

# Utjecaj polimorfizma gena HER-2/neu na kardiotoksičnost uzrokovanu monoklonskim protutijelom trastuzumabom

---

Vazdar, Ljubica

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:505019>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Ljubica Vazdar

**UTJECAJ POLIMORFIZMA GENA *HER-2/neu*  
NA KARDIOTOKSIČNOST UZROKOVANU  
MONOKLONSKIM PROTUTIJELOM  
TRASTUZUMABOM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ljubica Vazdar

**INFLUENCE OF *HER-2/neu* GENE  
POLYMORPHISM ON MONOCLONAL ANTIBODY  
TRASTUZUMAB INDUCED CARDIOTOXICITY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Klinici za tumore KBC „Sestre milosrdnice“ Zagreb, pod stručnim vodstvom izv. prof. Hrvoja Pintarića u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

## **Zahvala**

Na nesebičnoj pomoći, savjetima i poticajnim razmišljanjima posebna zahvala mentoru izv. prof. Hrvoju Pintariću, kolegama prim. dr. sc. Ivi Darku Gabriću i dr. sc. Ivanu Kruljcu iz KBC „Sestre milosrdnice“.

Zahvala na pomoći prilikom realizacije istraživanja izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić i doc. dr. sc. Mariju Štefanoviću, Klinički zavod za kemiju, Odjel za molekularnu dijagnostiku KBC „Sestre milosrdnice“.

Zahvaljujem djelatnicama Ureda za poslijediplomske studije, Mariji Bićanić i Marini Bošković-Vrbos na ljubaznosti i savjetima.

Zahvaljujem kolegicama i Voditelju Odjela za internističku onkologiju Klinike za tumore prim. dr. sc. Robertu Šeparoviću na poticajnom duhu i pozitivnom radnom okruženju. Posebno hvala Mirjani Pavlović, Ani Tečić-Vuger, Chiari Krstić i Nikolini Vincelj.

Također, veliko hvala svim bolesnicama koje su sudjelovale u istraživanju i tako pridonijele novim saznanjima na obostranu dobrobit.

Zahvalnost mojim roditeljima na životnoj mudrosti, braći na podršci, suprugu na strpljivosti.

**Rad posvećujem mojim sinovima Petru i Dominiku.**

„Prava ljubav razmišlja o trenutku i vječnosti, ali nikada o trajanju.“ (Friedrich Nietzsche)

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

## **UTJECAJ POLIMORFIZMA GENA *HER-2/neu* NA KARDIOTOKSIČNOST UZROKOVANU MONOKLONSKIM PROTUTIJELOM TRASTUZUMABOM**

Ljubica Vazdar

Biološki odsjek Prirodoslovno- matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Malobrojna dosadašnja istraživanja pokazala su dvojbene rezultate utjecaja polimorfizma gena *HER-2/neu* na kardiotsičnost uzrokovanu monoklonskim protutijelom trastuzumabom. Obzirom na izuzetno važan biljeg u onkologiji i mogući čimbenik rizika srčanog oštećenja, nametnula se potreba ovakvog istraživanja. U istraživanje su uključene ispitanice adjuvantno liječene trastuzumabom zbog HER2 pozitivnog ranog raka dojke (n=177). Ispitanice su podijeljene u dvije grupe: grupa A (n=99) kod kojih nije došlo do kardiotsičnosti tijekom liječenja trastuzumabom i grupa B (n=78) kod kojih je došlo do razvoja kardiotsičnosti. Istraženi su rizični čimbenici kao i osobitosti same kardiotsičnosti, vrijeme pojavnosti i oporavka te reverzibilnost. Svim ispitanicama je lančanom reakcijom polimeraze određen polimorfizam gena *HER-2/neu* na kodonu 655 [Ile655Val] te distribucija genotipa Ile/Val, Ile/Ile i Val/Val. Praćenje srčane funkcije ehokardiografijom bilo je u skladu s usvojenim smjericama praćenja. Iz rezultata dobivenih usporedbom grupa A i B nije nađena povezanost između pojedinog genotipa *HER-2/neu* i pojave kardiotsičnosti.

Stranica 148/ slika 46/ tablica 7/ literaturnih navoda 202/ jezik izvornika hrvatski

Ključne riječi: polimorfizam, *HER-2/neu*, trastuzumab, kardiotsičnost

Mentor: izv. prof. dr. sc. Hrvoje Pintarić

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Sonja Levanat

izv. prof. dr. sc. Ana Galov

Doc. dr. sc. Natalija Dedić Plavetić

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

**INFLUENCE OF *HER-2/neu* GENE POLYMORPHISM ON MONOCLONAL  
ANTIBODY TRASTUZUMAB INDUCED CARDIOTOXICITY**

Ljubica Vazdar

Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

A few studies so far have shown doubtful results on influence of *HER-2/neu* gene polymorphism on cardiotoxicity caused by monoclonal antibody trastuzumab. Remarkable importance of this marker in oncology and its place as a possible risk factor for cardiac damage, imposed the need for this kind of research. The study included patients adjuvantly treated with trastuzumab for HER2 positive breast cancer (n = 177). Subjects were divided into two groups: group A (n = 99), which did not experience cardiotoxicity during treatment with trastuzumab and group B (n = 78) which did. Risk factors were investigated as well as the characteristics of cardiotoxicity, time of occurrence and recovery, and reversibility. Polymorphism of the *HER-2/neu* gene on codon 655 [Ile655Val] and Ile/Val, Ile/Ile and Val/Val genotype distribution was determined by polimerase chain reaction in all patients. Heart function monitoring with echocardiography was consistent with the adopted monitoring guidelines. From the results obtained by comparing groups A and B, no correlation was found between *HER-2/neu* genotype and cardiotoxicity.

Pages 148/ Figures 46/ Tables 7/ References 202/ original in croatian language

Keywords: polymorphism, *HER-2/neu*, trastuzumab, cardiotoxicity

Supervisor: Asst. Prof. Hrvoje Pintarić, PhD

Reviewers: Prof. Sonja Levanat, PhD

Assoc. Prof. Ana Galov, PhD

Asst. Prof. Natalija Dedić Plavetić, PhD

## SADRŽAJ

|                                                                                              |          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. UVOD .....</b>                                                                         | <b>1</b> |
| 1.1. Svrha rada .....                                                                        | 1        |
| 1.2. Hipoteza .....                                                                          | 2        |
| 1.3. Specifični ciljevi rada.....                                                            | 3        |
| <br><b>2. PREGLED LITERATURE .....</b>                                                       | <b>4</b> |
| 2.1 Gen <i>HER-2/neu</i> .....                                                               | 4        |
| 2.1.1. Otkriće gena <i>HER-2/neu</i> i kliničke implikacije .....                            | 4        |
| 2.1.2. Amplifikacija gena <i>HER-2/neu</i> .....                                             | 6        |
| 2.1.3. Značaj amplifikacije gena u razvoju tumora .....                                      | 7        |
| 2.1.4. Amplifikacija gena i otpornost na antitumorsku terapiju.....                          | 7        |
| 2.1.4.1. Otpornost na terapiju raka prostate, melanoma i debelog crijeva .....               | 11       |
| 2.1.4.2. Važnost amplifikacije <i>HER-2/neu</i> u raku dojke i otpornost na terapiju .....   | 11       |
| <br>2.1.5. Određivanje statusa HER2 .....                                                    | 12       |
| 2.1.5.1. Metode određivanja HER2 .....                                                       | 12       |
| 2.1.5.2. Revizija algoritma za određivanje statusa HER2 .....                                | 15       |
| <br>2.1.6. Polimorfizam gena <i>HER-2/neu</i> .....                                          | 19       |
| 2.1.6.1. Definicija polimorfizma gena .....                                                  | 19       |
| 2.1.6.2. Gen <i>HER-2/neu</i> i polimorfizam .....                                           | 19       |
| 2.1.6.3. Polimorfizam gena <i>HER-2/neu</i> [Ile655Val] i rizik od raka dojke .....          | 20       |
| 2.1.6.4. Polimorfizam <i>HER-2/neu</i> [Ile655Val] i odgovor na terapiju trastuzumabom ..... | 20       |
| 2.1.6.5. Polimorfizam <i>HER-2/neu</i> [Ile655Val] i kardiotoksičnost trastuzumaba .....     | 23       |



