limfnim čvorovima, veličina tumora je najsnažniji prognostički faktor i rutinski se koristi za donošenje odluka o adjuvantnoj terapiji.

### 1.3.2. Histološki gradus

Histološki gradus odnosi se na histološki stupanj diferenciranosti tumora. Prognostička vrijednost histološkog gradusa neovisna je o veličini tumora i zahvaćenosti limfnih čvorova pazuha. Za određivanje histološkog gradusa tumora, danas se najviše koristi Nottinghamski sustav stupnjevanja karcinoma dojke ( modifikacija Scarff-Bloom- Richardson sustava prema Elston-Ellisu) (tablica 1.2.) (16). Tumori nižeg histološkog gradusa imaju bolju prognozu te je 10-godišnje preživljenje 90-94 % za pacijente s najnižim brojem bodova, a 30-78 % s najvišim brojem bodova (26–28). Zbog prognostičkog značenja histološkog gradusa, njegovo određivanje prvenstveno se koristi za donošenje odluka o terapiji kod pacijenata s negativnim pazušnim limfnim čvorovima i granično velikim tumorom. Tako pacijenti s veličinom tumora od 0,6-1,0 cm, uz negativne pazušne limfne čvorove imaju nepovoljniju prognozu ukoliko imaju viši histološki gradus (gradus 3), te je prema smjernicama Nacionalne sveobuhvatne mreže za rak (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) u toj skupini opravdana primjena adjuvantne kemoterapije (29).

### 1.3.3. Status hormonskih receptora i HER2

Estrogenski i progesteronski receptori rutinski se u karcinomima dojke određuju posljednjih tridesetak godina i, osim što daju informaciju o hormonskoj ovisnosti tumora, imaju važnu prediktivnu vrijednost. Bolesnice s karcinomima pozitivnim na ER imaju bolje petogodišnje preživljenje od bolesnica s ER negativnim karcinomima (92 % u odnosu na 66 %).

Mnogo češće se ER i PR koriste kao prediktivni čimbenici za procjenu potencijalne koristi od adjuvantne terapije tamoksifenom, jer hormonski poztivni tumori bolje reagiraju na kemoterpiju od onih koji imaju negativne ili slabije pozitivne hormone. Primjena tamoksifena u trajanju od pet godina smanjuje rizik od povrata bolesti za 47 % i mortalitet za 26 % u bolesnica s pozitivnim ER. Nadalje, tumori s pozitivnim estrogenskim i progesteronskim receptorima (ER+PR+) reagirat će na hormonsku terapiju u 78 % bolesnica, ER+PR- tumori u 34 % bolesnica, a ER-PR+ tumori reagirat će u 45 % bolesnica.

HER2 je receptor tirozin kinaze koji se nalazi na površini stanice, i pozitivan je u oko 25 % karcinoma dojke. Ekspresija ovog receptora povezana je s agresivnijim kliničkim tijekom bolesti, bržim rastom tumora, većim rizikom za pojavu metastaza i lošijom

prognozom kod pacijenata s pozitivnim limfnim čvorovima, dok je njegov prognostički utjecaj u pacijenata s negativnim limfnim čvorovima varijabilniji (30–33).

### 1.3.4. Status pazušnih limfnih čvorova

Status je limfnih čvorova prema rezultatima mnogih objavljenih studija vrlo važan prognostički čimbenik. Osim broja zahvaćenih limfnih čvorova, za prognozu je bitan i proboj tumora van kapsule limfnog čvora (34).

Pacijenti s zahvaćenim pazušnim limfnim čvorovima imaju 4-8 puta veću smrtnost od onih s negativnim limfnim čvorovima (35).

Uočena je i snažna povezanost između broja zahvaćenih pazušnih limfnih čvorova i rizika od razvoja metastatske bolesti. Petogodišnje preživljenje bez zahvaćenih limfnih čvorova je 82,8 %, u usporedbi s 73 % s 1-3 zahvaćena limfna čvora, 45,7 % sa 4-12 zahvaćenih limfnih čvorova te 28,4 % za pacijente s više od 12 zahvaćenih limfnih čvorova (36). Kod pacijenata s zahvaćenim pazušnim limfnim čvorovima predviđena je adjuvantna sistemna terapija, dok se u onih s negativnim limfnim čvorovima za odluku o adjuvantnoj sistemnoj terapiji procjenjuju i ostali prognostički parametri (dob, veličina tumora, histološki gradus).

### 1.3.5. Dob

Mlađe bolesnice (<35 godina) imaju značajno lošiju prognozu. Karcinomi dojke u ovoj populaciji češće su većih dimenzija, visokog gradusa, negativnih ER i pozitivnih pazušnih limfnih čvorova.

## 1.4. Nectin-4

Nectini su od nedavno istraživane adhezijske molekule koje pripadaju imunogobulinima (Ig SF) i odgovorni su za stanično staničnu adheziju (43), staničnu polarizaciju (44), diferencijaciju (45), kretanje (46) i proliferaciju (47, 48). Nectini su transmembranski proteini, imaju tri imunoglobulin nalik ekstracelulane domene V-C-C tipa, a vezani su za F-actin preko kompleksa AF-6/Afadina i Catenina, (49, 50).

Do sada su opisana četiri Nectina: Nectin-1 i Nectin-2 su široko rasprostranjeni u tkivu odraslih, Nectin-3 se najvećim djelom nalazi u tkivu testisa i posteljice, dok je Nectin- 4 prisutan uglavnom tijekom embriogeneze u tkivu embrija i posteljice (43). Vrlo blaga ekspresija Nectina-4 dokazana je unatrag nekoliko godina u epitelu dišnog sustava odraslih, dok je razina u serumu nedetektabilna.

Unazad nekoliko godina ekspresija Nectina -4 dokazana je u određenim karcinomima (dojka (51), jajnik (52) i pluca (53)), te se istražuje kao tumor antigen koji je u ovim karcinomima povezan s lošijom prognozom (54). Prema podatcima iz literature oko 61 % duktalnih invazivnih te oko 6 % lobularnih invazivnih karcinoma dojke je pozitivno na Nectin-4, a u dosadašnjim studijama pozitivitet je u većem postotku prisutan unutar hormonski negativnih tumora (55). Fabre-Lafay i autori (55) i Takano i autori (53) dokazali su da se Nectin-4 može detektirati u serumu ELISA metodom kod karcinoma dojke i pluća (54, 55).

Osim ovih kliničkih studija, nekoliko nedavnih bazičnih studija otkriva potencijalnu ulogu i funkciju Nectina-4 u tumorskoj biologiji (49, 52, 55, 56). Jedna od tih studija pokazala je da Nectin-4 pridonosi rastu i proliferaciji stanica preko Rac-1 signalnog puta u plućnim adenokarcinomima (53). Dokazano je i da Nectin-4 potiče međusobno vezanje stanica kod karcinoma dojke „in vitro“, a supresijom Nectina-4 putem intravenskog ubrizgavanja anti-Nectin-4 monoklonalnog antitijela, inhibiran je rast tumora i smanjen međustanični kontakt kod staničnih kultura karcinoma dojke „in vivo“ (57). S obzirom da drugi Nectini imaju važnu ulogu u stečenom imunitetu i angiogenezi (58–63), moguće je da i Nectin-4 ima još brojne za sada neotkrivene funkcije.

Uz navedeno, vrlo je važna funkcija svih Nectina kao receptora za određene viruse. Tako je dokazano da Nectin-1 služi kao receptor za sve do sada testirane vrste herpes virusa uključujući i herpes simplex virus (HSV tip 1 i HSV tip 2), i virus pseudorabijesa, te da omogućuje ulazak virusa u stanicu kao i širenje virusa na druge stanice (64, 65). Pri tome, varijabilna (V) domena Nectina-1 igra centralnu ulogu u interakciji sa glikoproteinom D, sastavnim djelom pojedinih virusa (HSV-a, pseudorabijesa, i bovinog herpes virusa -1) (66, 67).

Nectin-4, nazvan još i PVRL-4 (poliovirus -like -receptor-4), je homologan s receptorom za polio virus (PVR/CD155) i ima važnu ulogu prilikom ulaska ovog virusa u stanicu (68, 69). Međutim, u novije vrijeme još je važnija njegova uloga kao receptora za virus ospica koji pripada rodu Morbillivirus u porodici Paramyxoviridae. Do sada su poznata 24 genotipa virusa ospica svrstana u 8 grupa koje su imenovane abecednim redom (A, B, C, D, E, F, G i H).

Divlji tip virusa ospica veže se i inficira limfocite preko receptora CD150 (SLAM). Virus ospica poznat je po izazivanju infekcije epitelnih stanica gornjeg respiratornog sustava te pluća, ali su virusni receptori na ovim stanicama do nedavno bili nepoznati.

Dokazano je da Nectin-4 jedan od ovih receptora (70) i preko svoje varijabilne (V) domene omogućuje pripajanje virusa, njegov ulazak i izlazak iz stanice.

U novijim kliničkim studijama, genetski modificiran divlji tip virusa ospica pokazuje dobru onkolitičku aktivnost, bez utjecaja na zdravo tkivo i unatoč provedenoj imunizaciji velikog postotka populacije, a svoje djelovanje ostvaruje ulaskom u stanicu preko Nectin-4 (PVRL-4) receptora.

## 2. Hipoteza

Luminal B (HER2 negativni) karcinomi, koji imaju visoku Ki-67 proliferacijsku aktivnost te slabiji intenzitet estrogenskih i progesteronskih receptora, u većoj su mjeri pozitivni na Nectin-4 protein i imaju lošiju prognozu, odnosno ishod bolesti.

## 3. Cilj istraživanja

Opći cilj ove retrospektivne studije je:

- Dodatno istražiti skupinu luminal B (HER2 negativnih) karcinoma dojke.

Specifični ciljevi su:

- Podijeliti luminalne B (HER2 negativne) karcinome u podskupine s obzirom na Ki-67 proliferacijsku aktivnost, pozitivitet estrogenskih i progesteronskih receptora, a u korelaciji s ekspresijom Nectin-4 proteina, i izdvojiti skupinu s lošijim ishodom bolesti.
- Istražiti prognostičku vrijednost Nectin-4 proteina u luminalnim B (HER2 negativnim) karcinomima dojke u odnosu na sveukupno preživljenje i preživljenje bez povrata bolesti
- Ispitati povezanost ekspresije Nectin-4 proteina s ostalim kliničkim i patohistološkim karakteristikama tumora.

## 4. Materijal i metode

### 4.1. Materijal

Ovom retrospektivnom studijom obuhvaćeno je 147 pacijenata s invazivnim karcinomom dojke, koji su operirani na Zavodu za torakalnu kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Osijek, u razdoblju od 2006. do 2008. godine, a dijagnoza invazinog karcinoma dojke potvrđena je patohistološkim pregledom na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBCO.

Iz istraživanja su isključeni pacijenti koji su u trenutku operacije imali dokaz postojanja udaljenih metastaza.

Kao materijal su korišteni arhivski uzorci u vidu parafinskih kocaka, hemalaun-eozinskih i imunohistokemijskih stakala, pohranjeni na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBCO. Svi uzorci dobiveni operativnim zahvatom u navedenom razdoblju bili su tijekom patohistološke dijagnostike obrađeni prema standardnom protokolu: tkivo je bilo fiksirano u 10 % puferiranom formalinu, uklopljeno u parafinske blokove koji su potom rezani na debljinu do 4 μm, deparafinizirani i bojeni hemalaun-eozininom (H-E). Na ovim uzorcima bilo je izvršeno imunohistokemijsko bojanje estrogenskih receptora (ER) (Confirm anti-estrogene receptor (clone SP1)), progestronskih receptora (PR) (Confirm anti-progesterone Receptor (clone 1E2), Ki-67 proliferacijskog indexa (Confirm anti-Ki-67 (clone 30-9)) i HER2 receptora (Pathwayanti HER-2/neu (clone 4B5)) (VENTANA, Rosche).
Izvršena je reevaluacija svih opisanih uzoraka na slijedeći način:
Histološki tip tumora je određen sukladno klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2012. godine (15) (tablica1.1.).

Prema veličini i statusu pazušnih limfnih čvorova, tumori su podijeljeni u skupine temeljene na TNM klasifikaciji dojke (tablica 1.3.) (17). Tumori su svrstani u skupine veličine do 0,5 cm (T1a), 0,5-1 cm (T1b), 1-2 cm (T1c), 2-5 cm (T2) i veće od 5 cm (T3). Prema statusu pazušnih limfnih čvorova, tumori su podijeljini u skupine s negativnim (pN0) i pozitivnim limfnim čvorovima. Tumori s pozitivnim limfnim čvorovima su dodatno podijeljeni prema broju zahvaćenih limfnih čvorova u skupinu s 1-3 limfna čvora (pN1), 4-9 (pN2) i 10 ili više zahvaćenih limfnih čvorova (pN3).

Histološki gradus je određen na temelju modifikacije Scarff-Bloom-Richardson metode po Elstonu i Ellisu (16) kojom se tri osobine tumora (formiranje tubula, nuklearni pleomorfizam i broj mitoza) boduju s 1-3 boda. Na temelju ukupnog broja bodova se određuje

histološki gradus, pri čemu su tumori s 3-5 bodova svrstani u gradus 1, 6-7 bodova u gradus 2, a 8-9 bodova u gradus 3 ( tablica 1.2.).

Pozitivna ekspresija HER2 određena je semikvantitativno prema intenzitetu bojenja i postotku obojenih tumorskih stanicana na slijedeći način: 0 – nema membranskog bojanja, 1+ - slabo i djelomično membransko bojanje prisutno u >10 % tumorskih stanica, 2+ - slabo do umjereno membransko bojenje u >10 % tumorskih stanica, 3+ - jako bojanje cijele membrane koje se nalazi u > 10 % tumorskih stanica (71). Nalazi 0 i 1+ kategorizirani su kao negativni, nalaz 2+ kao dvosmislen, a samo nalaz 3+ kao pozitivan, odnosno kao prekomjerna ekspresija HER2 proteina. Kod uzoraka s dvosmislenim nalazom (2+) dodatno je primjenjena metoda in situ hibridizacije, (SISH, prema engl. Silver In Situ Hybridisation) kako bi se identificirali tumori koji pokazuju amplifikaciju HER2 gena.

Evaluacija hormonskih receptora (ER i PR) učinjena je putem Allredove metode (72), unutar koje se procjenjuje postotak pozitivnih stanica (0 - nema pozitivnih stanica, 1 = 1 %, 2 = 2-10 %, 3 = 11-33 %, 4 = 34-66 %, 5 = >67 %), kao i intenzitet pozitiviteta (0 - nema, 1 = slabi, 2 = umjereni, 3 = jaki). Ove dvije dobivene vrijednosti potom se zbrajaju, s dobivenim rezultatom 0-8.

Procjena postotka Ki-67 proliferacijske aktivnosti učinjena je skuladno smjernicama Internacionalne radne skupine za karcinome dojke iz 2011. godine (73). Za potrebe ove studije prilikom statističke obrade Ki-67 proliferacijski indeks je podijeljen u tri podskupine (20-30 %; 31-40 % i 41-100 %).

Također, u skladu s preporukama St. Gallenske konferencije iz 2013. godine, a koja je potvrđena na konsensusu 2015 (74), na temelju receptorskog statusa, proliferacijskog indeksa Ki-67 i ekspresije HER 2 napravio se ciljani odabir podtipa luminlnih B (HER2 negativnih) tumora dojke.

Na Zavodu za radioterapiju i onkologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek pregledana je medicinska dokumentacija liječenih bolesnica te su izvađeni podatci o dobi, TNM klasifikaciji, terapiji, vremenu do progresije te sijelu prve metastaze, u vremenskom razdoblju od 10 godina tijekom kojih su bolesnice kontrolirane i liječene.

Podaci o sveukupnom preživljenju realizirani su u suradnji s Policijskom upravom Osječko-baranjske županije.

### 4.2. Imunohistokemijska analiza

Za imunohistokemijsku analizu upotrijebljeno je monoklonalno protuijelo anti-Nektin-4/PVRL4 metodom peroksidaze-antiperoksidaze (PAP metoda) (75). Iz arhiviranih parafinskih kocaka učinjeni su rezovi debljine 4-µm koji su potom deparafinizirani u ksilolu te postupno rehidrirani kroz nizove alkohola (70 %-100 %). Nakon toga rađena je enzimatska digestija, odnosno razotkrivanje epitopa na pH6, u uređaju PT LINK-u (DAKO, Copenhagen, Denmark), a potom se, nakon ispiranja redestiliranom vodom, materijal uložio u automatizirani Autostainer (DAKO). Preparati su se inkubirali 5 minuta u peroksidaza bloking reagensu (Blocking Reagent), a nakon ispiranja u reakcijskom puferu na sobnoj temperaturi upotrijebljeno je primarno protutijelo - anti Nectin 4/PVRL4, clone N4.61 (MERCK, DAB150), u razrijeđenju 1:80 i inkubacijom od 30 minuta. Nakon primarnog protutijela i ispiranja u redestiliranoj vodi, slijedila je inkubacija sa sekundarnim protutijelom (Secondary Antibodies, yellow colored reagent) 30 minuta, a potom inkubacija sa streptavidin konjugiranom peroksidazom (Dako LSABR2 kit) te bojanje s kromogenom (DAB Chromogen Kit) i hematoksilinom (Hematoxylin Counter Stain solution). Na kraju je uslijedilo obilno ispiranje u tekućoj vodi, rehidriranje kroz nizove alkohola, od manje koncentracije prema većoj, te uranjanje u ksilen, dva puta po 5 minuta.