|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2. Struktura i biologija receptora HER .....                                      | 24 |
| 2.2.1. Vrste i struktura receptora HER .....                                        | 24 |
| 2.2.2. Aktivacija receptora HER u stanicama raka .....                              | 28 |
| 2.2.3. Receptor HER2 .....                                                          | 30 |
| 2.2.3.1. Biologija i struktura receptora HER2 .....                                 | 30 |
| 2.2.3.2. HER2 signalizacija u razvoju raka dojke .....                              | 33 |
| 2.2.3.3. Pozitivitet HER2 kao negativan prognostički čimbenik .....                 | 33 |
| 2.2.3.4. Blokada HER2 signalizacije .....                                           | 34 |
| 2.2.3.5. Uloga HER2 u srčanom razvoju .....                                         | 36 |
| 2.2.3.6. Neuregulin (NR-1) regulator srčane funkcije .....                          | 39 |
| 2.2.3.7. Inhibitori tirozinske kinaze i receptora HER2 .....                        | 42 |
| 2.3. Trastuzumab .....                                                              | 43 |
| 2.3.1. Otkriće i mehanizam djelovanja .....                                         | 43 |
| 2.3.2. Indikacije za primjenu trastuzumaba.....                                     | 43 |
| 2.3. 2.1. Metastaski rak dojke .....                                                | 44 |
| 2.3.2.2. Adjuvantno liječenje trastuzumabom ranog raka dojke .....                  | 48 |
| 2.3.2.3. Rani rak dojke- neoadjuvantno liječenje .....                              | 49 |
| 2.3.3. Kardijalna toksičnost trastuzumaba .....                                     | 50 |
| 2.3.3.1. Meta analize kardijalne toksičnosti i benefita primjene trastuzumaba ..... | 53 |
| 2.3.3.2. Čimbenici rizika za razvoj kardiotoksičnosti .....                         | 54 |
| 2.3.3.3. Mehanizmi kardiotoksičnosti trastuzumaba .....                             | 56 |
| 2.3.3.4. Klinički aspekti kardiotoksičnosti uzrokovane trastuzumabom .....          | 60 |
| 2.3.3.5. Procjena rizika, rano otkrivanje i praćenje kardiotoksičnosti .....        | 62 |
| 2.3.4. Dijagnostički alati za otkrivanje kardiotoksičnosti .....                    | 64 |
| 2.3.4.1. Elektrokardiografija .....                                                 | 64 |
| 2.3.4.2. Ehokardiografija.....                                                      | 64 |
| 2.3.4.3. Srčani biomarkeri .....                                                    | 66 |
| 2.3.5. Mogući utjecaj na smanjenje kardiotoksičnosti trastuzumaba .....             | 67 |
| 2.3.6. Nadzor i liječenje trastuzumabom uzrokovane kardiotoksičnosti .....          | 68 |
| 2.3.7. Medikamentozna prevencija kardiotoksičnosti trastuzumaba .....               | 69 |

|                                                                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>                                                                            | <b>71</b>  |
| 3.1. Uzorak .....                                                                                              | 71         |
| 3.2. Procjena kardiotoksičnosti .....                                                                          | 73         |
| 3.3. Određivanje genotipa <i>HER-2/neu</i> .....                                                               | 75         |
| 3.4. Određivanje NT-proBNP-a .....                                                                             | 77         |
| 3.5. Statistika .....                                                                                          | 79         |
| <br>                                                                                                           |            |
| <b>4. REZULTATI .....</b>                                                                                      | <b>80</b>  |
| 4.1. Karakteristike ispitanica ovisno o razvoju kardiotoksičnosti.....                                         | 80         |
| 4.2. Adjuvantni kemoterapijski protokoli i kardiotoksičnost .....                                              | 82         |
| 4.3. Lokalizacija tumora, zračenje i kardiotoksičnost .....                                                    | 85         |
| 4.4. Karakteristike tumora dojke i kardiotoksičnost .....                                                      | 88         |
| 4.5. Utjecaj genotipa <i>HER-2/neu</i> na kardiotoksičnost .....                                               | 89         |
| 4.6. Parametri kardijalne funkcije tijekom terapije trastuzumabom i kardiovaskularni<br>čimbenici rizika ..... | 91         |
| 4.7. Karakteristike ispitanica ovisno o genotipu <i>HER-2/neu</i> .....                                        | 96         |
| 4.8. Karakteristike, reverzibilnost i liječenje kardiotoksičnosti .....                                        | 99         |
| 4.9. Promjena istisne frakcije lijevog ventrikla (EFLV) tijekom terapije trastuzumabom .....                   | 102        |
| 4.10. Oporavak srčane funkcije .....                                                                           | 104        |
| 4.11. Prediktivna vrijednost najniže EFLV u oporavku srčane funkcije .....                                     | 111        |
| <br>                                                                                                           |            |
| <b>5. RASPRAVA .....</b>                                                                                       | <b>112</b> |
| <br>                                                                                                           |            |
| <b>6. ZAKLJUČAK .....</b>                                                                                      | <b>126</b> |
| <br>                                                                                                           |            |
| <b>7. CITIRANA LITERATURA .....</b>                                                                            | <b>129</b> |
| <br>                                                                                                           |            |
| <b>8. ŽIVOTOPIS AUTORA .....</b>                                                                               | <b>148</b> |

# 1. UVOD

## 1.1. Svrha rada

U liječenju HER2 pozitivnog ranog i metastatskog karcinoma dojke standard je liječenja trastuzumab (Herceptin®), humanizirano monoklonsko protutijelo usmjereno na receptor HER2 epidermalnog čimbenika rasta (EGFR, eng. Epidermal growth factor receptor) koji je prekomjerno izražen u 15-30% karcinoma dojke (33,123,126, 127). Receptor HER2 član je obitelji receptora EGFR-a i njegovom inhibicijom smanjuje se unutarstanična fosforilacija tirozinskih kinaza, a time i aktivacija signalnih puteva mitogen aktivirajuće protein kinaze (MAPK) i fosfatidilinozitol 3- kinaze (PI3K) uz smanjenje stanične proliferacije i poticanje programirane smrti stanice, apoptoze (58,60,77).

Najčešća ozbiljna nuspojava liječenja trastuzumabom je razvoj kardiotoksičnosti (23,53) koja se uglavnom javlja u obliku reverzibilne sistoličke disfunkcije lijeve klijetke, međutim moguća je i progresija do ireverzibilne dilatacijske kardiomiopatije (59,143,166). Mehanizam nastanka kardiotoksičnosti je još uvijek nejasan, a reverzibilnost kao i razlike u patohistološkoj analizi ukazuju na drugačiji mehanizam nastanka u odnosu na antraciklinsku kardiotoksičnost (23,59,171). Kardiotoksičnost nastaje prvenstveno direktnom blokadom receptora HER2 u miokardu, iako su mogući i drugi mehanizmi. Kardiotoksičnost uzrokovana trastuzumabom u visokom je postotku reverzibilna za razliku od antraciklinske kardiotoksičnosti (129,131).

Pojavnost kardiotoksičnosti izrazito je visoka ako se trastuzumab primjenjuje u kombinaciji s antraciklinima i iznosi oko 28% te takva primjena nije dio standardnog liječenja (145). Pojavnost težih oblika kardiotoksičnosti u adjuvantnoj primjeni trastuzumaba, prema kliničkim istraživanjima, iznosila je do 4,1% (126,127).

Postoji niz čimbenika rizika za razvoj kardiotoksičnosti od kardijalnih do nekardijalnih. Kardijalni uključuju prisutnu srčanu bolest, dok su nekardijalni: ranija primjena antraciklina, zračenje lijevog prsišta, šećerna bolest, pretilost, dislipidemija (59,126,171).

Svrha ovog rada je razmotriti čimbenike rizika u nastanku kardiotsičnosti uzrokovane trastuzumabom te uvidjeti specifičnosti srčanog zatajivanja kao i moguću reverzibilnost.

Poznavanjem rizičnih čimbenika uz usvajanje algoritama praćenja i liječenja bolesnika sa srčanim zatajivanjem moguće je jasnije definirati omjer rizika i dobrobiti primjene ovog lijeka te smanjiti kardijalni morbiditet.

## 1.2. Hipoteza

Da bi se procijenili čimbenici rizika za nastanak trastuzumabom uzrokovane kardiotsičnosti kao i značajke same kardiotsičnosti istraživanje će se provesti na ispitanicima s HER2 pozitivnim ranim rakom dojke liječenih trastuzumabom. Ispitanice će biti podijeljene u dvije grupe od kojih su u grupi A ispitanice kod kojih nije došlo do razvoja trastuzumabom uzrokovane kardiotsičnosti, a u grupi B ispitanice s razvijenom kardiotsičnošću. Anamnestički će se dobiti podaci o prisustvu kardijalnog komorbiditeta, primjenjenim kemoterapijskim protokolima, zračenju kao i mogućim drugim čimbenicima rizika za razvoj kardiotsičnosti.

Srčana funkcija će se pratiti po usvojenim algoritmima praćenja i mjerenja istisne frakcije lijevog ventrikla (EFLV, eng. Ejection fraction left ventricular) te će se dobiti dinamika u promjeni srčane funkcije kao i dinamika u reverzibilnosti srčanog zatajivanja. U praćenju će se koristiti dvodimenzionalna ehokardiografija. S obzirom na razvoj kardiotsičnosti pratit će se razlike srčanog biljega N terminalnog dijela moždanog natrijuretskog peptida (NT-proBNP-a, eng. N-terminal proBrain Natriuretic Peptide) između grupa A i B.

U razumijevanju mogućih rizičnih čimbenika za nastanak trastuzumabom uzrokovane kardiotsičnosti postoji mali broj istraživanja o utjecaju polimorfizma gena *HER-2/neu* kao čimbenika rizika na pojavnost kardiotsičnosti (5,7). Najčešće je prisutan polimorfizam jednog nukleotida (SNP, eng. Single Nucleotide Polymorphisms), Ile655Val (ATC izoleucin- GTC valin), na kodonu 655 dugog kraka kromosoma 17 gdje je lokaliziran gen *HER-2/neu* (46,53).

Dosadašnja istraživanja utjecaja genotipa *HER-2/ne* na kardiotoksičnost su dvojbeni i provedena na manjem broju ispitanika (53,54,55).