Preparati su mikroskopski evaluirani od strane dva neovisna patologa, bez prethodnih informacija vezanih za kliničke podatke o pacijentima.

Pozitivitet je bio citoplazmatski. Pozitivna kontrola bio je uzorak jasno i intenzivno pozitivnog karcinom dojke, a negativna kontrola postignuta je zamjenom primarnog protutijela reakcijskim puferom.

Imunohistokemijska reakcija evaluirana je putem IRS skora (engl.immunoreactive score of Remmele and Stegner) (76). Procijenjen je prvo postotak tumorskih stanica na jednom vidnom polju velikog povećanja mikroskopa (40x) na način da je 0- negativno, 1 = ≤10 %; 2 = 11-50 %, 3 = 51-80 %, 4 = ≥81 %. Drugi parametar je intenzitet bojanja: 0 (negativno), 1 (slabi intenzitet), 2 (umjereni intenzitet), 3 (jaki intenzitet).

Dobivene vrijednosti su se umnožile, a rezultat od 0-12 se svrstao u 4 kategorije:

0- 0-1 ( negativan)

1- 2-3 ( blago pozitivan)

2- 4-8 ( umjereno pozitivan)

3- 9-12 ( jako pozitivan)

### 4.3. Statistička analiza

Podatci iz pojedinih izvještaja su oblikovani u jednu cjelovitu digitalnu bazu pomoću računalnog programa *Microsoft Excel 2010, Microsoft Inc.* (*licenca MFOS*). Statistička obrada podataka napravljena je pomoću osobnog računala, korištenjem statističkog programskog paketa MedCalc Statistical Software version 16.4.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; https://www.medcalc.org; 2016).

Vrijeme preživljenja, odnosno povrata bolesti, računalo se u mjesecima počevši od dana operativnog zahvata. Klinički podatci i patohistoloških čimbenici korelirani su pomoću Pearson Chi-Square testa i Fisher egzaktnog testa za kategoričke podatke. Korelacija numeričkih i ordinalnih podataka napravljena je pomoću Kendall's Tau testa**.**

Kruskal-Wallis test za dvije ili više kategoričkih varijabli upotrijebljen je za korelaciju Nectina-4 s dobi, ER, PR i Ki-67 proliferacijskim indeksom.

Za statističku analizu preživljenja korištene su Kaplan-Meierove krivulje u kombinaciji sa long rank testom.

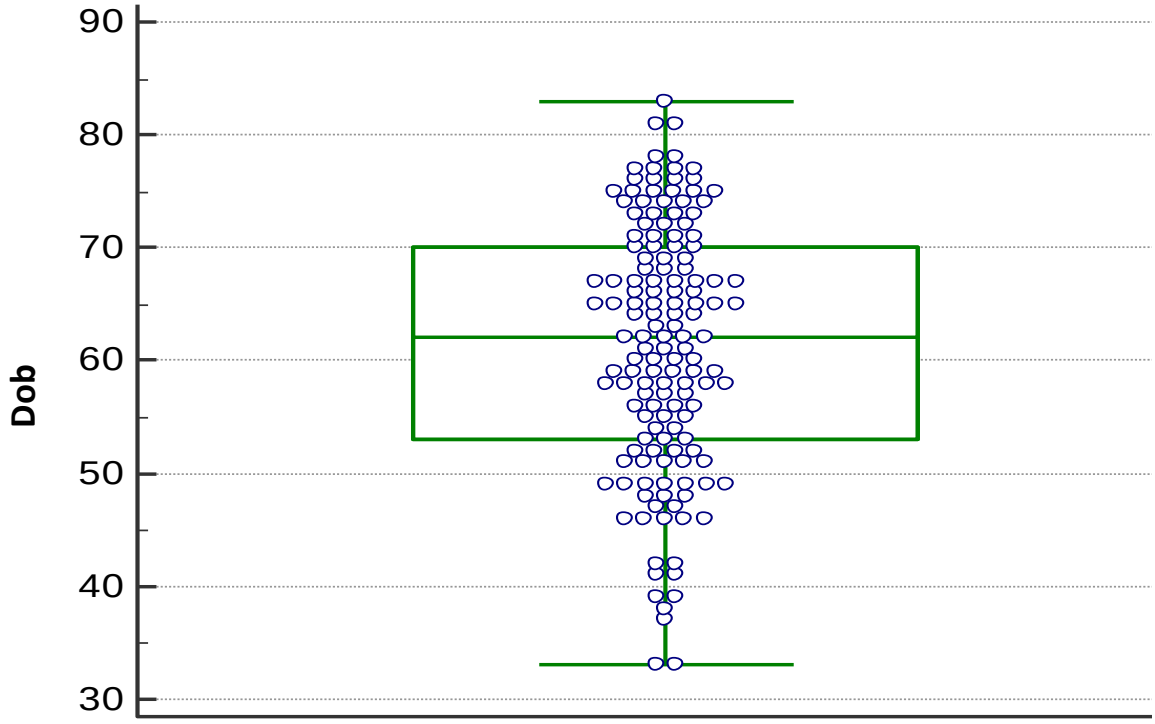
Univarijantni i multivarijantni Cox model korišten je za izdvajanje varijabli koje su statistički značajno povezane sa sveukupnim preživljenjem i preživljenjem bez povrata bolesti. U ovoj analizi granična vrijednost razlučivanja određena je putem ROC analize.

Statistička značajnost ocjenjivana je zaključivanjem s obzirom na dobivenu *p* vrijednost, a u usporedbi s razinom značajnosti od $\alpha = 0{,}05$, pri čemu se vrijednosti $p<\alpha$ ocjenjuju kao statistički značajne.

## 5. Rezultati

### 5.1. Patohistološke i kliničke karakteristike ispitivane skupine

U ispitanom uzorku od 147 pacijenata, 2 su pacijenta muškog spola, ostale su bile žene. Srednja dobna vrijednost je 62 godine (53-70) u rasponu od 33 do 83 godine. (slika 5.1.)




Slika 5.1. Starosna dob pacijenata

Obzirom na histološki tip, većina tumora, njih 102 (69,38 %) bili su duktalni invazivni karcinomi, 22 (14,96 %) su bili invazivni lobularni, a preostala 23 (15,66 %) su bili ostalih, rijeđih histoloških podtipova.

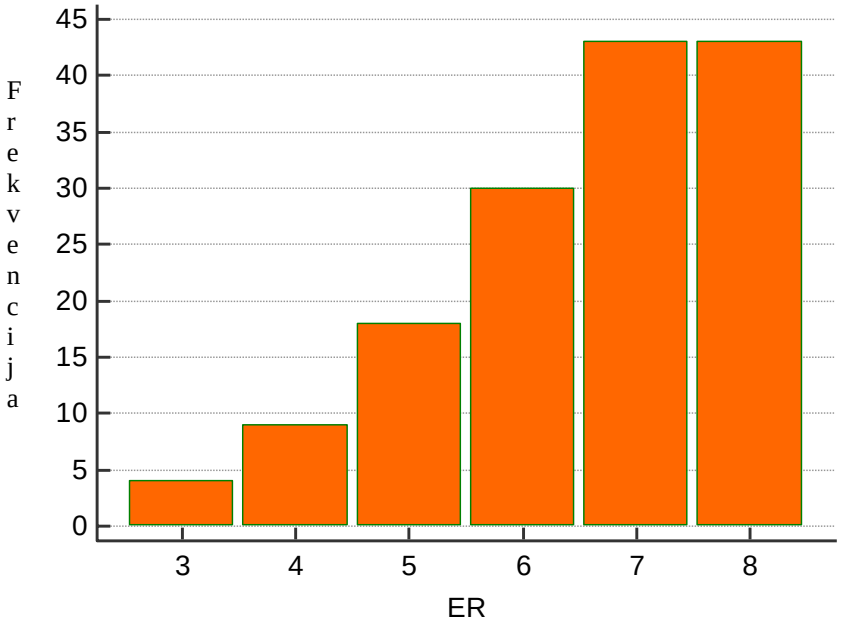
128 (87 %) uzoraka ocijenjeno je kao dobro ili srednje diferencirano (gradus I ili II), obzirom na histološki gradus, a samo je mali broj od 19 uzoraka (13 %) procijenjen kao slabo diferenciran (gradus III). U trenutku dijagnoze 55,10 % (81) pacijenata imali su pozitivne pazušne limfne čvorove. Značajno je najveći broj tumora bio u rasponu od <2≤5 cm (tablica 5.1).

Tablica 5.1. Kliničko-patološke karakteristike

| | n ( %) | p* |
|---|---|---|
| **Histološki podtip** | | |
| **Duktalni (NOS)** | 102 (69,4) | <0,001 |
| **Lobularni** | 22 (15,0) | |
| **Ostali** | 23 (15,6) | |
| **Veličina tumora,cm** | | |
| **>0,5 ≤ 1,0** | 17 (11,6) | <0,001 |
| **> 1 ≤ 2** | 50 (34,0) | |
| **> 2 ≤ 5** | 68 (46,3) | |
| **>5** | 12 (8,2) | |
| **Histološki gradus** | | |
| **1** | 64 (43,5) | <0,001 |
| **2** | 64 (43,5) | |
| **3** | 19 (12,9) | |
| **Status limfnih čvorova** | | |
| **N0** | 66 (44,9) | 0,001 |
| **N1 (1-3)** | 34 (23,1) | |
| **N2 (4-9)** | 30 (20,4) | |
| **N3 (>10)** | 17 (11,6) | |
| **Ukupno** | 147 (100,0) | |

Pearson Chi-Square Test; p<0,001

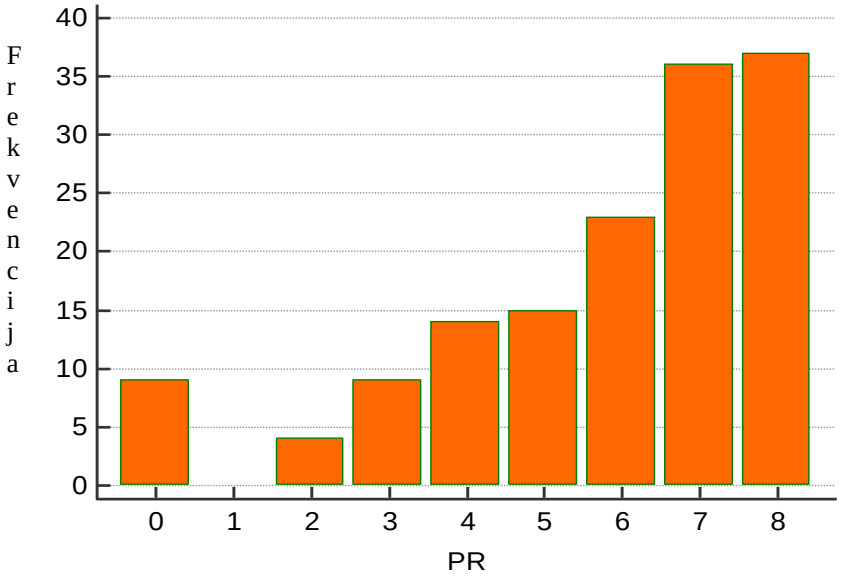
Prosječna vrijednost za ER iznosi 7,0 (6,0-8,0) (median i interkvartilni raspon) uz ukupni raspon od 3 do 8 bodova (slika 5.2.), a ukupni mogući raspon vrijednosti od minimalnih 0 do maksimalnih 8 bodova.



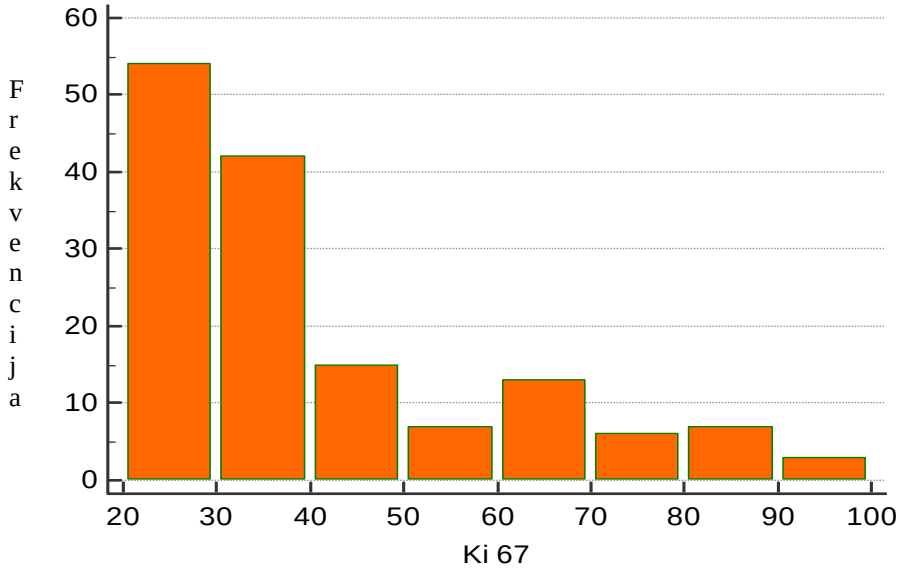

Slika 5.2. Prosječna vrijednost intenziteta ER

Prosječna vrijednost za PR iznosi 6,5 (5,0-7,5) (median i interkvartilni raspon) uz raspon od 0 do 8 bodova (slika 5.3.), uz ukupni raspon od minimalnih 0 do maksimalnih 8 bodova.

Razdioba Ki-67 u postocima u prosjeku iznosi 35,0 (23,0–49,5) (medijan i interkvartilni raspon) uz ukupni raspon od 20 do 95 % (slika 5.4.).




Slika 5.3. Prosječna vrijednost za PR




Slika 5.4. Razdioba Ki-67 u postocima

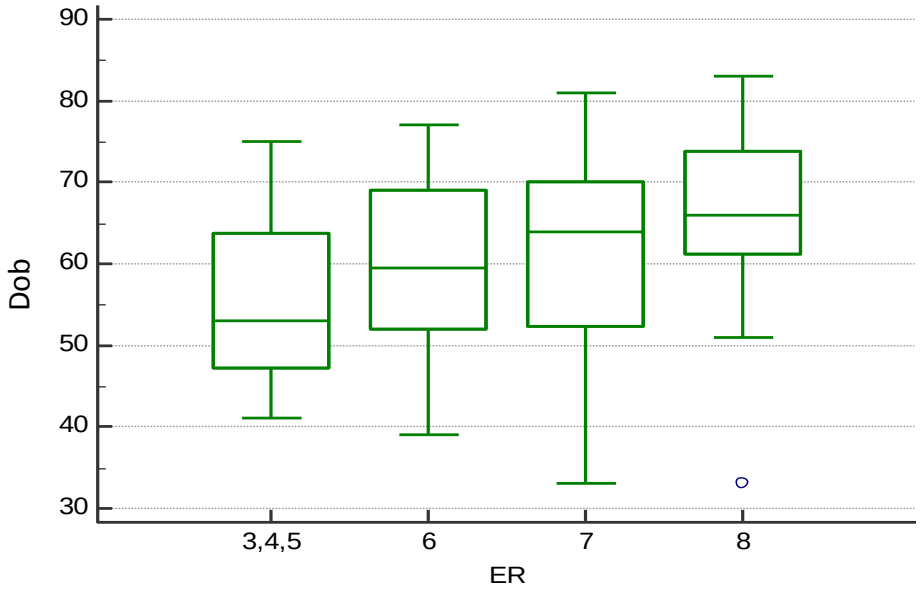
## 5.2. Korelacija ER, PR i Ki-67 s ostalim parametrima

Razdioba vrijednosti ER statistički je značajno povezana s gradusom tumora, odnosno tumori višeg gradusa imali su niži intenzitet ER (tablica 5.2.). Također je značajna povezanost sa starosnom dobi ispitanica, odnosno starije ispitanice imale su veći intenzitet ER (slika 5.5.). Nije utvrđena statistički značajna povezanost ER s ostalim parametrima (tablica 5.2., slika 5.5. i 5.6.).