Poseban cilj istraživanja temeljit će se na istraživanju polimorfizma gena *HER-2/neu* kao mogućeg čimbenika rizika u nastanku trastuzumabom uzrokovane kardiotoksičnosti. U tu svrhu svim ispitanicima će se učiniti genska analiza te utvrditi distribucija genotipa *HER-2/neu* kao i moguća povezanost pojedinog genotipa s nastankom kardiotoksičnosti.

### **1.3. Specifični ciljevi istraživanja**

1. istražiti polimorfizam gena *HER-2/neu* [Ile655Val] i distribuciju genotipova (Ile/Val, Ile/Ile, Val/Val) kod ranog HER2 pozitivnog raka dojke adjuvantno liječenog monoklonskim protutijelom trastuzumabom
2. istražiti moguću korelaciju određenog genotipa *HER-2/neu* i pojave kardiotoksičnosti
3. istražiti korelaciju polimorfizma gena i ekspresije receptora HER2 na membrani tumorske stanice (HER-2 2+ ili 3+)
4. istražiti utjecaj genotipa *HER-2/neu* na biološke karakteristike tumora, rizične čimbenike, težinu srčanog zatajivanja, reverzibilnost kardiotoksičnosti i vrijeme oporavka
5. istražiti karakteristike srčanog zatajivanja (vrijeme nastanka, vrijeme oporavka, reverzibilnost)
6. istražiti značaj srčanog biljega NT-proBNP-a u procjeni težine srčanog zatajivanja i reverzibilnosti

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Gen *HER-2/neu*

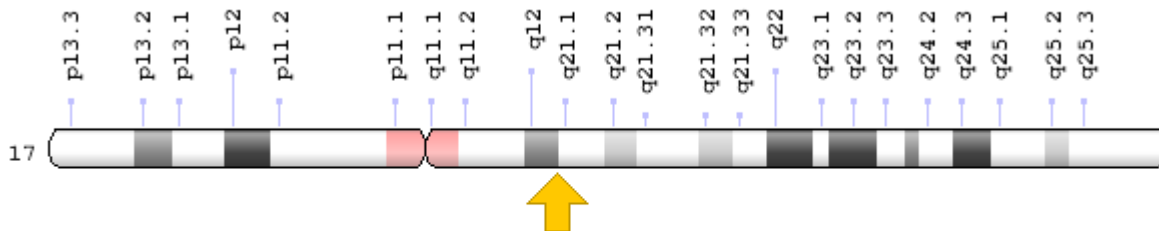
#### 2.1.1. Otkriće gena *HER-2/neu* i kliničke implikacije

Gen *HER-2/neu* je protoonkogen, izvorno otkriven kao V-Erb-B2 ( eng. Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog), virusni onkogen, homolog ptičje eritroblastične leukemije. Ovaj onkogen je otkriven 1984. godine u tkivu neuroblastoma nadbubrežne žlijezde štakora, a za otkriće su zaslužni Weinberg i suradnici. Gen ima više istoznačnica: erbB2, ERBB2 , NGL, NEU, *HER-2/neu*, protoonkogen c-erbB-2, CD 340, protoonkogen neu (1-4).

Gen *HER-2/neu* lokaliziran je na dugom kraku (q) kromosoma 17 pozicija 12 (17q12) (4). (slika 2.1.) Ovaj gen kodira transmembranski glikoproteinski receptor epidermalnog čimbenika rasta HER2 (EGFR, eng. Epidermal growth factor receptor, ErbB2 ili HER2, Heregulin-2) koji je član obitelji receptora tirozinske kinaze epidermalnog čimbenika rasta . Ovaj glikoproteinski receptor nema vlastitu veznu domenu za ligand i stoga ne može vezati epidermalne čimbenike rasta. Međutim, može se čvrsto vezati za druge članove obitelji receptora EGF i tvoriti hetero i homodimere te je na taj način povećana kinazna aktivacija nizvodnih signalnih puteva, kao što su oni koji uključuju mitogenom-aktiviranu protein kinazu (MAPK) te fosfatidilinozitol-3 kinaze (PI-3K) (5).

Amplifikacija i / ili prekomjerna ekspresija ovog gena opisana je u mnogim sijelima raka, uključujući rak dojke, jajnika, nasljedni difuzni slabo diferencirani rak želuca, benigni i maligni gliom mozga te rak pluća ne-malih stanica (eng. non small cell lung cancer, NSCLC) (4-5).

1987. godine je otkrivena veza amplifikacije gena kao negativnog prognostičkog čimbenika na povećanu proliferaciju tumorskih stanica, smanjenje apoptoze, angiogenezu tumora i pojavu udaljenih metastaza (6,7).



Slika 2.1. Lokalizacija gena *HER-2/neu* na dugom kraku(q) kromosoma 17, pozicija 12

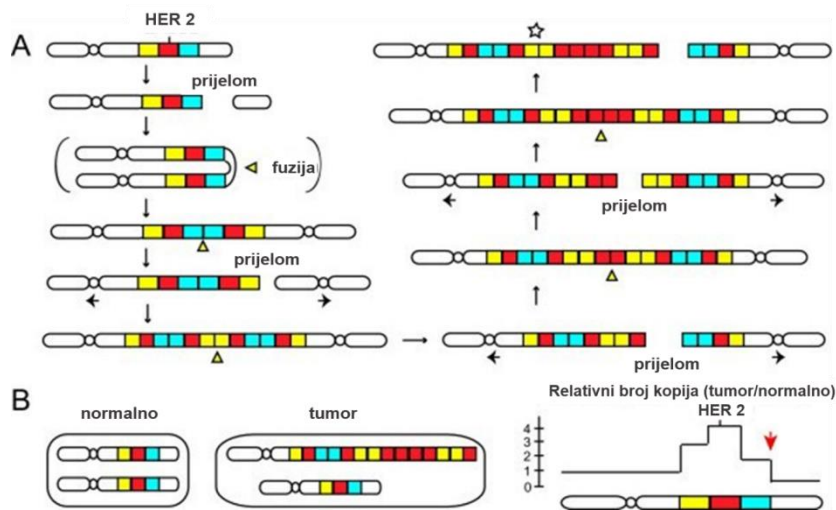
Izvor: ERBB2- erb-b2 receptor tyrosine kinase 2-Genetics Home References

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ERBB2>)

Pojačana amplifikacija ovog protoonkogen a te posljedična prekomjerna ekspresija receptora HER2 je negativan prognostički čimbenik u razvoju tumora, povezan s otpornošću na primjenjenu terapiju, kratkim vremenskim intervalom bez progresije bolesti i kraćim preživljenjem (6). Postoje oprečni podaci da prekomjerna ekspresija *HER-2/neu* pogodu je napredovanju benigne lezije u invazivni rak dojke. Točna uloga ovog onkogen a u etiologiji i patogenezi raka dojke nije u potpunosti razjašnjena (7-10).

### 2.1.2. Amplifikacija gena *HER-2/neu*

Genska amplifikacija (pojaćanje) definira se kao povećanje broja kopija gena u određenoj regiji kromosoma. U somatskim stanicama ovu pojavu su prvi primijetili Breuer i Pavan (1955.god.) tijekom morfološke studije kromosoma iz slin žlijezda američke lićinke muhe *Rhynchosciara* (11). Prva demonstracija amplifikacije gena u kulturi stanica sisavaca (1978. god.) je bila amplifikacija dihidrofolat reduktaze (DHFR) u liniji AT3000 metotreksat (MTX) -resistantnog mišjeg sarkoma (12). U osnovi pojaćanja određene regije gena *erbB2* su spajanja (mostovi) polomljenih segmenata kromatida (13). ( slika 2.2)



Slika 2.2. Stvaranje mostova na fuzijskim lomovima u kromosomu 17 može dovesti do *erbB2* amplifikacije. (A) Genomski segmenti koji imaju gen za *erbB2* prikazani su crveno; boćni centromerni segment je prikazan Źuto; a telomerni segment je prikazan plavom bojom. Pauza između plavog i bijelog segmenta dovodi do niza fuzija kromatida i obrnutih duplikacija (centri prikazani u Źutim trokutima) Źto rezultira kromosomom s pojaćanjem (amplifikacijom) gena *erbB2* (zvjezdice). B) Normalna stanica s dva normalna kromosoma i stanica tumora s kromosomom koji generira spajanje fuzijskih lomova. Izvor: Marotta Michael (2012) A common copy-number breakpoint of *ERBB2* amplification in breast cancer colocalizes with a complex block of segmental duplications. Breast cancer research: BCR 14(6):R150



### 2.1.3. Značaj amplifikacije gena u razvoju tumora

Genska amplifikacija je često prisutna kod solidnih tumora i povezana je s razvojem tumora. Najčešće su umnoženi onkogeni myc protein i njegov kodirajući gen MYCN, receptor epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) i gen koji ga kodira v-ERB-B2 odnosno gen *HER-2/neu*. Myc je prvi onkogen dokazan kod raznih tumorskih stanica, uključujući neuroendokrine linije karcinoma debelog crijeva, karcinoma pluća malih stanica, leukemije plazma stanica (14-17).

Genske amplifikacije onkogeni mogu se detektirati pomoću nekoliko metoda, uključujući DNA tehnike temeljene na lančanoj reakciji polimeraze (PCR, eng. Polymerase chain reaction ili Southern blot), molekularne citogenetičke tehnike (fluorescentne hibridizacije in situ, FISH) i komparativne genomske hibridizacije (CHG). PCR, Southern blot i FISH uglavnom su ograničene na analize poznatih amplifikacija gena. Za razliku od toga, CHG ne pokazuje ovo ograničenje, omogućava otkrivanje ranije nepoznatih amplifikacija ali ima ograničenu osjetljivost (18,19).

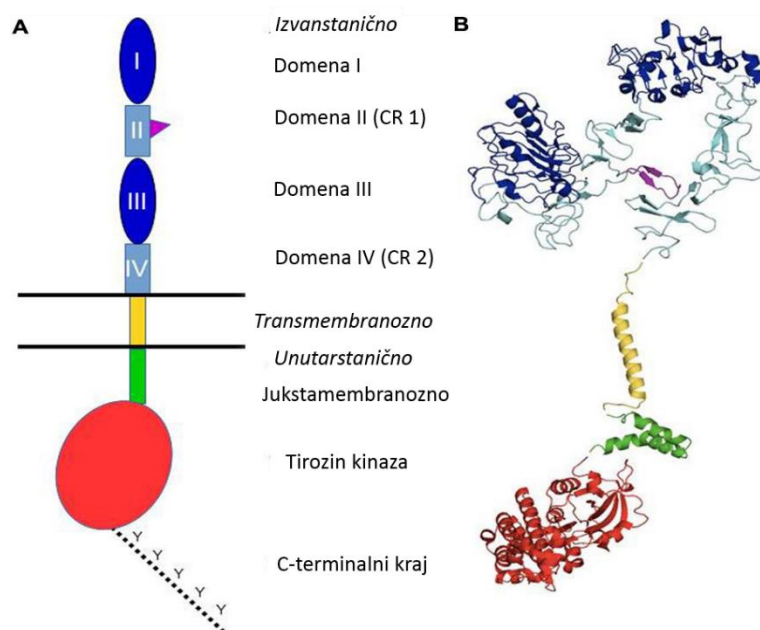
Jedna od najčešće ispitivanih amplifikacija je lokalizirana na kromosomu 17. Na dugom kraku kromosoma 17 pozicija 12-21 (17q12-q21) amplifikacija je povezana s receptorom ErbB2 epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) i značajan je prediktor u razvoju i preživljenju kod raka dojke, želuca, jednjaka (20). Zapravo, nekoliko gena koji su istovremeno umnoženi s erbB2 sudjeluju u nastanku i širenju tumora. Postoji jasna onkogeni suradnja između gena erbB2 (*HER-2/neu*) i gena GRB7 koji kodira istoimeni receptor, adaptorski protein, (GRB7, eng. Growth factor receptor-bound protein-7) koji prilagođavajući SH2 domenu tirozinske kinaze aktivira unutarstanične signalne puteve, osiguravajući izravnu vezu s Ras signalnim putem. Blaga ekspresija erbB2 sama ne generira transformaciju, međutim, istovremena izražajnost GRB7 zajedno s erbB2 učinkovito inducira žarišta tumorske transformacije (20).

Receptor alfa retinoične kiseline ( $RAR\alpha$ ) je također u suradnji s erbB2. Funkcija  $RAR\alpha$  u erbB2 pozitivnim tumorima je sporna, međutim izvješća pokazuju da je izražajnost  $RAR\alpha$  povezana s osjetljivošću na antiproliferativno / citodiferencirajuće djelovanje trans-retinoične kiseline, koje stabilizira učinak lapatiniba, dvostrukog inhibitora EGFR i ErbB2 (21).

Osim na kromosomu 17, amplifikacije gena postoje i na drugim kromosomima. MITF (eng. Microphthalmia-Associated Transcription Factor) koji se nalazi na 3p13 je specifični onkogen koji je povremeno pojačan u malignom melanomu (22,23). MITF ciljni geni uključeni su u stanični ciklus proliferacije stanica (TBX2 i CDK2) , preživljenja stanica (B-CLL stanica / limfom 2 BCL2) i diferencijaciju (Tyr TYRP1, DCT, MART1, AIM-1 i PMEL17) (24). MITF je pojačan u oko 10-20% slučajeva lokaliziranog melanoma, a pojavnost je veća u metastatskom melanomu. Nadalje, u metastatskom melanomu, MITF amplifikacija je povezana s kraćim preživljenjem (25).

Amplifikacija gena za EGFR na kromosomu 17p12 prisutna je kod više malignih tumora, uključujući maligni melanom, rak dojke, debelog crijeva i pluća . EGFR je član obitelji receptora tirozinske kinaze koji je uključen u proliferaciju stanica, otpornost na apoptozu, preživljenje, invaziju i migraciju (26). (slika 2.3)

Vežanje liganda na EGFR uzrokuje konformacijsku promjenu receptora i zatim homo- ili heterodimerizaciju obiteljskih proteina ErbB što rezultira fosforilacijom tirozinskog ostatka u blizini samog C-kraja. Nizvodno signalni putevi, kao što je Ras-Raf, mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) ili PI3K-Akt se zatim aktiviraju i dovode do stanične proliferacije i smanjenja apoptoze (27). (slika 2.4). Aktivacija EGFR i prekomjerna ekspresija su prediktori tumorskog odgovora na ciljanu anti EGFR terapiju (28).

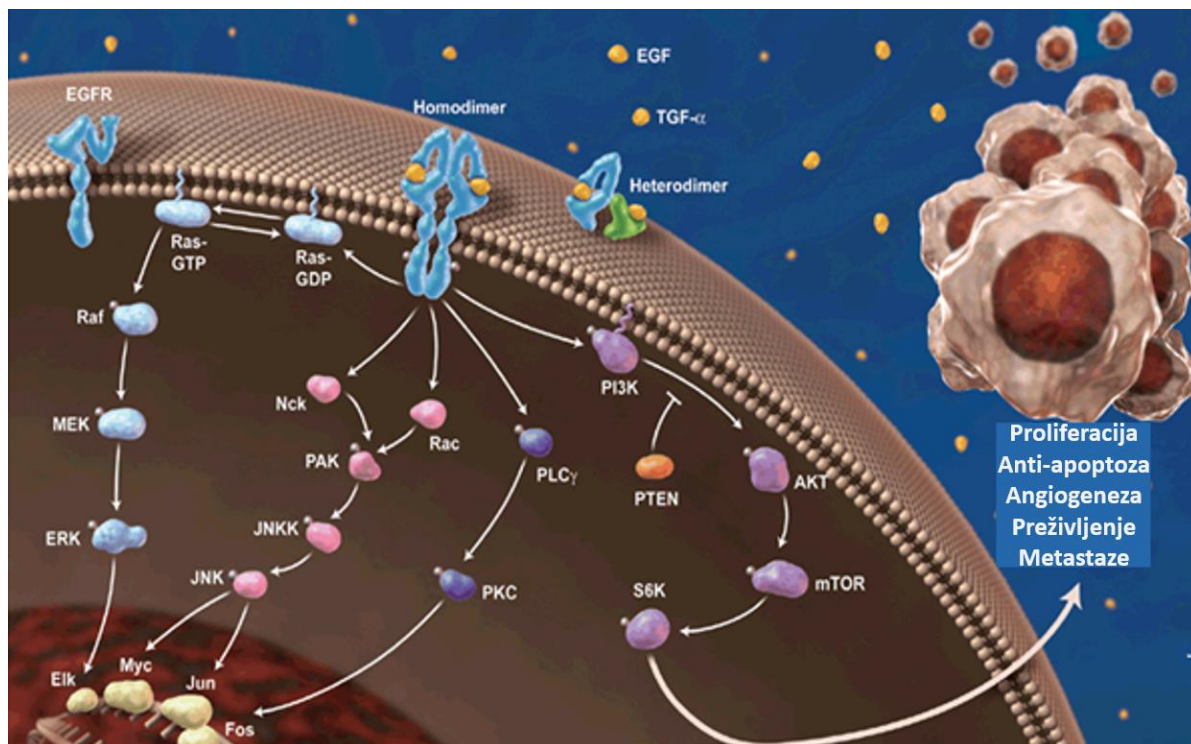


Slika 2.3. Strukturna organizacija proteina receptora ErbB / HER

(A) prikazuje shematski prikaz različitih domena. Izvanstanični dio receptora sastoji se od četiri domene: I i III = ligand-vezujuća domena (tamno plava); II i IV = cistein bogate domene (svijetlo plava). Domena II sadrži dimerizacijsku ruku (ljubičasto). Slijedi transmembranska domena (žuta), unutarstanična domena (zeleno) i domena tirozin-kinaze (crveno). C-terminalni kraj sadrži glavne tirozine koji su fosforilirani (točkasta linija).

(B) prikazuje strukturu različitih domena ljudskog EGFR koje su utvrđene putem rendgenske kristalografije.

Izvor: Appert-Collin A, Hubert P (2015) Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. Front. Pharmacol., 24 | <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2015.00283>



Slika 2.4. Aktivacija receptora specifičnim ligandom epidermalnog čimbenika rasta, EGFR-a, nakon koje slijedi homo ili heterodimerizacija, fosforilacija tirozinske kinaze i unutarstanični prijenos signala putevima Ras/Raf i PI3K. Navedena aktivacija receptora dovodi do stanične proliferacije, antiapoptoze, angiogeneze, preživljenja stanice i metastaziranja.

Izvor: Malorye Allison (2008) Is personalized medicine finally arriving? Nature Biotechnology 26, 509 – 517.