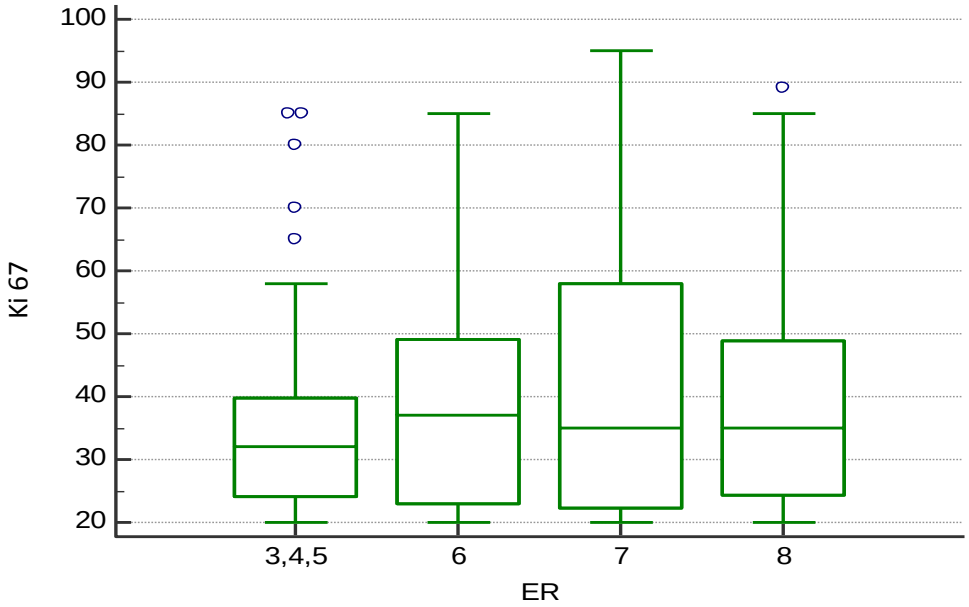
Tablica 5.2. Usporedba ER s ostalim ispitanim parametrina

| **Vrijednosti ER** | **3, 4, 5** | **6** | **7** | **8** | **p*** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Histološki tip** | | | | | |
| **Duktalni(NOS)** | 21 (67,7) | 27 (90,0) | 28 (65,1) | 26 (60,5) | 0,184 |
| **Lobularni** | 5 (16,1) | 2 (6,7) | 7 (16,3) | 8 (18,6) | |
| **Ostali** | 5 (16,1) | 1 (3,3) | 8 (18,6) | 9 (20,9) | |
| **Veličina tumora (cm)** | | | | | |
| **>0,5 ≤ 1,0** | 4 (12,9) | 2 (6,7) | 3 (7,0) | 8 (18,6) | 0,291 |
| **> 1 ≤ 2** | 12 (38,7) | 6 (20,0) | 17 (39,5) | 15 (34,9) | |
| **> 2 ≤ 5** | 13 (41,9) | 18 (60,0) | 18 (41,9) | 19 (44,2) | |
| **>5** | 2 (6,5) | 4 (13,3) | 5 (11,6) | 1 (2,3) | |
| **Histološki gradus** | | | | | |
| **1** | 12 (38,7) | 11 (36,7) | 18 (41,9) | 23 (53,5) | **0,037** |
| **2** | 13 (41,9) | 11 (36,7) | 24 (55,8) | 16 (37,2) | |
| **3** | 6 (19,4) | 8 (26,7) | 1 (2,3) | 4 (9,3) | |
| **Status limfnih čvorova** | | | | | |
| **N0** | 14 (45,2) | 9 (30,0) | 18 (41,9) | 25 (58,1) | 0,116 |
| **N1 (1-3)** | 8 (25,8) | 7 (23,3) | 13 (30,2) | 6 (14,0) | |
| **N2 (4-9)** | 8 (25,8) | 8 (26,7) | 5 (11,6) | 9 (20,9) | |
| **N3 (>10)** | 1 (3,2) | 6 (20,0) | 7 (16,3) | 3 (7,0) | |
| **UKUPNO** | 31 (100,0) | 30 (100,0) | 43 (100,0) | 43 (100,0) | |

*Fisherov egzaktni test




Slika 5.5. Raspodjela ER u odnosu na starosnu dob pacijenata (Kruskal-Wallis test p<0,001)



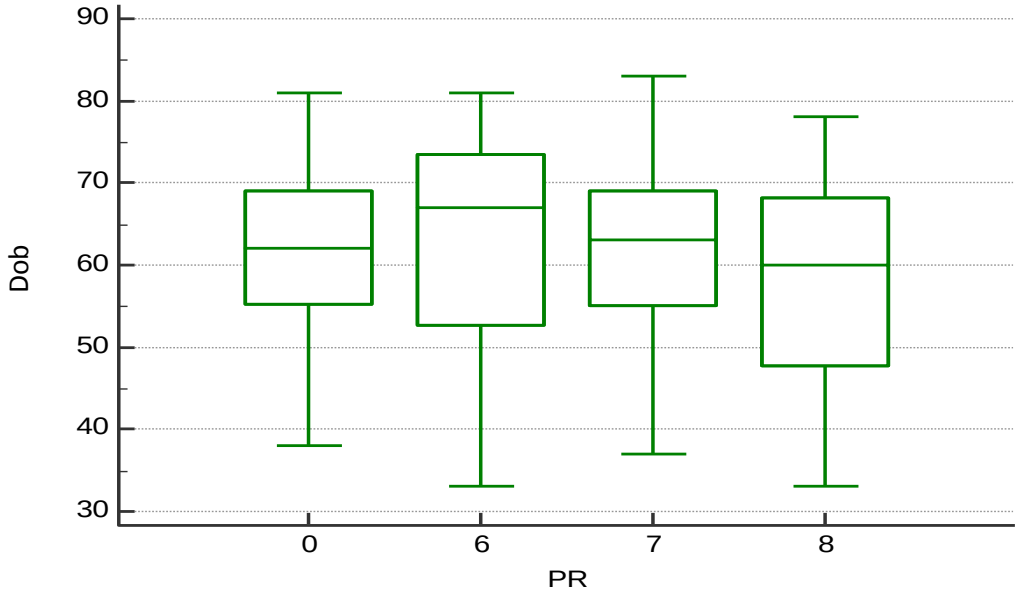

Slika 5.6. Raspodjela ER u odnosu na Ki-67 (Kruskal-Wallis test; p = 0,912)

Razdioba vrijednosti PR statistički je značajno povezana s gradusom tumora, odnosno kod negativnog PR podjednako su zastupljena sva tri gradusa tumora, dok je za ostale iznose vrijednosti PR značajno češći prvi ili drugi gradus tumora (tablica 5.3). Nije utvrđena statistički značajna povezanost vrijednosti PR s ostalim promatranim parametrima (tablica 5.3. Slika 5.7. i 5.8).

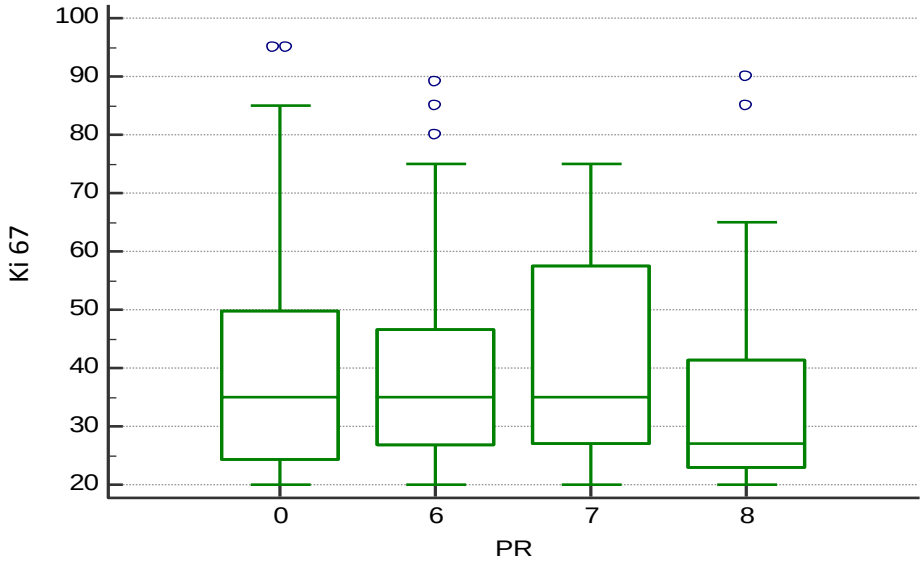
Tablica 5.3. Usporedba PR s ostalim ispitanim parametrima

| **Vrijednosti PR** | **0** | **2-5** | **6** | **7** | **8** | **p*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Histološki tip** | | | | | | |
| **Duktalni(NOS)** | 7 (77,8) | 33 (78,6) | 16 (69,6) | 24 (66,7) | 22(59,5) | 0,593 |
| **Lobularni** | 1 (11,1) | 4 (9,5) | 5 (21,7) | 4 (11,1) | 8 (21,6) | |
| **Ostali** | 1 (11,1) | 5 (11,9) | 2 (8,7) | 8 (22,2) | 7 (18,9) | |
| **Veličina tumora (cm)** | | | | | | |
| **>0,5 ≤ 1,0** | 2 (22,2) | 4 (9,5) | 3 (13,0) | 3 (8,3) | 5 (13,5) | 0,543 |
| **> 1 ≤ 2** | 3 (33,3) | 17 (40,5) | 6 (26,1) | 10 (27,8) | 14 (37,8) | |
| **> 2 ≤ 5** | 2 (22,2) | 20 (47,6) | 12 (52,2) | 20 (55,6) | 14 (37,8) | |
| **>5** | 2 (22,2) | 1 (2,4) | 2 (8,7) | 3 (8,3) | 4 (10,8) | |
| **Histološki gradus** | | | | | | |
| **1** | 3 (33,3) | 16 (38,1) | 13 (56,5) | 11 (30,6) | 21 (56,8) | **0,008** |
| **2** | 3 (33,3) | 21 (50,0) | 4 (17,4) | 21 (58,3) | 15 (40,5) | |
| **3** | 3 (33,3) | 5 (11,9) | 6 (26,1) | 4 (11,1) | 1 (2,7) | |
| **Status limfnih čvorova** | | | | | | |
| **N0** | 4 (44,4) | 17 (40,5) | 8 (34,8) | 15 (41,7) | 22 (59,5) | 0,832 |
| **N1 (1-3)** | 1 (11,1) | 10 (23,8) | 7 (30,4) | 9 (25,0) | 7 (18,9) | |
| **N2 (4-9)** | 3 (33,3) | 8 (19,0) | 5 (21,7) | 8 (22,2) | 6 (16,2) | |
| **N3 (>10)** | 1 (11,1) | 7 (16,7) | 3 (13,0) | 4 (11,1) | 2 (5,4) | |
| **UKUPNO** | 9 (100,0) | 42 (100,0) | 23 (100,0) | 36 (100,0) | 37 (100,0) | |

*Fisherov egzaktni test




Slika 5.7. Raspodjela PR u odnosu na starosnu dob pacijenata (Kruskal-Wallis test p = 0,098)




Slika 5.8. Raspodjela PR u odnosu na Ki-67 (Kruskal-Wallis test; p = 0,502)

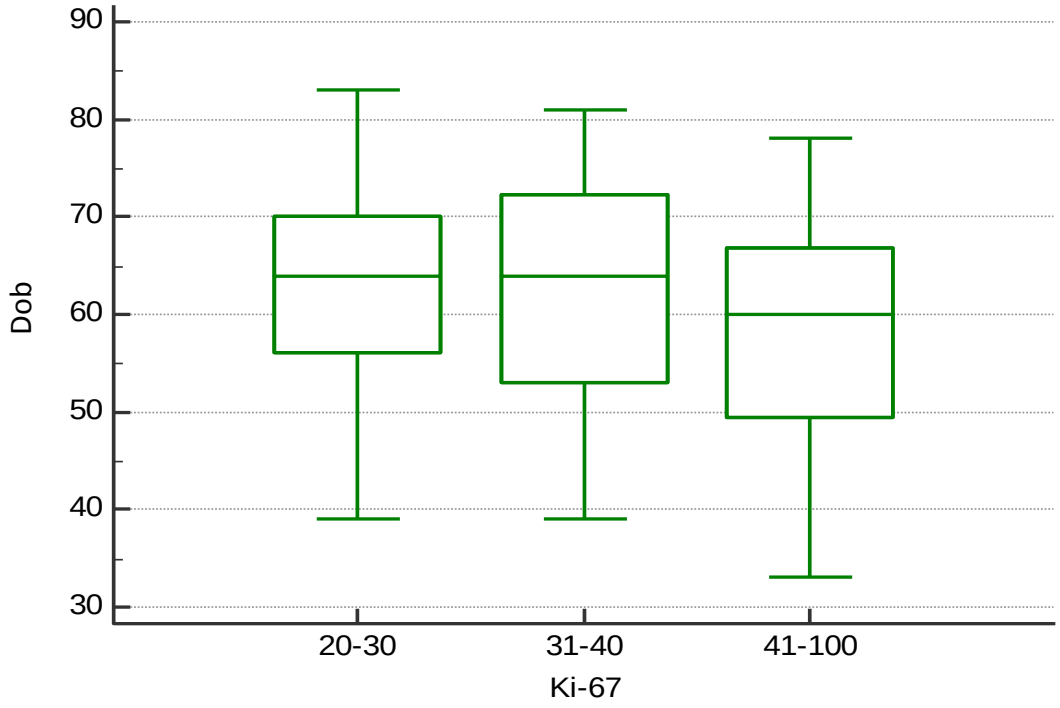
Razdioba Ki-67 također je statistički značajno povezana s gradusom tumora, odnosno kod većih vrijednosti Ki-67 proliferacijskog indeksa bio je značajno je veći gradus tumora

(tablica 5.4.). Nije utvrđena statistički značajna povezanost razine Ki-67 proliferacijskog indeksa s ostalim promatranim parametrima (tablica 5.4, slika 5.9., 5,10 i 5.11.).

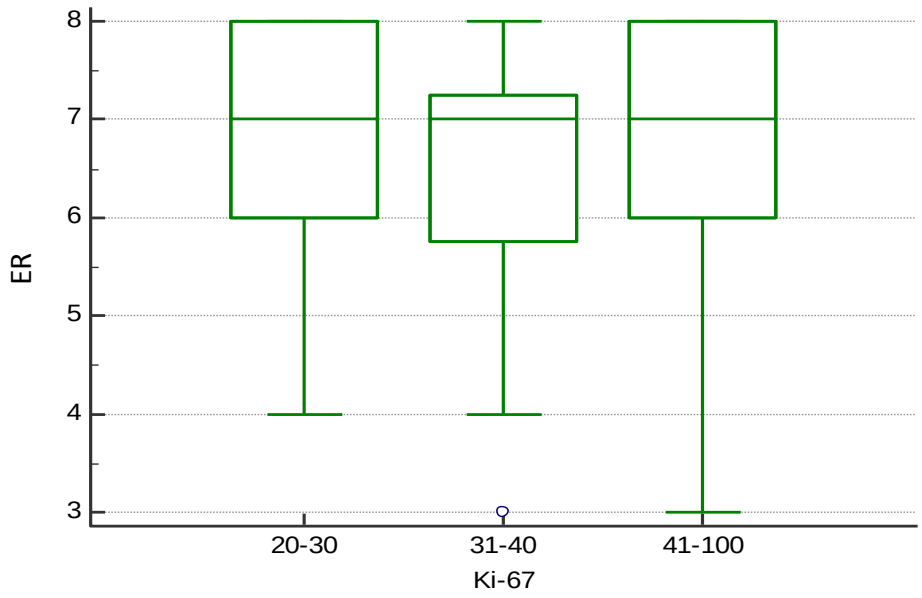
Tablica 5.4. Povezanost Ki-67 s ostalim ispitanim parametrima

| **Ki-67 ( %)** | **20-30** | **31-40** | **41-100** | **p*** |
|---|---|---|---|---|
| **Histološki tip** | | | | |
| **Duktalni(NOS)** | 33 (60,0) | 34 (75,6) | 35 (74,5) | 0,405 |
| **Lobularni** | 10 (18,2) | 5 (11,1) | 7 (14,9) | |
| **Ostali** | 12 (21,8) | 6 (13,3) | 5 (10,6) | |
| **Veličina tumora (cm)** | | | | |
| **>0,5 ≤ 1,0** | 10 (18,2) | 4 (8,9) | 3 (6,4) | 0,421 |
| **> 1 ≤ 2** | 19 (34,5) | 18 (40,0) | 13 (27,7) | |
| **> 2 ≤ 5** | 22 (40,0) | 20 (44,4) | 26 (55,3) | |
| **>5** | 4 (7,3) | 3 (6,7) | 5 (10,6) | |
| **Histološki gradus** | | | | |
| **1** | 32 (58,2) | 21 (46,7) | 11 (23,4) | **<0,001** |
| **2** | 22 (40,0) | 19 (42,2) | 23 (48,9) | |
| **3** | 1 (1,8) | 5 (11,1) | 13 (27,7) | |
| **Status limfnih čvorova** | | | | |
| **N0** | 31 (56,4) | 19 (42,2) | 16 (34,0) | 0,413 |
| **N1 (1-3)** | 9 (16,4) | 12 (26,7) | 13 (27,7) | |
| **N2 (4-9)** | 10 (18,2) | 8 (17,8) | 12 (25,5) | |
| **N3 (>10)** | 5 (9,1) | 6 (13,3) | 6 (12,8) | |
| **UKUPNO** | 55 (100,0) | 45 (100,0) | 47 (100,0) | |