## **2.1.4. Amplifikacija gena i otpornost na antitumorsku terapiju**

### **2.1.4.1. Otpornost na terapiju raka prostate, melanoma i debelog crijeva**

Amplifikaciju gena na kromosomu Xq11-13 nalazimo u kastracijski rezistentnom raku prostate (CRPC, eng. Castration-resistant Prostate Cancer) (29). Mnogi karcinomi prostate s vremenom razvijaju rezistenciju na androgenu deprivacijsku terapiju (ADT), a takvi nose gen aberacije receptora androgena . Amplifikacija receptora androgena (AR) jedna je od genetskih promjena koja se javlja u CRPC. Oko 80% CRPC ima povećanu amplifikaciju AR, a oko 30% ima visoku razinu pojačanja (30).

Amplifikacija BRAF na kromosomu 7q34 također dovodi do otpornosti na lijekove. BRAF je protoonkogen koji je mutiran u nekoliko vrsta raka, uključujući melanom i rak debelog crijeva (30). Protein B-Raf je regulator kinaze MAPK signalnog puta. Najčešća mutacija u BRAF, V600E, predviđa osjetljivost na AZ628, inhibitor BRAF i CI-1040 te njegov derivat PD0325901, oba su inhibitori mitogen aktivirane protein kinaze 1 (MEK), nizvodno od BRAF. Ova mutacija nađena je u 60% malignih melanoma. Kod raka debelog cijeva prisutna je u oko 10% i predstavlja negativan prediktor odgovora na terapiju EGFR inhibitorom (31,32).

### **2.1.4.2. Važnost amplifikacije *HER-2/neu* u raku dojke i otpornost na terapiju**

Amplifikacija gena *HER-2/neu* je prognostički i prediktivni čimbenik u raku dojke. 15-30% invazivnih duktalnih karcinoma dojke pokazuju *HER-2/neu* pretjeranu ekspresiju. Kod kacinoma in situ ista je prisutna do 60%, dok benigne i atipične lezije dojke uglavnom ne pokazuju niti jedan dokaz *HER-2/neu* pretjerane ekspresije (33). Više genetskih događaja je potrebno za razvoj invazivnog fenotipa. Genetski događaj *HER-2/neu* genske amplifikacije i prekomjerne ekspresije receptora HER2 na površini stanice, pojedinačno, nemaju ključnu ulogu u progresiji duktalnog karcinoma in situ do invazivnog karcinoma te i druge molekularne promjene mogu biti važne u pokretanju procesa u invazivni karcinom (34).

Prekomjerna amplifikacija protoonkogenog *HER-2/neu* dovodi do pretjerane ekspresije receptora epidermalnog čimbenika rasta HER2 ili ErbB2 na membrani tumorske stanice (35). Amplifikacija gena *HER-2/neu* i glikoproteina receptora važan je biljeg klinički agresivnog raka dojke i na meti je posebno usmjerene terapije (36). Osim gena *HER-2/neu* postoji i niz drugih gena na kromosomu 17, uključujući usko vezani susjedni gen GRB7 koji može biti amplificiran istovremeno s *HER-2/neu* genom. Ekspresija receptora HER2 i proteina GRB7, produkti su dva usko povezana gena, koji su često prekomjerno izraženi u tandemu kada je prisutna 17q11-12 amplifikacija. Prekomjerna ekspresija proteina GRB7 je jači nezavisni prediktor nepovoljne prognoze nego prekomjerna ekspresija glikoproteina receptora HER2. (37,38). Izolirana prekomjerna ekspresija proteina GRB7 nepovoljan je prognostički čimbenik bez obzira na ekspresiju HER2 kao što je prisutno u trostruko negativnom raku dojke (estrogen, progesteron i HER2 negativan rak dojke) (39).

## **2.1.5. Određivanje statusa HER2**

### **2.1.5.1. Metode određivanja HER2**

Američko društvo za kliničku onkologiju (ASCO, American Society of Clinical Oncology) i Kolegij Američkih patologa (CAP, College of American Pathologists) 2007. godine su utvrdili smjernice za određivanje statusa HER2, a iste su revidirane 2013. godine (40).

Dvije dijagnostičke tehnike trenutno su odobrene za određivanje statusa HER2 u kliničkoj praksi: imunohistokemijski (IHC, Hercep Test) i hibridizacija in situ (ISH). IHC koristi protutijelo za procijenu ekspresije receptora HER2 na membrani tumorske stanice. ISH određuje broj kopija gena *HER-2/neu* na kromosomu 17 pomoću DNA konjugata s fluorescentnim (FISH), kromogenim (CISH) ili sustavom detekcije srebrom (SISH). Detekcija se može vršiti i kombinacijom pojedinih sustava. Određuje se omjer HER2 jezgre prema omjeru centromere kromosoma CEP17. Odnos HER2: CEP17 ponekad se smatra boljim odrazom stanja HER2 amplifikacije (40).

Podudarnost ove dvije metode, IHC i ISH je 80-95%. Imunohistokemijska (IHC) metoda koristi poliklonsko protutijelo na epitope intracitoplazmatske domene proteina HER2 na membrani stanice iz uzorka tumorskog tkiva. Ona je jednostavnija, brža i jeftinija i zato se češće koristi. Nedostak metode je što nema standardiziranog sistema bodovanja, a postoje različite interpretacije rezultata bojanja. Najčešće se koristi slijedeći sustav bodovanja:

0 – nema membranskog bojanja ili je ono prisutno u manje od 10% tumorskih stanica

1– slabo ili jedva vidljivo membransko bojanje u više od 10% tumorskih stanica (djelomično obojane membrane)

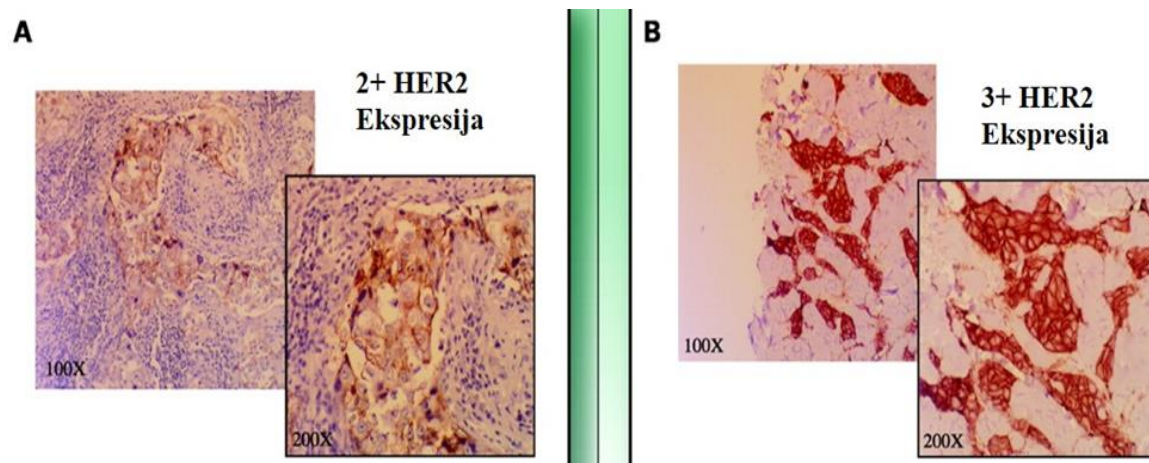
2 – slabo ili umjereno, kompletno membransko bojanje u više od 10% tumorskih stanica

3 – jako kompletno membransko bojanje koje se nalazi u više od 10% tumorskih stanica

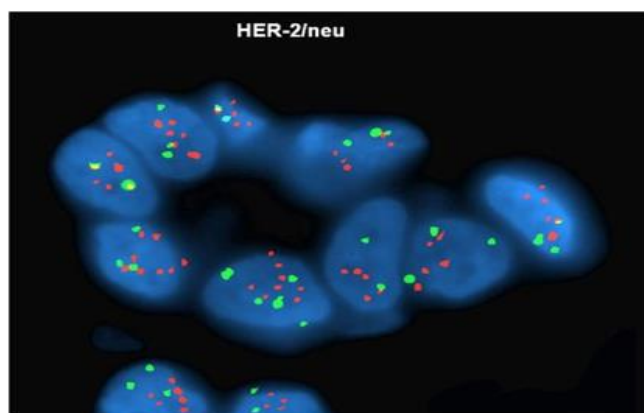
IHC test daje rezultat od 0 do 3 + koji mjeri količinu proteina receptora HER2 na površini stanice u uzorku tkiva raka dojke. Rezultat 0 do 1+, se interpretira kao "HER2- negativni." Ako je ocjena 2+, "na granici, ekvivokalni". Rezultat od 3+ se interpretira "HER2 -pozitivan".

Ocjenjuje se samo invazivna komponenta tumora. Pozitivnim se smatra samo membransko bojanje, dok je citoplazmatska reaktivnost manjeg značenja (41). (Slika 2.5) Samo rezultat intenziteta 3+ (difuzno, jako pozitivno membransko bojanje) smatra se prekomjernom ekspresijom HER2 i te bolesnice su kandidati za terapiju monoklonskim protutijelom trastuzumabom. U slučajevima kada se imunohistokemijski nalaz označi kao 2+ potrebno ga je potvrditi hibridizacijom in situ (ISH) (42). (Slika 2.6) Niska ekspresija proteina HER2, iako nedovoljna za imunoterapiju ima vrijednost kao povoljan prognostički čimbenik.