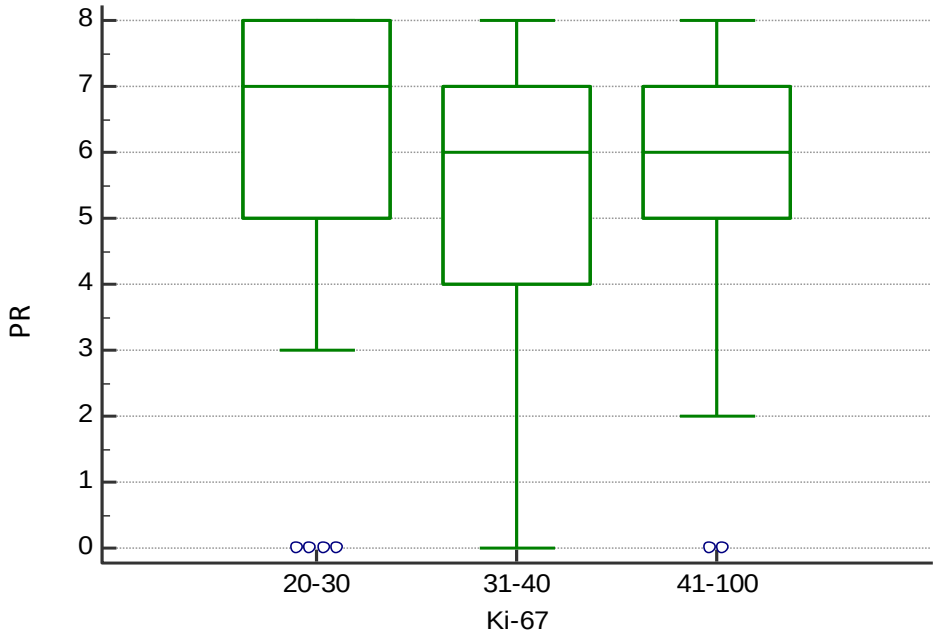
*Fisherov egzaktni test




Slika 5.9. Raspodjela Ki-67 u odnosu na starosnu dob pacijenta (Kruskal-Wallis test; p = 0,191)




Slika 5.10. Raspodjela Ki-67 u odnosu na ER (Kruskal-Wallis test; p = 0,712)

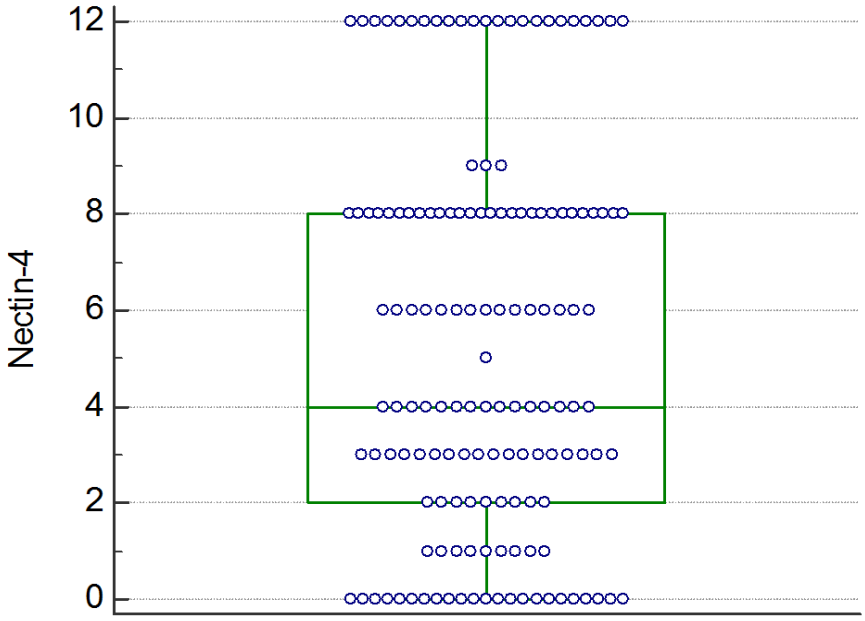



Slika 5.11. Raspodjela Ki-67 u odnosu na PR (Kruskal-Wallis test; p = 0,248)

### 5.3. Raspodjela Nectin-4 proteina u ispitanoj skupini

Na slici 5.12. grafički je prikazana raspodjela Nectina-4 za svaku oderđenu vrijednost imunohistokemijskog skora (0-12).

Uočava se da je 23 tumora bilo negativno, a najzastupljenije vrijednosti su bile od 2-8 (89 uzoraka).




Slika 5.12 Razdioba Nectina-4 u ispitivanoj skupini

### 5.4. Usporedba Nectina-4 s ostalim patohistološkim i kliničkim karakteristikama

Ekspresija Nectin-4 proteina statistički je značajno povezana s veličinom tumora ($p<0,005$) (tablica 5.5.). Nije utvrđena statistički značajna povezanost ekspresije Nectina-4 s ostalim parametrima (tablica 5.5. i 5.6.).

Tablica 5.5. Povezanost Nectina-4 s drugim patohistološkim parametrima

| Nectin-4 | 0-1 | 2-3 | 4-8 | 9-12 | p* |
|---|---|---|---|---|---|
| **Histološki tip** | | | | | |
| **Duktalni(NOS)** | 26 (74,3) | 19 (70,4) | 37 (62,7) | 20 (76,9) | 0,767 |
| **Lobularni** | 5 (14,3) | 3 (11,1) | 12 (20,3) | 2 (7,7) | |
| **Ostali** | 4 (11,4) | 5 (18,5) | 10 (16,9) | 4 (15,4) | |
| **Veličina tumora (cm)** | | | | | |
| **>0,5 ≤ 1,0** | 9 (25,7) | 1 (3,7) | 6 (10,2) | 1 (3,8) | **0,005*** |
| **> 1 ≤ 2** | 16 (45,7) | 13 (48,1) | 14 (23,7) | 7 (26,9) | |
| **> 2 ≤ 5** | 7 (20,0) | 12 (44,4) | 34 (57,6) | 15 (57,7) | |
| **>5** | 3 (8,6) | 1 (3,7) | 5 (8,5) | 3 (11,5) | |
| **Histološki gradus** | | | | | |
| **1** | 17 (48,6) | 11 (40,7) | 28 (47,5) | 8 (30,8) | 0,616 |
| **2** | 14 (40,0) | 11 (40,7) | 26 (44,1) | 13 (50,0) | |
| **3** | 4 (11,4) | 5 (18,6) | 5 (8,5) | 5 (19,2) | |
| **Status limfnih čvorova** | | | | | |
| **N0** | 18 (51,4) | 13 (48,1) | 26 (44,1) | 9 (34,6) | 0,589 |
| **N1 (1-3)** | 8 (22,9) | 5 (18,5) | 16 (27,1) | 5 (19,2) | |
| **N2 (4-9)** | 6 (17,1) | 8 (29,6) | 9 (15,3) | 7 (26,9) | |
| **N3 (>10)** | 3 (8,6) | 1 (3,7) | 8 (13,6) | 5 (19,2) | |
| **UKUPNO** | 35 (100,0) | 27 (100,0) | 59 (100,0) | 26 (100,0) | |

*Fischerov egzaktni test

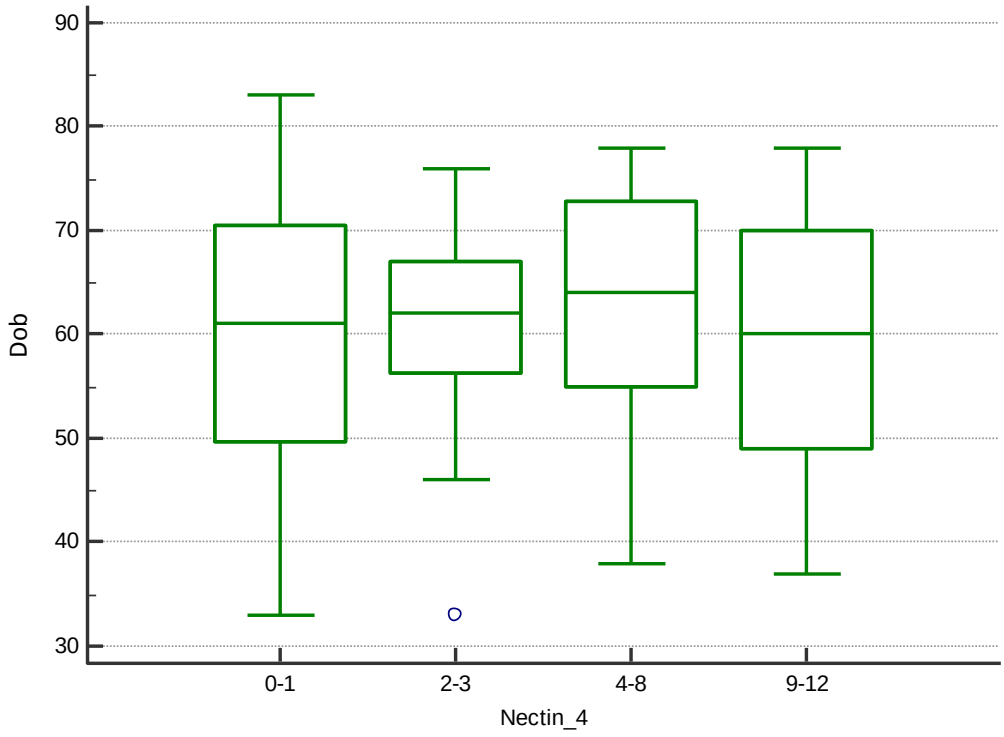
Tablica 5.6. Povezanost Nectina-4 s ER, PR, Ki-67 i dobi

| Nectin-4 /n=147 | Dob, ER,PR i Ki 67 | p* | Tau koeficijent | 95 % CI for Tau |
|---|---|---|---|---|
| | Dob | 0,733 | 0,019 | -0,095 - 0,145 |
| | ER | 0,633 | -0,027 | -0,152 - 0,099 |
| | PR | 0,964 | 0,003 | -0,117 - 0,126 |
| | Ki-67 | 0,638 | -0,026 | -0,147 - 0,111 |

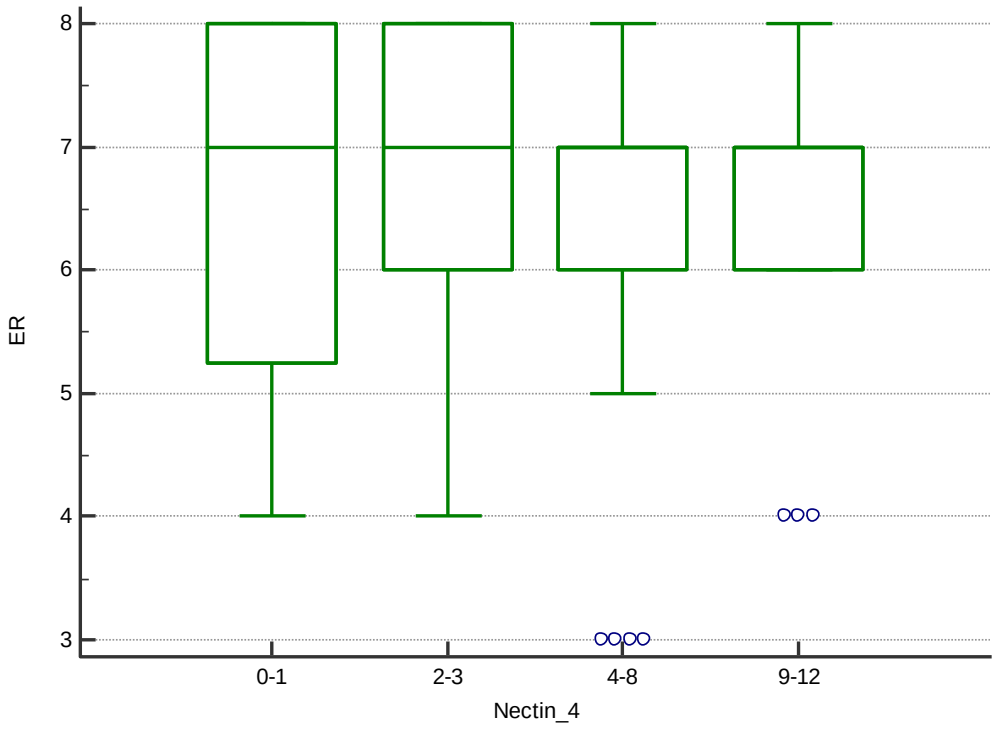
*Kendall′s Tau

Na slikama 5.13., 5.14., 5.15. i 5.16. grafički su prikazane raspodjele vrijednosti starosne dobi pacijenata, ER, PR i Ki-67 proliferacijskog indeksa u odnosu na ekspresiju Nectina-4.

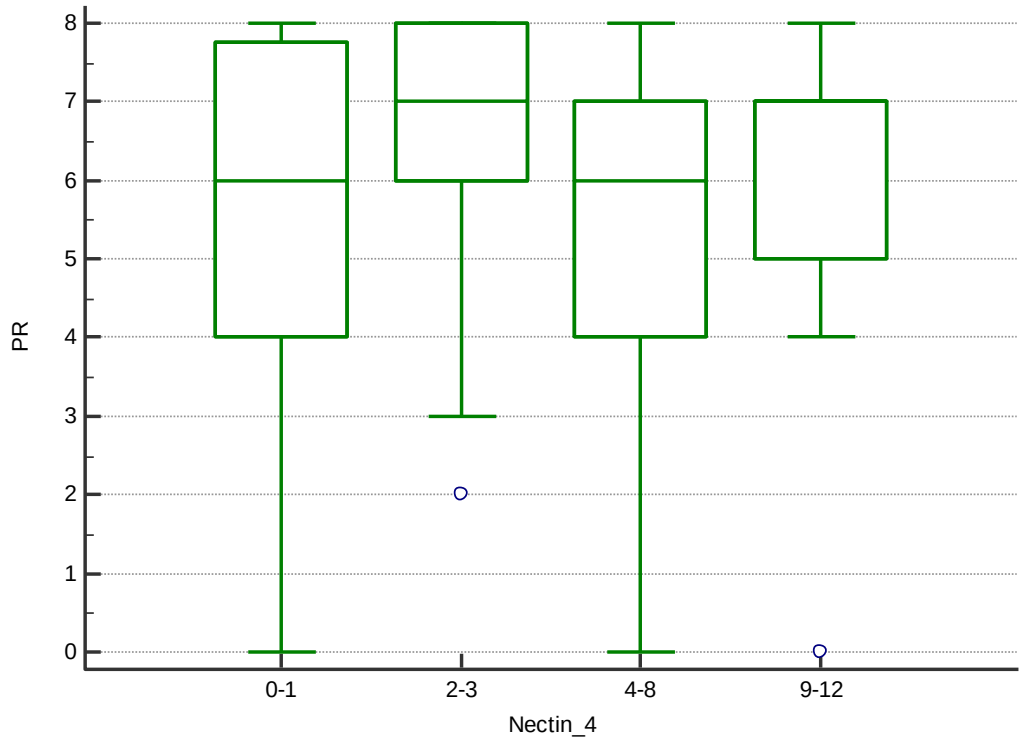
Iz navedenih prikaza vidljivo je da ne postoji statistički značajna povezanost između ekspresije Nectina-4 i dobi (p = 0,604), ER (p = 0,568), PR (p = 0,490) i Ki-67 (p = 587).



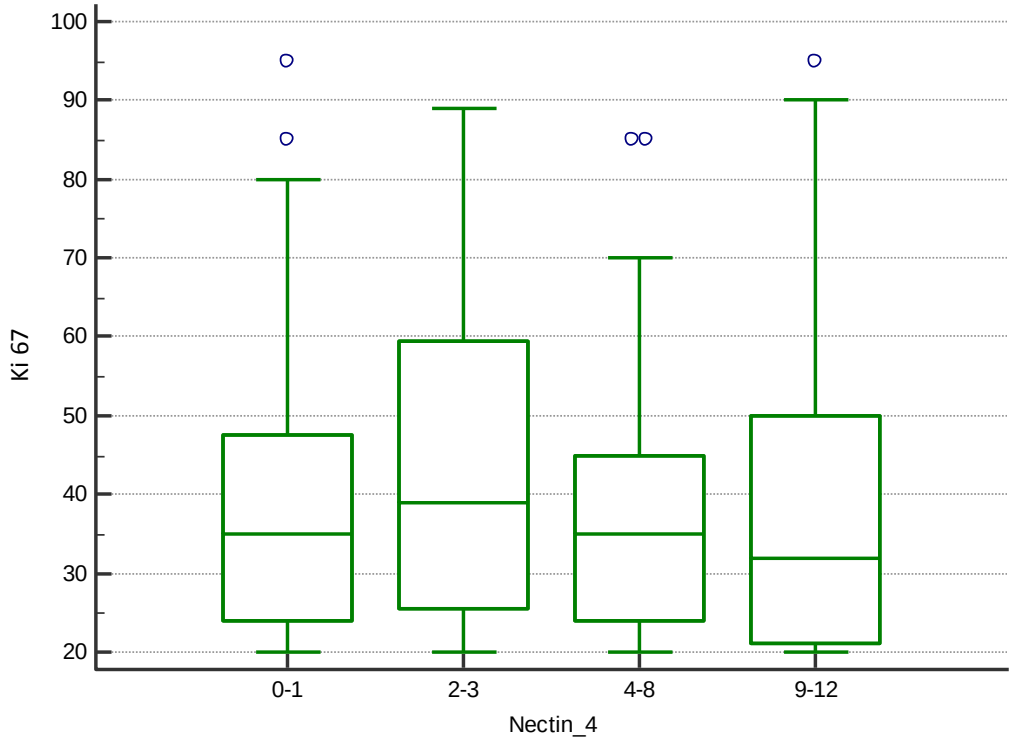

Slika 5.13. Raspodjela Nectina-4 u odnosu na starosnu dob (p = 0,604; Kruskal-Wallis test)




Slika 5.14. Raspodjela Nectina-4 u odnosu na ER (p = 0,568; Kruskal-Wallis test)




Slika 5.15. Raspodjela Nectina-4 u odnosu na PR (p = 0,490; Kruskal-Wallis test)




Slika 5.16. Raspodjela Nectina-4 u odnosu na Ki-67 (p = 0,587; Kruskal-Wallis test)

### 5.5. Analize preživljenja (Kaplan-Meier i Cox regresijski model)

U ispitivanoj skupini od 147 pacijenata, medijan praćenja je bio 80,7 mjeseci s interkvartalim rasponom od 35,7-103,5 mjeseci i totalnim rasponom od 1,9-128,2 mjeseca. Unutar ispitivanog razdoblja 53 pacijenta (36,1 %) je umrlo. Povrat bolesti zabilježen je u 45 pacijenata (30,7 %), od toga 7 s lokalnim recidivom (4,8 %) i 38 pacijenata s distalnim metastazama (25,9 %). (tablica 5.7).

Tablica 5.7. Ishod bolesti

| | **n ( %)** |
|---|---|
| **Bez povrata bolesti /DFS** | 42 (28,6) |
| **Lokalni recidiv/LRFS** | 7 (4,8) |
| **Udaljeni recidiv /DRFS** | 38 (25,9) |
| **Sveukupno preživljenje /OS** | 53 (36,1) |

Prilikom analize Coxovim regresijskim modelom za sveukupno preživljenje (OS) i preživljenje bez povrata bolesti (DFS) (tablica 5.8. i 5.9.), granične su vrijednosti određene ROC analizom. U oba slučaja progesteron se pokazao kao statistički značajan parametar za preživljenje (DFS: p = 0,004; OS: p = 0,029). U ovoj analizi Nectin-4 se također ističe kao statistički bitan parametar za sveukupno preživljenje i preživljenje bez povrata bolesti (DFS p<0,001; OS p<0,001). Ostali ispitivani parametri u ovoj analizi nisu se pokazali kao statistički značajni, osim dobi koja je statistički značajno povezana s DFS (p<0,001).

Tablica 5.8. Univarijantna i multivarijantna prognostička analiza 147 pacijenata za OS

| | **Univarijantna analiza** | | | **Multivarijantna analiza** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | HR | 95 % CI | p* | HR | 95 % CI | p* |
| **Dob >66†** | 3,246 | 1,887-5,584 | <0,001 | 3,868 | 2,169-6,895 | <0,001 |
| **ER ≤7†** | 0,485 | 0,219-1,075 | 0,075 | 0,878 | 0,387-1,992 | 0,755 |
| **PR ≤7†** | 0,299 | 0,128-0,700 | 0,005 | 0,279 | 0,117-0,666 | 0,004 |
| **Ki-67 >26†** | 0,604 | 0,339-1,076 | 0,087 | 0,604 | 0,336-1,084 | 0,091 |
| **Nectin-4 >5†** | 4,583 | 2,446-8,587 | <0,001 | 4,800 | 2,498-9,221 | <0,001 |

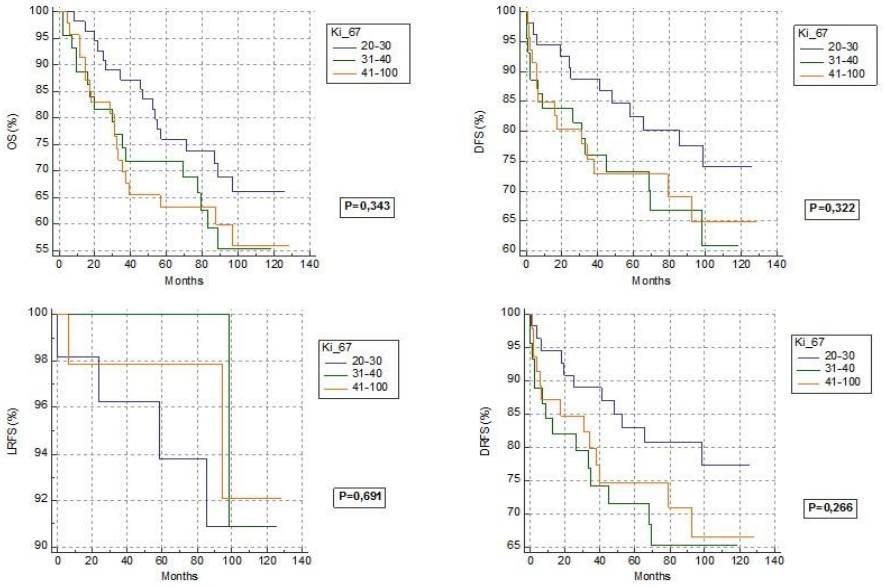
*COX regresijski model; HR: hazard ratio; CI:confidence interval.
†Granične vrijednosti određene ROC analizom

Tablica 5.9. Univarijantna i multivarijantna prognostička analiza 147 pacijenata za DFS

| | **Univarijantna analiza** | | | **Multivarijantna analiza** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | HR | 95 % CI | p* | HR | 95 % CI | p* |
| **Dob >69†** | 1,259 | 0,663-2,391 | 0,482 | 1,448 | 0,748-2,801 | 0,272 |
| **ER ≤5†** | 0,556 | 0,256-1,208 | 0,138 | 0,594 | 0,270-1,306 | 0,195 |
| **PR ≤7†** | 0,257 | 0,091-0,723 | 0,010 | 0,314 | 0,111-0,892 | 0,029 |
| **Ki-67 >31†** | 0,522 | 0,248-1,099 | 0,087 | 0,539 | 0,253-1,150 | 0,110 |
| **Nectin >5†** | 3,571 | 1,809-7,046 | <0,001 | 3,493 | 1,755-6,951 | <0,001 |

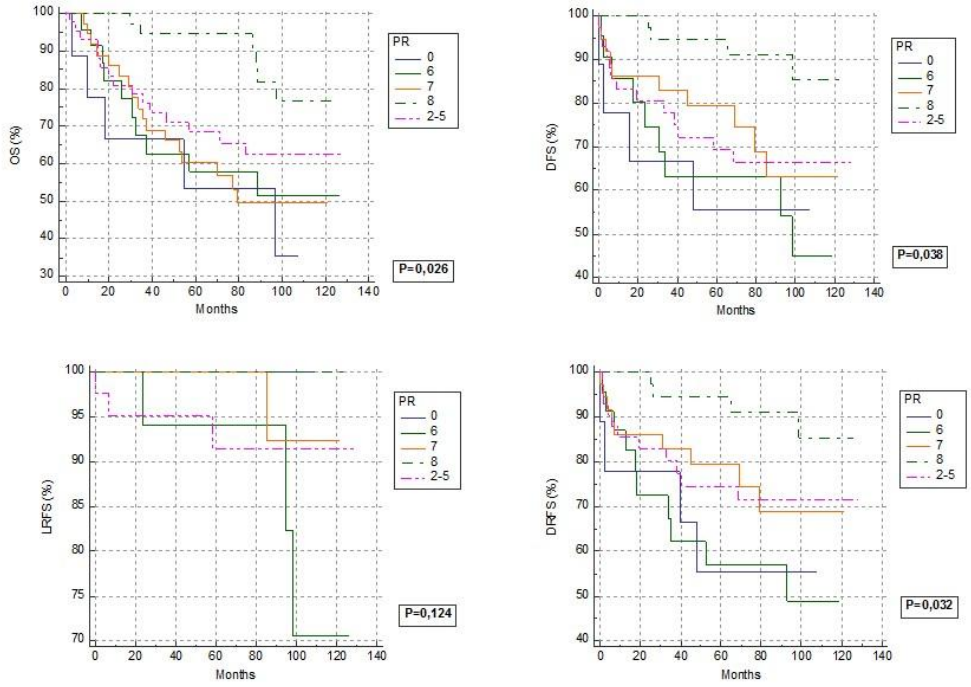
*COX regresijski model; HR: hazard ratio; CI:confidence interval.
†Granične vrijednosti određene ROC analizom

Putem Kaplan-Meier krivlulja u kombinaciji s long rank testom, Ki-67 nije pokazao statistički značajnu povezanost s preživljenjem (OS p = 0,343; DFS p = 0,322; LRFS p = 0,691; DRFS (p = 0,266) (slika 5.13.).



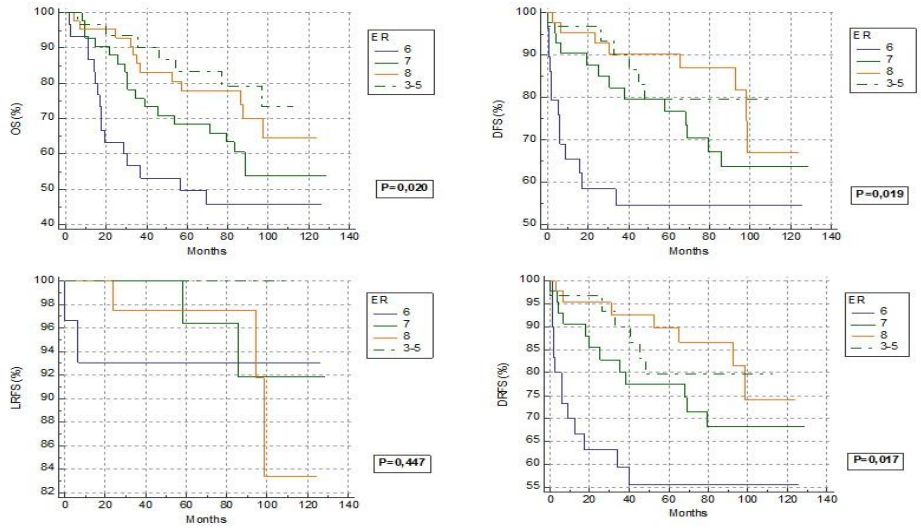

Slika 5.13. Kaplan-Meier anliza za Ki-67

Za razliku od Ki-67 proliferacijskog indeksa, PR pokazuje statistički značajnu povezanost sa sveukupnim preživljnjem (OS p = 0,026), preživljenjem bez povrata bolesti (DFS p = 0,038), kao i preživljenjem bez pojave udaljenih metastaza (DRFS p = 0,032). Nije pronađena statistička povezanost s pojavom lokalnih recidiva (LRFS p = 0,124 (slika 5.14).



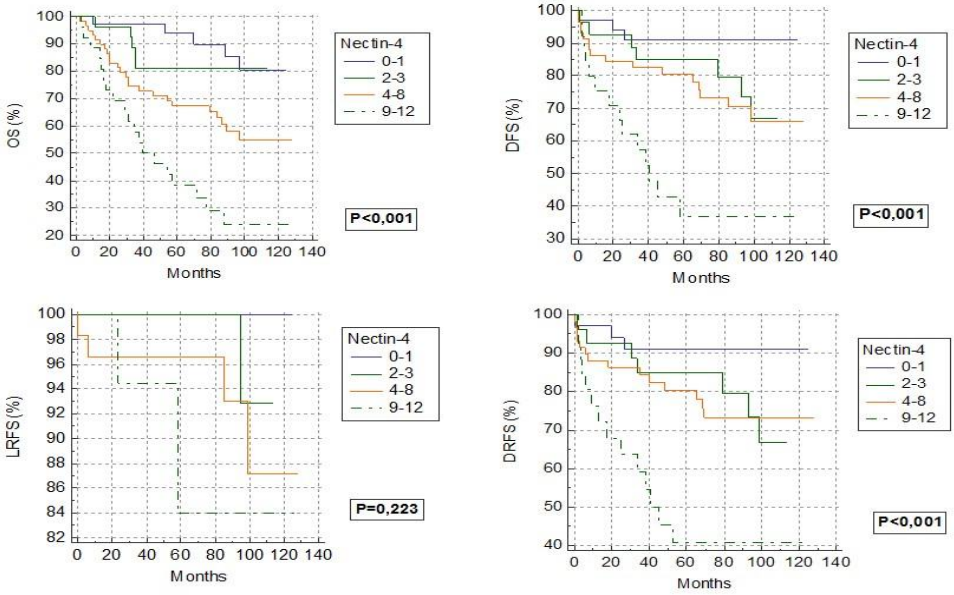

Slika 5.14. Kaplan-Meier analiza za PR

Vrlo je sličan rezultat analize za ER (OS p = 0,020, DFS p = 0,019; DRFS p = 0,017; i LRFS p = 0,447) (slika 5.15.).




Slika 5.15. Kaplan-Meier analiza za ER

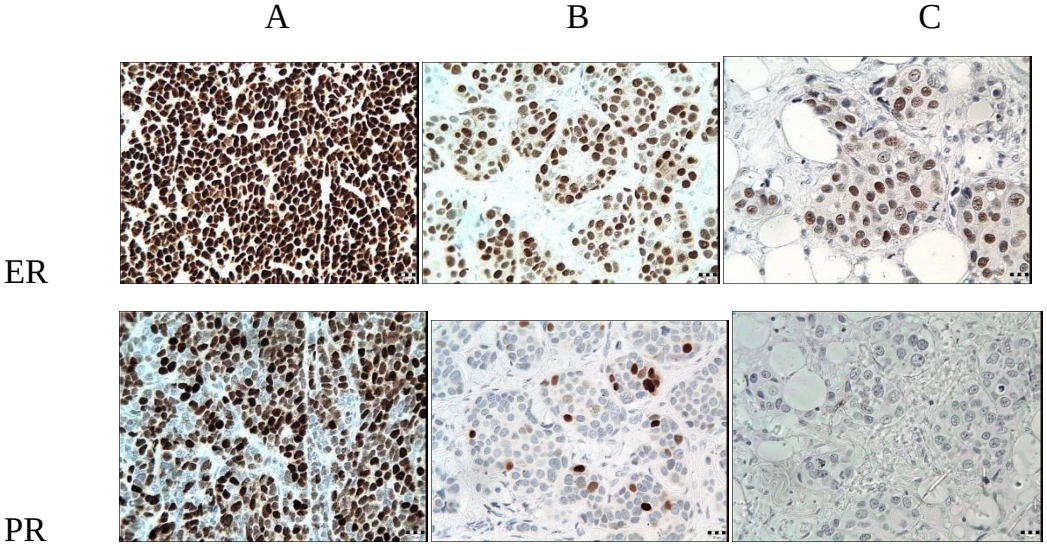
Nectin- 4 pokazao je značajnu statističku povezanost s OS (p<0,001), DFS (p<0,001) i DRFS (p<0,001), dok za LRFS nije ustanovljena statistički značajna povezanost (p = 0,223) (slika 5.16.).




Slika 5.16. Kaplan-Meier analiza za Nectin-4

## 6. Rasprava

Sukladno predhodno spomenutoj St. Gallenskoj konvenciji prihvaćena je molekularno bazirana podjela karcinoma dojke u pet podvrsta (74). Prema toj podjeli luminalni B (HER2 negativni) karcinomi ostaju najheterogenija skupina u odnosu na sve ostale. U toj skupini vrijednosti Ki-67 proliferacijskog indeksa variraju od 20 (ili niže kod PR<20%) do 100 %, što je puno veći raspon u odnosu na luminalnu A skupinu karcinoma, gdje su Ki-67 vrijednosti od 0-19 %. Također je vrlo šaroliki pozitivitet ER i PR, koji u tumorskom tkivu kod luminalnih B karcinoma mogu biti oba intenzivno i difuzno pozitivna, ali pozitivitet može biti i blag te samo žarišni u pojedinim stanicama (slika 6.1.). U ovoj su skupini i oni tumori kojima je jedan od hormona negativan, pri čemu su češći tumori kod kojih je pozitivan samo ER, a PR negativan; rijeđa je kombinacija pozitvnog PR, a negativnog ER. Ova heterogenost možda je odgovor na pitanje zašto pojedini pacijenti unutar ove skupine tumora uz povoljne ostale prognostičke parametre imaju lošu prognozu, s brzim relapsom bolesti i pojavom udaljenih metastaza, a drugi žive 10 i više godina bez pojave bolesti, unatoč nepovoljnim parametrima kao što su pozitivni pazušni limfni čvorovi, viši gradus tumora ili tumor većih dimenzija. Za ovu skupinu tumora poznato je da se, osim navedenih histopatoloških te molekularnih karakteristika, nalaze i određene kliničke značajke kao što su lošije preživljenje bez povrata bolesti, povišeni rizik od ranog relapsa bolesti, predispozicija za relaps u kostima i pleuri, relativna neosjetljivost na endokrinu terapiju u usporedbi s luminalnim A karcinomima, i relativna neosjetljivost na kemoterapiju u odnosu na trostruko negativne karcinome (77).