Potreban je oprez jer rezultati IHC i ISH testa mogu ovisiti o uvjetima ispitivanja, uključujući uporabu suboptimalne fiksacije tkiva, neadekvatnog korištenja reagensa te neuspješnog uključivanja odgovarajuće kontrole.



Slika 2.5. Imunohistokemijski prikaz (IHC) bojanja membrane tumorske stanice na ekspresiju receptora HER2. A) HER2 2+ umjereno, kompletno membransko bojanje membrane; B) HER2 3+ jako kompletno membransko bojanje membrane. Izvor: Lin Nancy U i Winter Eric P (2007) Brain Metastases: The HER2 Paradigm. Clin Cancer Res 13(6).



Slika 2.6. Prikaz fluorescentne hibridizacije in situ (FISH) i amplifikacije gena *HER-2/neu* u DNA tumorske stanice

Izvor: Apple S K, Lowe C A, Nagesh R, Shintaku P (2009) Comparison of fluorescent in situ hybridization HER-2/neu results on core needle biopsy and excisional biopsy in primary breast cancer. Modern Pathology 22, 1151–1159.



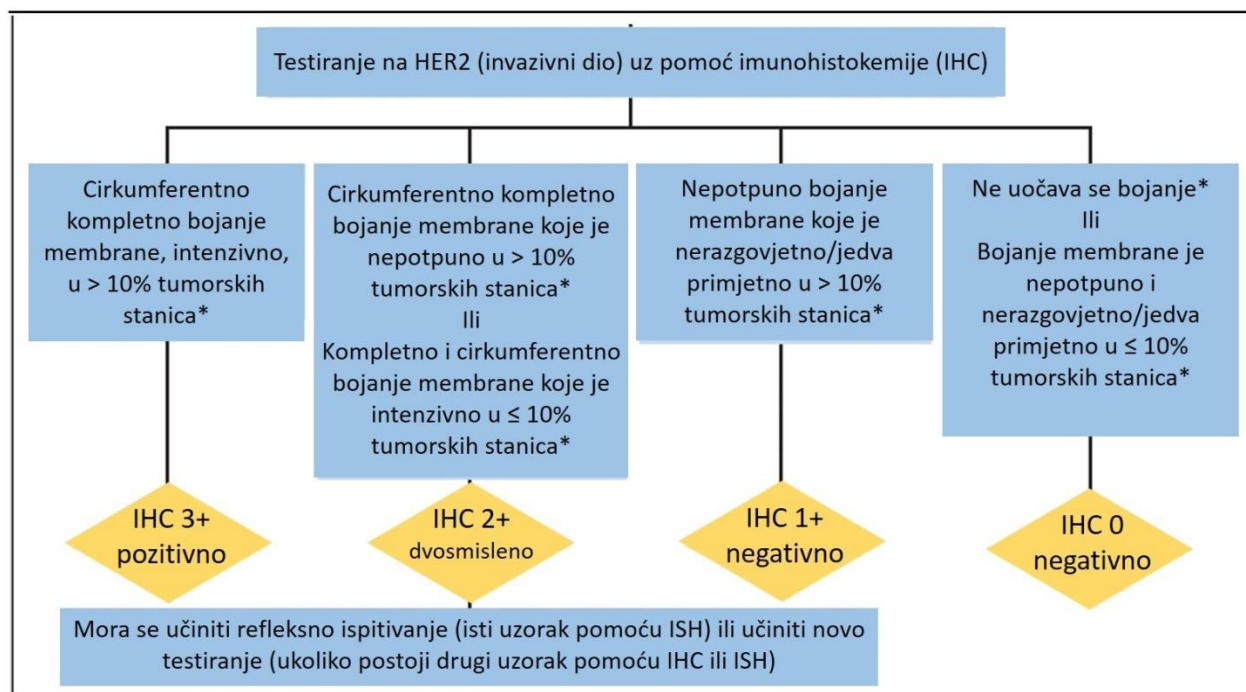
### 2.1.5.2. Revizija algoritma za određivanje statusa HER2

Revizija postojećih smjernica učinjena je 2013. godine od strane ASCO/CAP , a uključuje promjenu definicije pozitiviteta hibridizacije in situ (ISH), fiksaciju uzorka tumorskog tkiva > 6 i <72 sata te retestiranje bolesnica sa razvijenom metastatskom bolesti , ukoliko je uzorak tkiva dostupan (43).

Definicije ISH pozitivnosti značajno su se promijenile. (slika 2.7.) Prema novim smjernicama, koristeći dvostruki sustav sa sondom (HER2 i CEP17) , amplificirani HER2 slučajevi uključuju one s HER2: CEP17 omjerom  $\geq 2.0$ , neovisno o apsolutnom broju kopija, a uključuje i HER2: CEP17 omjer  $<2.0$ , ali s apsolutnim brojem kopija HER2  $\geq 6.0$ .

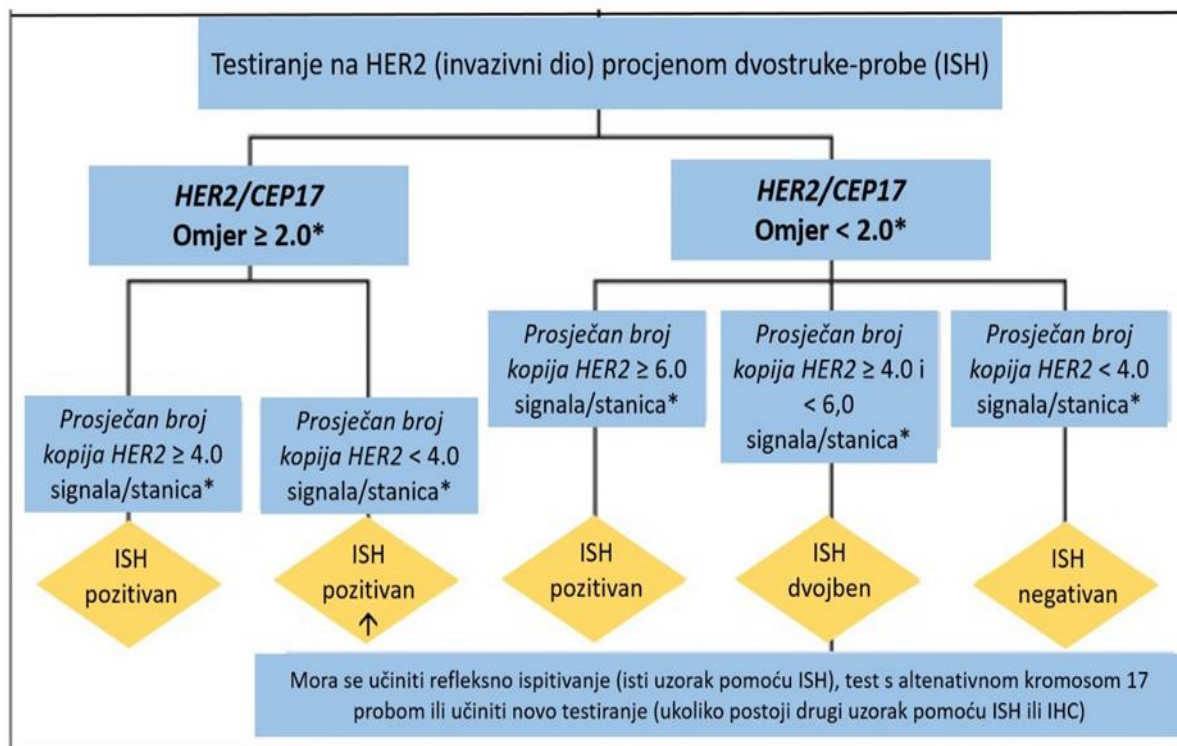
Definicija ekvivokalni ISH testa je značajno promijenjena, sada definirana kao HER2: CEP17  $<2.0$  i prosječni apsolutni broj signala HER2 po stanici od  $\geq 4.0$  i  $<6.0$  (44). (Slika 2.8.)

Primjena modificirane ASCO/ CAP smjernice iz 2013. godine rezultirala je povećanjem od 2% u ukupnoj stopi ekspresije HER2 u odnosu na stopu u ukupnom poretku ekspresije HER2 pomoću smjernica ASCO/ CAP 2008. Povećana stopa pozitivnost je uglavnom zbog više FISH-pozitivnih slučajeva (3,5% više nego do 2013. godine). Visoka stopa dvoznačnih slučajeva, ekvivokalnih (4,1%) nije dovela do povećanja ukupne ekspresije HER2, ali je rezultiralo kašnjenjem u definiranju statusa HER2 (44). (Slika 2.9.)