Slika 6.1. Raznoliki intenzitet i raspored ER i PR receptora (IHK 400 x; A-PHD 10286/08; B-PHD 7065/08; C-PHD 752/08)

Zbog svega navedenog ukazuje se potreba za pronalaženjem dodatnih biomarkera koji bi preciznije definirali ovu skupinu tumora, s podjelom na one tumore koji ipak zahtjevaju agresivniji onkološki tretman i one kojima takav tretman donosi više štete nego koristi. Nectin-4 predmet je recentnih znasnstvenih istraživanja a zbog dokazane uloge u progresiji tumora idealan za izolaciju podskupine pacijenata s lošijim ishodom bolesti.

### 6.1. Nectin-4 u karcinomu dojke

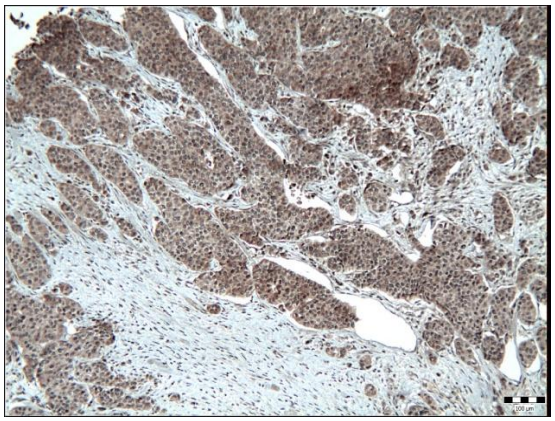
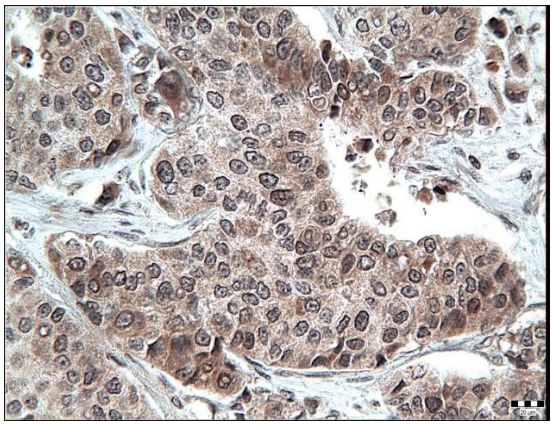
Na slici 5.12. uočava se da je raspodjela pozitiviteta Nectin-4 proteina relativno pravilna, a najzastupljenije su skupine s vrijednostima od 2-8.

Fabre Lafay i autori u svom istraživanju prikazali su pozitivnu ekspresiju Nectina-4 u 62 % duktalnih i 6 % lobularnih karcinoma dojke unutar kojih je pozitivitet bio značajniji kod hormonski slabije pozitivnih ili hormonski negativnih tumora (55).

U ovom istraživanju pozitivitet na Nectin-4 zabilježen je u sveukupno 112 (76,19 %) tumora, od čega su 76 (51,07 %) bili duktalnog invazivnog podtipa (NOS), 17 (11,50 %) su bili lobularni invazivni a ostali (19 (12,90 %)) su bili drugih, rijeđih histoloških podtipova, iz čega vidimo da je zastupljenost duktalnih i lobularnih podtipova u ovoj skupini karcinoma po postotku slična rezultataima iz literature, iako ne statistički značajna.

S obzirom na analizu i interpretaciju uzoraka dobivenih imunohistokemijskom obradom u većini istraživanja opisuje se citoplazmatski pozitivitet, no pojedini autori u tkivu dojke, ali i u drugim tumorima (gušterača, jajnici, pluća), spominju i membranski pozitivitet Nectina-4. Lattanzio i autori u svom istraživanju T1-T2 , N0 ranih luminal A karcinoma dojke uz citoplazmatski prikazali su i membranski pozitivitet Nectina-4 u tumorskim stanicama kao rizični faktor za pojavu udaljenih metastaza (51). Navedene razlike u rasporedu pozitiviteta mogu se pripisati primjenom različitih klonova protutijela na Nectin-4 protein.

U ovoj studiji pozitivitet je bio isključivo citoplazmatski (slika 6.2.), a membransko bojanje unutar tumorskog tkiva nije uočeno.

A  B 

Slika 6.2. Nectin-4 u invazivnim tumorskim nakupinama (PHD 6910/07; IHK; Ax100; B x 400)

### 6.2. Luminalni B (HER2 negativni) tumori s niskim intenzitetom ER i PR

Perou i autori istraživali su genske profile tumora s pozitivnim hormonskim receptorima i uz korelaciju s kliničkim tijekom bolesti uvode pojam luminal C karcinoma, kao podskupine s najlošijim ishodom (78). U ovoj skupini, neovisno o ekspresiji ER i PR, uočila se ekspresija brojnih gena inače karakterističnih za trostruko negativne te HER2 pozitivne karcinome.

Dvorkin-Gheva i Hassell su ustanovili da molekularnim profiliranjem gena u različitim karcinomima dojke ostaje i do 35 % karcinoma koji se ne mogu svrstati niti u jednu od određenih pet podvrsta tumora te spominju zasebnu podvrstu - „luminal-like“ tumore, koji su u oko 95 % slučajeva karakterizirani s visokom ekspresijiom ER i PR gena (79). Ova skupina jasno se razlikuje od predhodno spomenute luminal C podvrste, i iako imaju nisku razinu amplifikacije HER2, transkripcijski profili gena slični s luminalnim A i B podtipom ustanovljeni su samo u oko 25 % slučajeva. Kliničkim praćenjem ustanovili su da ova skupina pacijenata ima bolji ishod od trostruko negativnih karcinoma, ali lošiji od luminalnog A podtipa. Veliki dio ovih tumora, u svakodnevnoj rutinskoj praksi određen imunohistokemijskom metodom, zasigurno se svrstava u luminalne B karcinome, a oni bi mogi činiti podskupinu rezistentniju na onkološku terapiju, s lošijom prognozom i ishodom bolesti.

Iako su Američko društvo za kliničku onkologiju (American Society of Clinical Oncology , ASCO) i Američko društvo za patologiju (College of American Pathologist,CAP) preporučili da se status ER smatra pozitivnim ako je 1 % ili više tumorskih stanica pokazuje nuklearni pozitivitet imunohistokemijskim bojanjem, također preporučuju i semikvantitativnu procjenu rezultata imunohistokemijskog bojanja (H-score ili Allreadova metoda) (72) i time daju značaj određivanja intenziteta i rasporeda pozitiviteta ER i PR receptora. Poznato je da se kod pozitivnih hormonskih receptora daje hormonska terapija, a samo se pojedinim pacijenticama s pozitivnim hormonskim receptorima daje i dodatna kemoterapija, najvećim djelom u ovisnosti od bioloških karakteristika tumora. Uz to, nameće se i pitanje učinka endokrine terapije na tumore koji imaju pozitivan ali niski intenzitet hormonskih receptora. Nove studije dodatno ukazuju na klinički značaj semikvantitativnog određivanja pozitiviteta hormonskih receptora, s tezom da slabija ekspresija hormonskih receptora može, uz ostale parametre, biti kriterij za uključenje kemoterapije (80).

Stoga su zanimljiv  nedavna istraživanja luminalnih B karcinoma koji su slabije pozitivni na hormonske receptore, ili negativni na jedan od njih. Tako Gloyeske i autori u svom radu dokazuju da luminal B sa niskim ER intenzitetom morfološki, ali i odgovorom na kemoterapiju, više nalikuju trostruko negativnim karcinomima (81). Park i autori prikazuju populaciju karcinoma negativnih na jedan od hormonskih receptora kao podgrupu luminalnih B (HER2 negativnih) karcinoma s lošijom prognozom (82). Dokazano je također da luminalni B karcinomi s niskom razinom ekspresije ER imaju lošiji kompletni patološki odgovor nakon neoadjuvantne kemoterapije, u odnosu na karcinome sa visokom ekspresijom, te da je odgovor na neoadjuvantnu kemoterapiju vrlo sličan ER negativnim tumorima, ali samo u skupini luminalnnih B  HER2 negativnih karcinoma (83).

U ovom istraživanju svi izabrani tumori bili su pozitivni na ER, a u devet uzoraka nije se detektirala niti jedna tumorska stanica pozitivna na PR.

Analizom Kaplan-Meier krivulja za ukupno preživljenje kao i preživljenje bez povrata bolesti ističe se bitan prognostički značaj ekspresije ER i PR. Dokazano je da je niži intenzitet ili negativnost jednog od receptora povezan sa lošijim ishodom bolesti. Ovaj rezultat u skladu je sa do sada navedenim podatcima iz literature i naglašava kako važnost semikvantitativnog određivanja hormonskih receptora tako i važnosti intenziteta hormonskih receptora kao dodatnog čimbenika u odluci o adjuvantnoj kempterapiji.

Analizom korelacije vrijednosti ER i PR te Ki-67 sa ostalim kliničkopatološkim parametrima uočena je statistički značajna povezanost samo sa gradusom tumora, odnosno tumori sa slabijim intenzitetom ER i PR te višim Ki-67 proliferacijskim indeksom bili su

statistički značajno višeg gradusa. S obzirom na ove rezultate može se nadovezati i zaključak da u skupini hormonski slabije pozitivnih tumora i onih sa višom Ki-67 proliferacisjkim indeksom, histološki gradus tumora možer biti važan parametar za procjenu u odluci o agresivnijoj onkološkoj terapiji, u odnosu na druge parametre kao što su veličina tumora ili zahvaćenost pazušnih limfnih čvorova.

Iz ovoga proizlazi da neovisno o molekularnim analizama i delikatnom genetskom profiliranju, koje neupitno postaje neophodno u bliskoj budućnosti za analizu i dijagnostiku malignih tumora, i dalje ostaje velika potreba za bazičnim patohistološkim pregledom tumorskog tkiva i što detaljnijoj procjeni parametara (izgled jezgre, broj mitoza i arhitektura tumora) bitnih za dodjelu gradusa pojedinom tumoru.

Za razliku od ER i PR, Ki-67 proliferacijski indeks u ovoj analizi nije pokazao statistički značajnu povezanost u odnosu na ukupno i preživljenje bez povrata bolesti. Iako je Ki-67 proliferacijski indeks tradicionalno poznati pokazatelj agresivnog ponašanja određenog tumora, i neophodan za odjeljivanje luminalnih A od luminalnih B karcinoma, u ovoj skupini ispitanika nije se pokazao kao relevantan za predviđanje ishoda bolesti. Navedeni rezultat govori u prilog činjenici da u ovoj skupini tumora očito postoje drugi parametri koji određuju maligni potencijal tumora, a on nije vezan za samu proliferacijsku aktivnost tumorskih stanica.

EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) meta-analiza dokazala je da tamoxifen produžuje vrijeme do pojave relapsa bolesti u ER pozitivnih tumora, neovisno o statusu PR. S druge strane Cancello i autori u svom istraživanju pokazuju povezanost negativnih PR sa visokim rizikom od relapsa bolest (84). Nadalje, Yu Zong i autori pokazali su da luminal B (HER2 negativni) tumori imaju veći rizik od pojave udaljenih metastaza kada su negativni na PR, čak i uz adekvatno i kompletno provedenu endokrinu i adjuvantnu kemoterapiju. (85)

Univarijantnom i multivarijantnom Cox-ovom analizom, u ovom istraživanju, potvrđena je važnost intenziteta PR za procjenu ishoda bolesti, i za razliku od ER i Ki-67 proliferacijskog indeksa, uočena je statistički značajna povezanost ekspresije PR u odnosu na sveukupno preživljnje i preživljenje bez povrata bolesti. Stoga se nameće zaključak da je ekspresija PR bitna za procjenu ishoda bolesti u skupini luminalnih B HER 2 negativnih karcinoma, a PR prognostički čimbenik neovisan o drugim parametrima kao što je dob, ER ili Ki-67 proliferacijski indeks.

### 6.3. Prognostička vrijednost ekspresije Nectina-4

Unazad nekoliko godina Nectin-4 se dokazuje kao prognostički i terapijski marker za karcinome dojke (9), također i za karcinome jajnika (11) i pluća (12).

Kod karcinoma dojke općenito, dokazana je povezanost razine ekspresije Nectina-4 sa višim gradusom tumora, veličinom tumora i statusom limfnih čvorova, slabije pozitivnim ili negativnim ER i PR a također i sa ekspresijom HER2 receptora (9). Nectin-4 se generalno u karcinomima dojke neovisno o molekularnom podtipu pokazao i kao prognostički biljeg, njegova ekspresija je u izravnoj korelaciji sa sveukuopnim preživljenjem kao i preživljenjem bez povrata bolesti. Vrlo je važan i podatak da se Nectin-4, kod ekspresije u tumorskom tkivu može detektirati i u serumu pacijenata (8) pa je mjerenjem serumske razine Nectina-4 moguće pratiti i evidentirati eventualnu progresiju bolesti.

U ovoj studiji, unutar ispitane skupine tumora i Kaplan-Meier krivuljama preživljenja, ali i Coxovom univarijantnom i multivarijantnom analizom, jasno se statistički dokazala povezanost ekspresije Nectin-4 proteina i sa sveukupnim preživljenjem (OS), kao i preživljenjem bez povrata bolesti (DFS), preživljenjem bez pojave udaljenih metastaza (DRFS). Stoga je potvrđen dio hipoteze da je Nectin-4 bitan prognostički pokazatelj u ovoj skupini tumora, ali neovisan o hormonskom statusu ili Ki-67 proliferacijskoj aktivnosti.

Nije se dokazala statistički značajna povezanost Nectina-4 sa pojavom lokalnih recidiva (LRFS), na temelju čega možemo zaključiti da je ekspresija Nectina-4 vezna više za metastatski potencijal tumorskog tkiva u odnosu na njegovo lokalno širenje.

Kod pacijenata s luminalnim B HER2 negativnim karcinomom dojke postavlja se pitanje adjuvantne kemoterapije, koja očito pojedinim pacijetnima zbog agresivnijeg tijeka bolesti treba. Uz već određene smjernice (histološki gradus 3, jedan ili više pozitivnih limfnih čvorova, limfovaskularna invazija i niska razina hormona)(74, 86), Nectin-4 se može iskoristiti kao vrijedan parametar u odabiru ove skupine pacijenata.

### 6.4. Povezanost Nectina-4 s ostalim prognostičkim parametrima

U studiji Fabre-Lafay i suradnika ekspresija Nectina-4 uspoređena je sa ekspresijom pojedinih proteinskih markera u 52 rana karcinoma dojke (55). Izabrani su proteini bili bazalnog (EGFR, P53 i P-cadherin) ili luminalnog tipa (ER, PR, GATA3) (87–89). Također su analizirane ekspresije ERBB2 i Ki-67 proliferacijskog markera. Nectin-4 je identificiran u skupini proteina EGFR, P53 i P-catherina, dok je ekspresija Nectina-4 bila u negativnoj

korelaciji sa proteinima luminalne skupine (ER, PR, GATA3). Statistički značajna, iako niža korelacija ustanovljena je sa ERBB2, Ki67, E-cadherinom and β-cateninom. Sveukupno, ekspresija Nectina-4 dokazana je u 7 od 8 tumora negativnih na ER i PR i, iako se Nectin-4 opisuje kao tumor marker u duktalnim invazivnim karcinomima, u spomenutim istraživanjima njegova ekspresija bila je povezana više sa „basal-like“ podtipom.

Iz slika 5.14 i 5.15. vidljivo je da je raspodjela intenziteta ER i PR podjednaka za sve skupine Nectina-4, te nije utvrđena jača ekspresija Nectina-4 kod hormonski slabije pozitivnih tumora, što znači da su u relativno jednakom omjeru pozitivitet na Nectin-4 imali i tumori sa višom kao i tumori sa nižom ekspresijom hormoskih receptora.

Iz toga proizlazi da nije moguće izdvojiti podskupinu tumora karakteriziranu niskom razinom hormona a istovremeno visokom ekspresijom Nectina-4, zbog relativno pravilne raspodjele pozitiviteta hormonskih receptora u svim skupinama Nectina-4. Nadalje, unatoč navedenoj studiji Fabre-Lafay i autora, gdje se pozitivitet Nectina-4 više veže za bazalnu, hormonski negativnu skupinu karcinoma dojke, zbog ujednačene raspodjele intenziteta hormonskih receptora, ispitivana luminal B skupina karcinoma koja obuhvaća hormonski pozitivne tumore, jednako je podobna za analizu ekspresije Nectina-4.

Također, razdioba Ki-67 proliferacijske aktivnosti, jednaka je za sve skupine Nectina-4. (Slika 5.16). Iz toga proizlazi da pacijenti koji imaju jači intenzitet Nectina-4 ne moraju i biti oni čiji tumori imaju visoku Ki-67 proliferacijsku aktivnost te da proliferacijska aktivnost, kao naznaka agresivnijeg ponašanja pojedinog tumora, nije vezana za ekspresiju Nectina-4.

S obzirom na navedeno, dio postavljene hipoteze da će Nectin-4 pozitivniji tumori imati nižu ekspresiju hormonskih receptora i višu Ki-67 proliferacijsku aktivnost u ovom istraživanju nije potvrđena. Zbog toga na temelju ovoga istraživanja nije moguće izdvojiti skupinu pacijenata s tumorima lošijih prognostičkih karakteristika koje bi se temeljile na kombinaciji niskih razina pozitiviteta hormnonskih receptora i ujedno visoke proliferacijske aktivnosti i visoke ekspresije Nectina-4.

Kako u ovoj skupini tumora Kaplan-Meier analizom nije dokazana povezanost Ki-67 proliferacijske aktivnosti sa ishodom bolesti, ovaj je nalaz očekivan.

No, Kaplan-Meier analizom dokazan je prognostički utjecaj ER i PR, također i Nectina-4 na ishod bolesti, zbog čega se može postaviti teza da tumori sa slabijim intenzitetom ER i PR i oni sa višom ekspresijom Nectina- 4 predstavljaju zasebne, međusobno neovisne skupine tumora. Statističkom analizom prethodno navedenih i ispitivanih prognostičkih čimbenika, u ovom istraživanju, ustanovljena je značajna povezanost Nectina-4 jedino sa veličinom tumora, što znači da su Nectin-4 pozitivniji tumori bili oni većih dimenzija. Ovime se može

dodatno naglasiti već spomenuta važnost veličine tumora kao prognostičkog čimbenika, a posebno u skupini tumora sa većom ekspresijom Nectina-4.

Zanimljivo je da ostali, tradicionalno uvaženi prognostički faktori kod karcinoma dojke kao što su gradus tumora, histološki podtip, dob pacijenta, i pozitivitet pazušnih limfnih čvorova nisu statistički značajno povezani sa ekspresijom Nectina-4.

Može se reći da je Nectin-4 bitan prognostički pokazatelj, i da je neovisan o većini drugih prognostičkih čimbenika, zbog čega postoji mogućnost da bi prethodno spomenuti tumori koji unatoč povoljnim prognostičkim kriterijima imaju rane metastaze i loši ishod bolesti, mogli biti baš oni koji imaju raznoliki pozitivitet hormonkih receptora i Ki-67 proliferacijske aktivnosti, ali izraženu ekspresiju Nectina-4.

### 6.5. Nectin-4 kao tumorski biljeg u terapiji onkolitičkim virusima

Virus ospica je RNA virus, a na svojoj površini ima dva glikoproeina: fuzijski (F) i hemaglutininski (H), koji su odgovorni za prijanjanje i spajanje virusa za ciljanu stanicu (90,91). Infeckija virusom ospica počinje putem interakcije H proteina za receptor ciljane stanice, tada se aktivira F protein, koji je medijator fuzije membrana i ulaska virusa u stanicu. Ekspresija tih istih F i H proteina na zaraženoj stanici uzrokuje spajanje većeg broja stanica i stvaranje tzv. scincicija (92, 93), koji su metabolički aktivni i povećavaju citotoksičnost virusa (94, 95).

Virus ospica (MV) je visoko kontagiozan, prenosi se aerosolom a njime se zarazi oko 10 milijuna djece svake godine. Odgovoran je za oko 120.000,00 smrti u svijetu 2012. godine (96).

Pojava zaraze u nevakciniranoj populaciji Europe i Sjeverne Amerike (97) podsjeća nas da je MV visoko kontagiozan, ali stanični receptori njegovog širenja dugo su bili nepoznanica. U potrazi za staničnim receptorom za virus ospica 1954. Enders i Peebles izolirali su laboratorijski tip virusa koji je dobio naziv po pacijentu (Edmoston) (98, 99), a koristi se za procjepljivanje. No, u novije vrijeme sve više se istražuje divlji tip virusa ospica („wild type MV“) (100).

Jednom kada je virus inhaliran veže se za SLAM (signalna limfocitna aktivacijska molekula) ili CD 150, koja se nalazi na površini aktiviranih T i B limfocita, monocita i dendritičkih stanica (101–103).

Nakon opsežnog umnožavanja u SLAM- pozitivnim stanicama unutar limfatičkih organa, cirkulirajuće SLAM pozitivne stanice dovode virus do ciljanih epitelnih stanica. Dugo je receptor na epitelnim stanicama i način ulaska virusa u stanicu bio nepoznanica. Od brojnih istraživanih potencijalnih staničnih receptora samo je Nectin-4 poznat i kao PVRL-4 pokazao stabilnost, adekvatnu konverziju prethodno rezistentnih stanica te pripremu za ulazak virusa (104). Brojnim, novijim istraživanja, u odraslih osoba je osim u tkivu posteljice uočena i ekspresija Nectina-4 i u epitelnim stanicama dišnog sustava, najvećim djelom epitelnih stanica dušnika (102, 103). Nasuprot tome, jaka i difuzna ekspresija Nectina- 4 dokazana je u brojnim karcinomima kao što su pluća, dojka, debelo crijevo i jajnici (52, 53, 105–107).

U istraživanju Brajes i autora (108) prikazano je da se određeni proteini na površini stanice koja prenosi MV, vežu sa Nectin-4 receptorom na stranama respiratornog cilindričnog epitela. Ova interakcija izaziva odmotavanje virusnih trimer proteina i otvara intercelularne pore, čime se omogućuje ulazak virusa u stanicu. Poznato je da su Nectini transmembranski glikoproteini čiji je citoplazmatski nastavak povezan sa unutarstaničnim proteinom afadinom (109). Afadin potom aktivira F- actin, čime se može objasniti brzo širenje virusa nakon infekcije epitelnih stanica.

Umetanje gena za tumor specifične ligande pojedinih tumorskih antigena, inženjering virusa sa stvaranjem sintetičke mikro RNA ciljane sekvence, i osljepljivanje virusa na prirodne receptore u organizmu samo su neke od uspješnih metoda da se povisi specifičnost djelovanja virusa i pojača onkolitički efekt na tumorsku stanicu (110). Pri tome je antivirusna zaštita domaćina značajna prepreka za ovu vrstu terapije, a pristupi koji uključuju transport MV do tumorske stanice, te epitelni receptori koji omogućuju neometani ulazak virusa u stanicu postaju izuzetno važni.

Trenutno su u tijeku 7 kliničkih studija u ranoj fazi koja aktivno ispituju genetski modificirano cijepivo MV u tretmanu karcinomima jajnika, mijelomu, kožnom Non Hodgkin limfomu, sa Nectinom-4 kao receptorom na tuorskim stanicama. U ovim studijama bilježe se pozitivni rezultati i unatoč prisutnim postojećim protutijelima na virus ospica dobivenih prethodnom imunizacijom (110).

## 7. Zaključci

Temeljem prikazanih rezultata, a s obzirom na postavljenje ciljeve i hipotezu može se zaključiti slijedeće:

- U ispitivanoj skupini tumora (luminalnih B HER2 negativnih karcinoma dojke), pozitivno je bilo sveukupno 112 (76,19 %) tumora, od čega su 76 (51,07 %) bili duktalnog invazivnog podtipa, 17 (11,5 %) su bili lobularni invazivni a ostali (19 (12,9 %)) su bili ostalih rijeđih histoloških podtipova a pozitivitet je bio citoplazmatski. Ovi podatci sukladni su onima iz literature vezanim za raspored pozitiviteta Nectina-4 u karcinomima dojke.
- U skupini luminal B (HER 2 negativnih) karcinoma na sveukupno preživljenje kao i preživljenje bez povrata bolesti bitno utječe ekspresija ER i PR, za razliku od Ki-67 koji se u ovoj skupini nije pokazao kao statistički relevantan prognostički pokazatelj. Progestereron se u Cox-ovoj regresijskoi univarijantnoj i multivarijantnoj analizi pokazao kao statistički značajan neovisni prametar za sveukupno preživljenje i preživljenje bez povrata bolesti. S obzirom na sve prethodno navedeno proizlazi da je podskupina luminalnih B (HER2 negativnih) karcinoma dojke sa nižim intenzitetom pozitiviteta na ER i PR ili negativnim jednim od receptora, a neovisno o Ki-67 proliferacijskom faktoru, ona sa lošijim ishodom bolesti i agresivnijim tijekom.
- Nectin- 4 u ovom istraživanju je statistički zančajnu povezanost imao samo sa veličinom tumora tj. tumori većih dimenzija imali su višu ekspresiju Nectina-4, čime se naglašava važnost veličine tumora kao prognostičkog čimbenika.
- Nije dokazana statistički značajna korelacija Nectina-4 sa ostalim parametrima, uključujući Ki-67 proliferacijski indeks kao i razinu intenziteta hormonskih receptora. Stoga nije potvrđen dio hipoteze da je Nectin-4 pozitivniji kod tumora sa višom proliferacijskom aktivnošću te hormonski slabije pozitivnih tumora. Zbog približno podjednake raspodjele pozitiviteta hormonskih receptora u svim podskupinama ekspresije Nectina-4, može se zaključiti da je luminal B (HER2 negativna) skupina dobar uzorak za analizu Nectin-4 ekspresije unutar tumorskih stanica. Također, u ovoj skupini tumora nemoguće je odvojiti ciljanu podskupinu koja bi istovremeno uz slab intenzitet receptora imala i visoku razinu ekspresije Nectina-4 te bila ona sa agresivnijim tijekom bolesti i lošijim ishodom.
- Nektin-4 je u skupini luminalnih B (HER2 negativnih) karcinoma dojke bitan prognostički pokazatelj; Kaplan-Meier analizom kao i Coxovim regeresijskim modelom dokazana je statistički značajna povezanost sa ukupnim preživljenjem kao i preživljenjem bez

povrata bolesti, te bi se uz ostale biološke karakteristike tumora (veličina, gradus, zahvaćenost limfnih čvorova) Nectin-4 mogao svrstati kao bitan parametar u odluci o adjuvantnoj kemoterapiji.

- Kao receptor za virus ospica, Nectin-4 važan je i kao terapijski tumor marker. U svrhu potencijalne, buduće terapije onkollitičkim virusima, imunohistokemijsko određivanje ekspresije Nectina-4 u luminalnim B HER2 negtivnim karcinomima (uključujući i skupinu sa niskom ekspresijom hormonskih receptora, ili drugim lošijim prognostičkim parametrima), moglo bi postati dio rutinske patohistološke dijagnostike.
- Nectin-4 je važan novi tumor povezani antigen unutar populacije pacijenata sa karcinomom dojke. Zbog dokazane jake prognostičke vrijednosti, njegova implementacija može pomoći u redefiniranju podjele karcinoma dojke sa stvaranjem podskupina unutar luminalnih B (HER2 negativnih) karcinoma, čime bi se bolje prilagodila onkološka terapija te poboljšao ishod bolesti.
- Zbog svega navedenog, potrebne su dodatne potvrde i dodatna istraživanja točne uloge te biološkog utjecaja Nectina-4 unutar drugih podtipova karcinoma dojke, ali i malignih tumora drugih primarnih sjela.

## 8. Sažetak

**Cilj istraživanja**: Istražiti povezanost ekspresije Nectin-4 proteina u populaciji pacijenata s luminalnim B HER2 negativnim podtipom karcinoma dojke a u korelaciji sa prognostičkim parmetrima kao što su intenzitet hormonskih receptora, Ki-67 proliferacijski indeks, dob, veličiina i histološki gradus tumora te zahvaćenost pazušnih limfnih čvorova.

**Materijal i metode**: Ispitivana je skupina od 147 pacijenata operiranih u KBC Osijek sa unilateralnim karcinomom dojke bez dokazanih udaljenih metastaza, koji se prema najnovijoj St. Gallenskoj klasifikaciji svrstavaju u luminalnu B HER2 negativnu podskupinu. Korištenjem arhivskih parafinskih kocaka učinjeno je imunohistokemijsko bojanje antitijelom na Nektin-4 protein, a rezultati su korelirani sa kliničkim podatcima uz Kaplan-Meier krivulje te Cox-ovu regresijsku analizu.

**Rezultati:** Dokazana je statistički značajna povezanost ekspresije Nektina-4 sa veličinom tumora ($p<0.05$; Chi-Square Test) te negativna povezanost ukupnim preživljenjem, prežvljenjem bez bolesti, te preživljenjem bez pojave udaljenih metastaza ($p<0,001$; Kaplan-Meier). U Cox-ovoj univarijantnoj i multivarijantnoj analizi pokazao se kao statistički značajan nezavisni faktor za sveukupno preživljenje i preživljenje bez povrata bolesti ($p<0,001$). Nije uočena statistički značajna povezanost ekspresije Nektina-4 sa dobi, ekspresijom estrogenskih i progesteronskih receptora, zahvaćenošću pazušnih limfnih čvorova, diferencijacijom tumora, histološkim tipom i Ki-67 proliferacijskim indeksom.

**Zaključak:** Nectin-4 je važan prognostički pokazatelj te potencijalna meta za nove terapijske metode u liječenju luminalnih B HER2 negativnih karcinoma dojke.

Ključne riječi: karcinom dojke; Nectin-4; St. Gallen; luminal B; preživljenje

## 9. Summary

**Expression of Nectin-4 protein in luminal B (HER2 negative) breast cancer**

*Objectives*: The aim of this study was to evaluate an expression of Nectin-4 in luminal B (HER2 negative) breast cancer, in correlation with other prognostic parameters as hormone positivity, Ki-67 proliferation index, age, tumor size, histological grade and axillary lymph node status.

*Patients and methods:* In this retrospective study clinical and pathological parameters of 147 luminal B (HER2 negative) breast cancers have been examined from the patients who had undergone a surgery at the University Hospital Osijek. These patients were presenting with primary unilateral breast cancer with no evidence of distant metastasis. Nectin-4 protein expression was assessed by immunohistochemistry and the results were correlated with the clinical data using Kaplan–Meier curves and univariante and multivariate stepwise proportional-hazard analysis (Cox model).

*Results:* Nectin-4 overexpression was significantly correlated with tumor size ($p<0.05$; Chi-Square Test), also Nectin-4 expression was negatively associated with overall survival, disease free survival and distant relapse free survival with the same significance ($p<0,001$; Kaplan-Meier). Cox analysis has shown statistically significant correlation between Nectin-4 and overall and disease free survival ($p<0,001$). Statistically significant correlation between Nectin-4 and age, ER, PR, age, lymph node metastasis, tumor differentiation, histological subtype and Ki-67 proliferation index was not found.

*Conclusion:* Nectin-4 is relevant prognostic factor and a therapeutic target in luminal B (HER2 negative) breast cancer.

Key words: breast cancer; Nectin-4; St. Gallen; luminal B; overall survival

## 10. Literatura


1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011 Apr;61(2):69–90.
2. Bilten-2014_final.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 17]. Available from: http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2014_final.pdf
3. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ. 2000 Sep 9;321(7261):624–8.
4. Kuller LH. The etiology of breast cancer--from epidemiology to prevention. Public Health Rev. 1995;23(2):157–213.
5. Radford DM, Zehnbauer BA. Inherited breast cancer. Surg Clin North Am. 1996 Apr;76(2):205–20.
6. Garber J. Breast Cancer Markers: Genetic Markers of Breast Cancer Predisposition. In: Perry M C, editor. Washington, Bos.
7. Nason FG, Nelson BE. Estrogen and progesterone in breast and gynecologic cancers. Etiology, therapeutic role, and hormone replacement. Obstet Gynecol Clin North Am. 1994 Jun;21(2):245–70.
8. Bagga D, Ashley JM, Geffrey SP, Wang HJ, Barnard RJ, Korenman S, et al. Effects of a very low fat, high fiber diet on serum hormones and menstrual function. Implications for breast cancer prevention. Cancer. 1995 Dec 15;76(12):2491–6.
9. Kumar NB, Lyman GH, Allen K, Cox CE, Schapira DV. Timing of weight gain and breast cancer risk. Cancer. 1995 Jul 15;76(2):243–9.
10. Frisch RE, Gotz-Welbergen AV, McArthur JW, Albright T, Witschi J, Bullen B, et al. Delayed menarche and amenorrhea of college athletes in relation to age of onset of training. JAMA. 1981 Oct 2;246(14):1559–63.
11. Rookus MA, van Leeuwen FE. Oral contraceptives and risk of breast cancer in women aged 20-54 years. Netherlands Oral Contraceptives and Breast Cancer Study Group. Lancet Lond Engl. 1994 Sep 24;344(8926):844–51.
12. Brinton A, Devesa SS. Environmental Factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. Disease of the Breast. Phil.
13. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. J Natl Cancer Inst. 1993 Nov 17;85(22):1819–27.