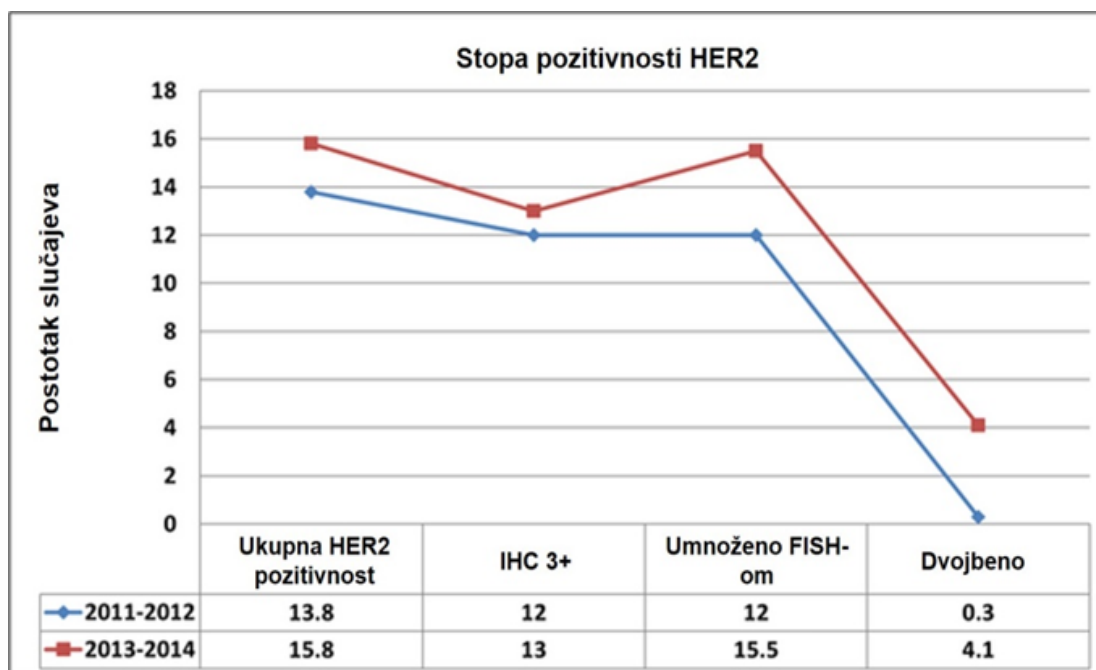
Slika 2.7. Algoritam određivanja statusa HER2 imunohistokemijskom (IHC) metodom

Izvor: Wolff A C, Hammond E H, Hicks D G (2013) 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. Journal of Clinical Oncology Vol 31 No 31.



Slika 2.8. Algoritam za određivanje HER2 genske amplifikacije hibridizacijom in situ (ISH) u invazivnoj komponenti raka dojke uporabom dualnog signala i određivanjem omjera HER2/kromosom 17 amplifikacije (HER2/CEP17 omjer)

Izvor: Wolff A C, Hammond H E, Hicks D G (2013) 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. Journal of Clinical Oncology Vol 31 No 31.



Slika 2.9. Utjecaj revidiranih smjernica određivanja statusa HER2

Revizija smjernica rezultirala je povećanjem od 2% u ukupnoj stopi ekspresije HER2 u odnosu na stopu u ukupnom poretku ekspresije HER2 prema smjernicama ASCO / CAP 2008. Povećana stopa pozitivnost je uglavnom zbog više FISH-pozitivnih slučajeva (3,5% više nego do 2013. godine). Visoka stopa dvoznačnih slučajeva, ekvivokalnih (4,1%) nije dovela do povećanja ukupne ekspresije HER2, ali je rezultiralo kašnjenjem u definiriranju statusa HER2.

Izvor: Varga Z, Noske A (2013) Impact of Modified 2013 ASCO/CAP Guidelines on HER2 Testing in Breast Cancer. One Year Experience. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4088881/>

## **2.1.6 . Polimorfizam gena *HER-2/neu***

### **2.1.6.1. Definicija polimorfizma gena**

Termin polimorfizam gena koristi se za opisivanje varijacija u izgledu i obliku koje razlikuju pojedinca unutar vrste, a obuhvaća razlike u slijedu deoksiribonukleinske kiseline (DNK) ljudskog genoma. Ljudski genom sastoji se od preko 3 milijarde parova baza koje se nalaze u svakoj staničnoj jezgri. Tijekom evolucije genom je ostao dobro očuvan i najmanje je 99,5% identičan između bilo koja dva čovjeka na planetu. Varijacija u DNK slijedu koja se javlja u populaciji s učestalošću od 1% ili više su polimorfizmi (45).

### **2.1.6.2. Gen *HER-2/neu* i polimorfizam**

Sve veći broj dokaza ukazuje na to da se geni koji kodiraju receptore za faktore rasta mogu aktivirati kroz mutacije u svojem kodirajućem slijedu. Godine 1986. Bargmann i sur. su izvijestili da točkasta mutacija u transmembranskoj regiji gena *HER-2/neu* povećava transformirajući potencijal tog gena. Transgenični miševi koji nose mutirani *HER-2/neu* ili prekomjerno izražen normalan *HER-2/neu* često razvijaju karcinom dojke.

Iako nisu identificirane mutacije gena *HER-2/neu*, analizom slijeda humanog *HER-2/neu* identificiran je polimorfizam za transmembransku kodirajuću regiju na kodonu 655. Ovaj polimorfizam kodira ili aminokiselinu izoleucin (Ile, ATC) ili valin (Val, GTC). Preinake protoonkogene *HER-2/neu* mogu biti uključene u karcinogenezu i prognozu raka dojke. Polimorfizam na kodonu 655 (ATC/izoleucin na GTC/valin) [Ile655Val] u kodirajućoj regiji tog gena je identificiran i može biti povezan s rizikom od razvoja raka dojke te može biti biomarker za rizik raka dojke osobito kod mlađih žena (46).

#### **2.1.6.3. Polimorfizam *HER-2/neu* [Ile655Val] i rizik od raka dojke**

Unatoč ranijim izvještajima, na animalnim modelima, o povećanom riziku za razvoj raka dojke kod polimorfizma jednog nukleotida (eng. Single nucleotid polymorphism, SNP) na kodonu 655 gena *HER-2/neu*, populacijske studije kod žena s polimorfizmom *HER-2/neu* pokazale su oprečne rezultate (47,48). Populacijske studije provedene u Koreji i Sudanu nisu izvjestile o povećanom riziku razvoja raka dojke, dok je studija provedena u Slovačkoj pokazala povećan rizik kod [Ile655Val] polimorfizma, osobito u homozigota (Val/Val, GTC-GTC), mlađih žena, višerotkinja, među ženama s pozitivnom obiteljskom anamnezom raka dojke te žena povećane tjelesne mase (49). Potpuno oprečna su izvješća četiri populacijske studije provedene u USA, Aziji i dvije u Europi, koje su pokazale smanjenje rizika od raka dojke kod žena homozigota Val/Val (50).

Meta-analiza 27 objavljenih kliničkih studija koja je uključila 11,504 slučajeva žena s rakom dojke i 12,538 u kontrolnoj skupini pokazala je povezanost polimorfizma *HER-2/neu* s povećanim rizikom od raka dojke u ukupnom stanovništvu (51). Prevalencija Val/Val alela u općoj populaciji kreće se 3-7% uz rijetku pojavnost kod osoba azijskog i afričkog porijekla (50). U populacijskoj studiji u Slovačkoj prevalencija Val alela u skupini žena oboljelih od raka dojke je iznosila 29,79% u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih žena 15,84% ( $p < 0.05$ ) od kojih je heterozigota Ile/Val bilo 46,81%, a homozigota Val/Val 6,38%. Rizik razvoja raka dojke u nositelja jednog Val alela bio je dva puta niži nego za nositelje dva Val alela ( $p < 0.05$ ) (49).