14. Halbreich U, Shen J, Panaro V. Are chronic psychiatric patients at increased risk for developing breast cancer? Am J Psychiatry. 1996 Apr;153(4):559–60.
15. WHO Classification of Tumours of the Breast, Fourth Edition - WHO - OMS - [Internet]. [cited 2017 Apr 17]. Available from: http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4004
16. Bloom HJG, Richardson WW. Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer. Br J Cancer. 1957 Sep;11(3):359–77.
17. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2002 Sep 1;20(17):3628–36.
18. Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2008 Dec 10;26(35):5697–704.
19. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
20. Perreard L, Fan C, Quackenbush JF, Mullins M, Gauthier NP, Nelson E, et al. Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. Breast Cancer Res. 2006;8(2):R23.
21. Network TCGA. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2012 Oct 4;490(7418):61–70.
22. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2010 Apr 1;28(10):1684–91.
23. Rosen PP. Rosen's Breast Pathology. Lippincott Williams & Wilkins; 2001. 1014 p.
24. 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 Jan 1;100(1):20–7.
25. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer. 1989 Jan 1;63(1):181–7.
26. Kollias J, Murphy CA, Elston CW et al. The prognosis of small primary breast cancers, Eur J Cancer 1999;35:908–912.

27. Pinder SE, Murray S, Ellis IO, Trihia H, Elston CW, Gelber RD, et al. The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. Cancer. 1998 Oct 15;83(8):1529–39.
28. Frkovic-Grazio S, Bracko M. Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. J Clin Pathol. 2002 Feb;55(2):88–92.
29. NCCN - National Comprehensive Cancer Network: Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidlines) Breast Cancer. V.
30. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Fernö M, Fuqua SA, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. Cancer Res. 1990 Jul 15;50(14):4332–7.
31. Winstanley J, Cooke T, Murray GD, Platt-Higgins A, George WD, Holt S, et al. The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer. Br J Cancer. 1991 Mar;63(3):447–50.
32. Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, Paterson AH, Lees AW, Jamil N, et al. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. Cancer Res. 1991 Jan 15;51(2):556–67.
33. Clark GM, McGuire WL. Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. Cancer Res. 1991 Feb 1;51(3):944–8.
34. Jakić-Razumović J, Unušić J. Patohistološka analiza aksilarnih limfnih čvorova s posebnim osvrtom na postupak kod biopsi.
35. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. Cancer. 1983 Nov 1;52(9):1551–7.
36. Cote RJ, Fpeterson H, Chaiwun B, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglione-Gertsch M, et al. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. The Lancet. 1999 Sep 11;354(9182):896–900.
37. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. Br J Cancer. 2007 May 21;96(10):1504–13.
38. Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Doyle PJ, Campbell FC, et al. A prognostic index in primary breast cancer. Br J Cancer. 1982 Mar;45(3):361–6.

39. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. J Cell Physiol. 2006 Mar;206(3):624–35.
40. Rahmanzadeh R, Hüttmann G, Gerdes J, Scholzen T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. Cell Prolif. 2007 Jun;40(3):422–30.
41. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2005 Oct 1;23(28):7212–20.
42. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. 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 Off J Eur Soc Med Oncol. 2013 Sep;24(9):2206–23.
43. Sakisaka T, Takai Y. Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. Curr Opin Cell Biol. 2004 Oct;16(5):513–21.
44. Sakisaka T, Ikeda W, Ogita H, Fujita N, Takai Y. The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. Curr Opin Cell Biol. 2007 Oct;19(5):593–602.
45. Yasumi M, Shimizu K, Honda T, Takeuchi M, Takai Y. Role of each immunoglobulin-like loop of nectin for its cell–cell adhesion activity. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Feb 28;302(1):61–6.
46. Yamada A, Fujita N, Sato T, Okamoto R, Ooshio T, Hirota T, et al. Requirement of nectin, but not cadherin, for formation of claudin-based tight junctions in annexin II-knockdown MDCK cells. Oncogene. 2006 Apr 10;25(37):5085–102.
47. Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W, Takai Y. Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. Semin Cell Dev Biol. 2004 Dec;15(6):643–56.
48. Nakanishi H, Takai Y. Roles of nectins in cell adhesion, migration and polarization. Biol Chem. 2004 Oct;385(10):885–92.
49. Reymond N, Fabre S, Lecocq E, Adelaïde J, Dubreuil P, Lopez M. Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. J Biol Chem. 2001 Nov 16;276(46):43205–15.
50. Reymond N, Borg J-P, Lecocq E, Adelaide J, Campadelli-Fiume G, Dubreuil P, et al. Human nectin3/PRR3: a novel member of the PVR/PRR/nectin family that interacts with afadin. Gene. 2000 Sep 19;255(2):347–55.

51. Lattanzio R, Ghasemi R, Brancati F, Sorda RL, Tinari N, Perracchio L, et al. Membranous Nectin-4 expression is a risk factor for distant relapse of T1-T2, N0 luminal-A early breast cancer. Oncogenesis. 2014 Sep;3(9):e118.
52. Derycke MS, Pambuccian SE, Gilks CB, Kalloger SE, Ghidouche A, Lopez M, et al. Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. Am J Clin Pathol. 2010 Nov;134(5):835–45.
53. Takano A, Ishikawa N, Nishino R, Masuda K, Yasui W, Inai K, et al. Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. Cancer Res. 2009 Aug 15;69(16):6694–703.
54. Astellas Pharma Inc A Phase 1 Study of the safety and pharmacokinetics of escalating doses of AGS-22M6E or ASG-22CE give.
55. Fabre-Lafay S, Monville F, Garrido-Urbani S, Berruyer-Pouyet C, Ginestier C, Reymond N, et al. Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. BMC Cancer. 2007;7:73.
56. Fabre S, Reymond N, Cocchi F, Menotti L, Dubreuil P, Campadelli-Fiume G, et al. Prominent role of the Ig-like V domain in trans-interactions of nectins. Nectin3 and nectin 4 bind to the predicted C-C'-C"-D beta-strands of the nectin1 V domain. J Biol Chem. 2002 Jul 26;277(30):27006–13.
57. Pavlova NN, Pallasch C, Elia AEH, Braun CJ, Westbrook TF, Hemann M, et al. A role for PVRL4-driven cell-cell interactions in tumorigenesis. eLife. 2013 Apr 30;2:e00358.
58. Kinugasa M, Amano H, Satomi-Kobayashi S, Nakayama K, Miyata M, Kubo Y, et al. Necl-5/poliovirus receptor interacts with VEGFR2 and regulates VEGF-induced angiogenesis. Circ Res. 2012 Mar 2;110(5):716–26.
59. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. Nat Immunol. 2009 Jan;10(1):48–57.
60. Escalante NK, von Rossum A, Lee M, Choy JC. CD155 on human vascular endothelial cells attenuates the acquisition of effector functions in CD8 T cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 May;31(5):1177–84.
61. Levin SD, Taft DW, Brandt CS, Bucher C, Howard ED, Chadwick EM, et al. Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. Eur J Immunol. 2011 Apr;41(4):902–15.

62. Stanietsky N, Rovis TL, Glasner A, Seidel E, Tsukerman P, Yamin R, et al. Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR. Eur J Immunol. 2013 Aug;43(8):2138–50.
63. Liu J, Qian X, Chen Z, Xu X, Gao F, Zhang S, et al. Crystal structure of cell adhesion molecule nectin-2/CD112 and its binding to immune receptor DNAM-1/CD226. J Immunol Baltim Md 1950. 2012 Jun 1;188(11):5511–20.
64. Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L, Lopez M. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. Rev Med Virol. 2000 Oct;10(5):305–19.
65. Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. Virology. 2000 Sep 15;275(1):1–8.
66. Cocchi F, Lopez M, Menotti L, Aoubala M, Dubreuil P, Campadelli-Fiume G. The V domain of herpesvirus Ig-like receptor (HIgR) contains a major functional region in herpes simplex virus-1 entry into cells and interacts physically with the viral glycoprotein D. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 22;95(26):15700–5.
67. Krummenacher C, Rux AH, Whitbeck JC, Ponce-de-Leon M, Lou H, Baribaud I, et al. The first immunoglobulin-like domain of HveC is sufficient to bind herpes simplex virus gD with full affinity, while the third domain is involved in oligomerization of HveC. J Virol. 1999 Oct;73(10):8127–37.
68. Stengel KF, Harden-Bowles K, Yu X, Rouge L, Yin J, Comps-Agrar L, et al. Structure of TIGIT immunoreceptor bound to poliovirus receptor reveals a cell-cell adhesion and signaling mechanism that requires cis-trans receptor clustering. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Apr 3;109(14):5399–404.
69. Harrison OJ, Vendome J, Brasch J, Jin X, Hong S, Katsamba PS, et al. Nectin ectodomain structures reveal a canonical adhesive interface. Nat Struct Mol Biol. 2012 Sep;19(9):906–15.
70. Delpeut S, Noyce RS, Richardson CD. The tumor-associated marker, PVRL4 (nectin-4), is the epithelial receptor for morbilliviruses. Viruses. 2014 Jun 2;6(6):2268–86.
71. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2013 Nov 1;31(31):3997–4013.

72. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. 1998 Feb;11(2):155–68.
73. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. J Natl Cancer Inst. 2011 Nov 16;103(22):1656–64.
74. Gnant M, Thomssen C, Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2015: A Brief Summary of the Consensus Discussion. Breast Care Basel Switz. 2015 Apr;10(2):124–30.
75. Bratthauer GL. The Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Method. In: Javois LC, editor. Immunocytochemical Methods and Protocols [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 1994 [cited 2017 Apr 17]. p. 165–73. Available from: http://link.springer.com/10.1385/0-89603285-X:165
76. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. Pathol. 1987 May;8(3):138–40.
77. Tran B, Bedard PL. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. Breast Cancer Res BCR. 2011;13(6):221.
78. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
79. Dvorkin-Gheva A, Hassell JA. Identification of a Novel Luminal Molecular Subtype of Breast Cancer. PLOS ONE. 2014 Jul 30;9(7):e103514.
80. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2011 Nov 10;29(32):4273–8.
81. Gloyeske NC, Dabbs DJ, Bhargava R. Low ER+ breast cancer: Is this a distinct group? Am J Clin Pathol. 2014 May;141(5):697–701.
82. Park C, Park K, Kim J, Sin Y, Park I, Cho H, et al. Prognostic values of negative estrogen or progesterone receptor expression in patients with luminal B HER2-negative breast cancer. World J Surg Oncol. 2016;14:244.
83. Landmann A, Farrugia DJ, Diego E, Soran A, Johnson R, Bonaventura M, et al. Low estrogen receptor (ER) positive breast cancer and neoadjuvant systemic therapy (NAT): Is

response similar to ER+ or to ER- disease? J Clin Oncol [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr 19];34(suppl; abstr 580). Available from: http://meetinglibrary.asco.org/content/171694-176

84. Cancello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua MG, Pruneri G, et al. Progesterone receptor loss identifies Luminal B breast cancer subgroups at higher risk of relapse. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2013 Mar;24(3):661–8.

85. Zong Y, Zhu L, Wu J, Chen X, Huang O, Fei X, et al. Progesterone Receptor Status and Ki-67 Index May Predict Early Relapse in Luminal B/HER2 Negative Breast Cancer Patients: A Retrospective Study. PLOS ONE. 2014 Aug 29;9(8):e95629.

86. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. N Engl J Med. 2005 Oct 27;353(17):1784–92.

87. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, Finetti P, Adélaïde J, Cervera N, et al. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. Oncogene. 2006 Apr 6;25(15):2273–84.

88. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2004 Aug 15;10(16):5367–74.

89. Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L, Lakhani SR, Penault-Llorca F, Denoux Y, et al. Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. J Pathol. 2005 Nov 1;207(3):260–8.

90. Griffin DE, Oldstone MBA. Measles. History and basic biology. Introduction. Curr Top Microbiol Immunol. 2009;329:1.

91. Moss WJ, Griffin DE. Global measles elimination. Nat Rev Microbiol. 2006 Dec;4(12):900–8.

92. Navaratnarajah CK, Oezguen N, Rupp L, Kay L, Leonard VHJ, Braun W, et al. The heads of the measles virus attachment protein move to transmit the fusion-triggering signal. Nat Struct Mol Biol. 2011 Feb;18(2):128–34.

93. Long MA, Rossi FMV. Targeted cell fusion facilitates stable heterokaryon generation in vitro and in vivo. PloS One. 2011;6(10):e26381.

94. Galanis E, Bateman A, Johnson K, Diaz RM, James CD, Vile R, et al. Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgenes in gliomas. Hum Gene Ther. 2001;12(7):811–21.

95. Herschke F, Plumet S, Duhen T, Azocar O, Druelle J, Laine D, et al. Cell-Cell Fusion Induced by Measles Virus Amplifies the Type I Interferon Response. J Virol. 2007 Dec 1;81(23):12859–71.
96. Mateo M, Navaratnarajah CK, Cattaneo R. Structural basis of efficient contagion: measles variations on a theme by parainfluenza viruses. Curr Opin Virol. 2014 Apr;5:16–23.
97. Chen SY, Anderson S, Kutty PK, Lugo F, McDonald M, Rota PA, et al. Health Care–Associated Measles Outbreak in the United States After an Importation: Challenges and Economic Impact. J Infect Dis. 2011 Jun 1;203(11):1517–25.
98. Enders JF, Peebles TC. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N. 1954 Jun;86(2):277–86.
99. Enders JF, Katz SL, Milovanovic MV, Holloway A. Studies on an attenuated measles-virus vaccine. I. Development and preparations of the vaccine: technics for assay of effects of vaccination. N Engl J Med. 1960 Jul 28;263:153–9.
100. Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, Hashiguchi T. Measles virus receptors. Curr Top Microbiol Immunol. 2009;329:13–30.
101. Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. Nature. 2000 Aug 24;406(6798):893–7.
102. Ferreira CSA, Frenzke M, Leonard VHJ, Welstead GG, Richardson CD, Cattaneo R. Measles virus infection of alveolar macrophages and dendritic cells precedes spread to lymphatic organs in transgenic mice expressing human signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150). J Virol. 2010 Mar;84(6):3033–42.
103. Lemon K, Vries RD de, Mesman AW, McQuaid S, Amerongen G van, Yüksel S, et al. Early Target Cells of Measles Virus after Aerosol Infection of Non-Human Primates. PLOS Pathog. 2011 Jan 27;7(1):e1001263.
104. Singh BK, Li N, Mark AC, Mateo M, Cattaneo R, Sinn PL. Cell-to-Cell Contact and Nectin-4 Govern Spread of Measles Virus from Primary Human Myeloid Cells to Primary Human Airway Epithelial Cells. J Virol. 2016 Aug 1;90(15):6808–17.
105. Fabre-Lafay S, Garrido-Urbani S, Reymond N, Gonçalves A, Dubreuil P, Lopez M. Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. J Biol Chem. 2005 May 20;280(20):19543–50.
106. Fujiyuki T, Yoneda M, Amagai Y, Obayashi K, Ikeda F, Shoji K, et al. A measles virus selectively blind to signaling lymphocytic activation molecule shows anti-tumor activity against lung cancer cells. Oncotarget. 2015 Sep 22;6(28):24895–903.

107. Awano M, Fujiyuki T, Shoji K, Amagai Y, Murakami Y, Furukawa Y, et al. Measles virus selectively blind to signaling lymphocyte activity molecule has oncolytic efficacy against nectin-4-expressing pancreatic cancer cells. Cancer Sci. 2016 Nov;107(11):1647–52.
108. Singh BK, Hornick AL, Krishnamurthy S, Locke AC, Mendoza CA, Mateo M, et al. The Nectin-4/Afadin Protein Complex and Intercellular Membrane Pores Contribute to Rapid Spread of Measles Virus in Primary Human Airway Epithelia. J Virol. 2015 Jul 15;89(14):7089–96.
109. Meng W, Takeichi M. Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2009 Dec [cited 2017 Apr 19];1(6). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2882120/
110. Aref S, Bailey K, Fielding A. Measles to the Rescue: A Review of Oncolytic Measles Virus. Viruses. 2016 Oct 22;8(10).

## 11. Životopis

**Ime i prezime:** Jasmina Rajc

**Datum i mjesto rođenja:** 16.03.1975. Osijek, Hrvatska

**Adresa stanovanja:** Martina Divalta 92a
31000 Osijek

**Školovanje:**

2007-danas Znanstveni poslijediplomski studij u području biomedicine i zdravstva

2004-2005. Stručni poslijediplomski studij iz patološke anatomije

1993-1999. Studij medicine u Osijeku Medicinskog fakulteta u Zagrebu, Sveučilišta u Zagrebu
(Akademski stupanj/zvanje- doktor medicine)

1989-1993. srednja škola u Osijeku

**Specijalizacija**

2001-2006. patološka anatomija, KB Osijek, KBC Zagreb

**Radno iskustvo:**

2004. liječnik specijalist patološke anatomije

2001-2006. liječnik specijalizant patološke anatomije

**Radno mjesto:** Klinički bolnički centar Osijek
Zavod za patologiju i sudsku medicinu
J.Huttlera 4, 31000 Osijek, Hrvatska
Telefon: 031 511 863
Fax: 031 511 512
E-mail: rajcjasmina@gmail.com

**Nastavna aktivnost:**

2007 g. izbor u naslovno suradničko zvanje asistenta iz znanstvenog područja Biomedicine i zdravstva, znanstvenog polja kliničke medicinske znanosti, znanstvene grane patologija pri Katedri za patologiju i sudsku medicinu na Medicinskom fakultetu u sustavu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

**Članstva:**

2001. Hrvatska liječnička komora

2008. Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti (KROHEM)

2013. Hrvatsko Onkološko Društvo (HOD)