#### **2.1.6.4. Polimorfizam *HER-2/neu* [Ile655Val] i odgovor na terapiju trastuzumabom**

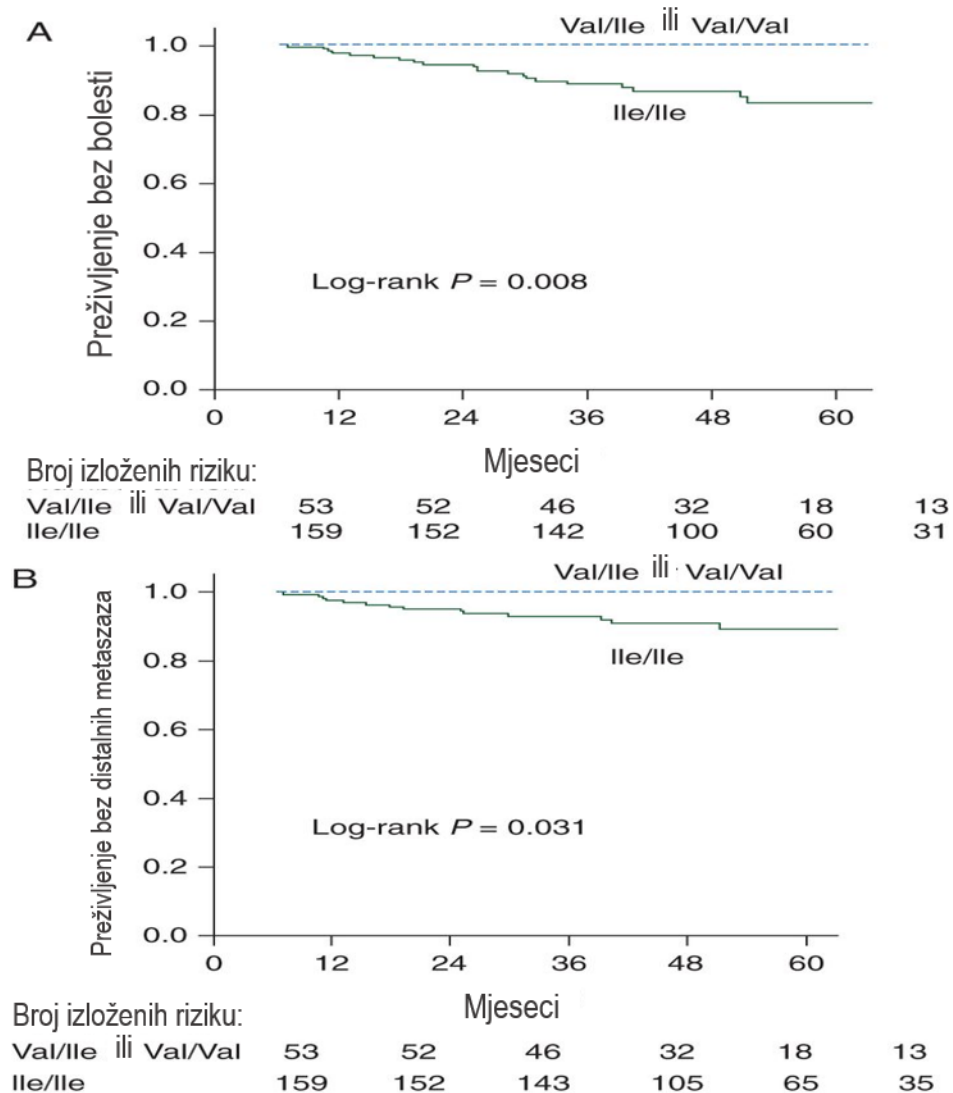
Trastuzumab je humanizirano rekombinantno monoklonsko protutijelo koje je usmjereno na izvanstaničnu domenu receptora HER2 na membrani tumorske stanice te blokiranjem dimerizacije s ostalim članovima obitelji EGFR-a blokira kinaznu aktivnost i unutarstaničnu signalnu transdukciju važnu za tumorsku proliferaciju i preživljenje (52). Klinička ispitivanja su pokazala da trastuzumab može značajno povećati preživljavanje bez progresije bolesti (DFS, eng. Disease free survival) i ukupno preživljenje (OS, eng. Overall survival) u bolesnika s HER2 pozitivnim rakom dojke. Međutim, stopa odgovora na trastuzumab varira i oko 50% bolesnika nema koristi od liječenja trastuzumabom (52).

Rezultati in vitro istraživanja pokazuju da polimorfizam [Ile655Val] može mijenjati funkciju gena *HER-2/neu* i oni s Val alelom imaju veću aktivnost kinaze proteina HER2 i veći potencijal proliferacije.

Do sada je objavljeno jedno kliničko istraživanje u kojem je istraživana povezanost između genotipa *HER-2/neu* [Ile655Val] i preživljenja bez progresije bolesti (DFS) te preživljenja bez distalnih metastaza (DDFS) u 4167 bolesnika s rakom dojke. Genotip HER2 [Ile655Val] nije bio povezan s DFS i DDFS u 2976 bolesnika oboljelih od HER2 negativnog raka, ali genotip *HER-2/neu* [Ile655Val] je bio povezan s DDFS u 1028 s HER2 pozitivnim rakom dojke. HER2 pozitivne bolesnice koji su primale adjuvantnu terapiju bez trastuzumaba, genotipa Val/Ile ili Val/Val imale su lošiji DFS i DDFS, međutim, genotip Val/Ile ili Val/Val je povezan s povoljnim DFS i DDFS kada su primale adjuvantnu terapiju u kombinaciji s trastuzumabom. Zaključno, genotip Val/Ile ili Val/Val može imati agresivniji fenotip i bolesnice s genotipom Val/Ile ili Val/Val imaju dobit od liječenja trastuzumabom (52). (Slika 2.9)

Istraživanje sugerira da genotip *HER-2/neu* [Ile655Val] utječe na preživljenje bolesnika s izraženom ekspresijom HER2 ali ne utječe na preživljenje HER2 negativnih bolesnika te da je učinak genotipa *HER-2/neu* [Ile655Val] ograničen na HER2 pozitivan rak dojke.

In vitro pokusi su pokazali da stanice koje ekspimiraju HER2/Val pokazuju veću sposobnost rasta i manju apoptozu od HER2/Ile tumorskih stanica. In vitro studije sugeriraju da su HER2/Val stanice osjetljive na liječenje trastuzumabom u odnosu na HER2/Ile stanice (53). Međutim, potrebne su nove studije obzirom da ovi rezultati mogu imati značajne kliničke implikacije u liječenju HER2 pozitivnog raka dojke.



Slika 2.10. A) Preživljenje bez progresije bolesti HER2 pozitivnih bolesnica koje su liječene trastuzumabom u ovisnosti o genotipu Val. B) Preživljenje bez distalnih metastaza također ovisno o genotipu Val.

Izvor: Han X, Diao L i sur. (2014) Association between the HER2 Ile655Val polymorphism and response to trastuzumab in women with operable primary breast cancer. Ann Oncol 25 (6): 1158-1164.



### 2.1.6.5 Polimorfizam *HER-2/neu* [Ile655Val] i utjecaj na kardiotoksičnost trastuzumaba

Liječenje HER2 pozitivnog raka dojke monoklonskim protutijelom trastuzumabom može uzrokovati srčano oštećenje s padom istisne frakcije lijeve klijetke (EFLV, eng. Ejection fraction left ventricle). Utjecaj polimorfizma *HER-2/neu* [Ile655Val] na pojavnost srčane disfunkcije istražuje se unazad nekoliko godina. Beauclair i sur. (2007. god.) kod 61 bolesnice s HER2 pozitivnim metastatskim rakom dojke našli su trastuzumabom razvijenu kardiotoksičnost u pet bolesnica odnosno 8,2% i sve bolesnice bile su genotipa Ile/Val ( $p = 0,0058$ ). Distribucija polimorfizma bila je slijedeća: Ile/Ile 59%, Ile/Val 34,4% i Val/Val 6,6%, a što je komparabilno s ranijim izvješćima u velikom broju bijelaca (53).

U kliničkom istraživanju 2013. godine (A. Mailliez i sur.), analizirajući skupinu žena s trastuzumab razvijenom kardiotoksičnošću ( $n=40$ ) i kontrolnu skupinu koja je primala trastuzumab ali nije razvila kardiotoksičnosti ( $n=84$ ), nije nađena razlika u distribuciji polimorfizma gena *HER-2/neu* u odnosu na razvoj kardiotoksičnosti ( $p= 0,91$ ) (54).

Istraživanje 2015.godine, (Gomez Pena i sur.) na populaciji od 78 bolesnice s HER2 pozitivnim rakom dojke, navodi povezanost genotipa Ile655Val kao čimbenika rizika za kardiotoksičnost izazvanu trastuzumabom: AG Ile/Val prema AA Ile/Ile  $p=0.012$ , AG Ile/Val+GG Val/Val prema AA Ile/Ile  $p=0.01$ , AG Ile/Val prema AA Ile/Ile+GG Val/Val  $p=0.005$  (55,56).

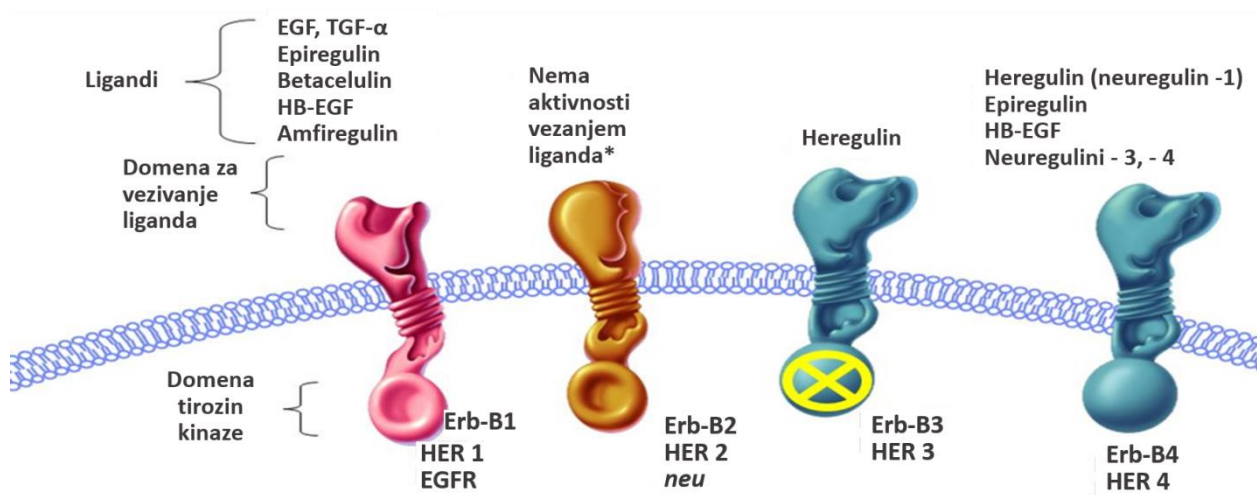
Prisutnost polimorfizma *HER-2/neu* [Ile655Val] i povećana konzumacija alkohola tijekom terapije trastuzumabom povećava rizik za razvoj kardiotoksičnosti (57). Obzirom na potencijalno značajan biomarker za otkrivanje kardijalne toksičnosti tijekom terapije trastuzumabom potrebne su nove kliničke studije na većem uzorku.

## **2.2. Struktura i biologija receptora HER**

### **2.2.1. Vrste i struktura receptora HER**

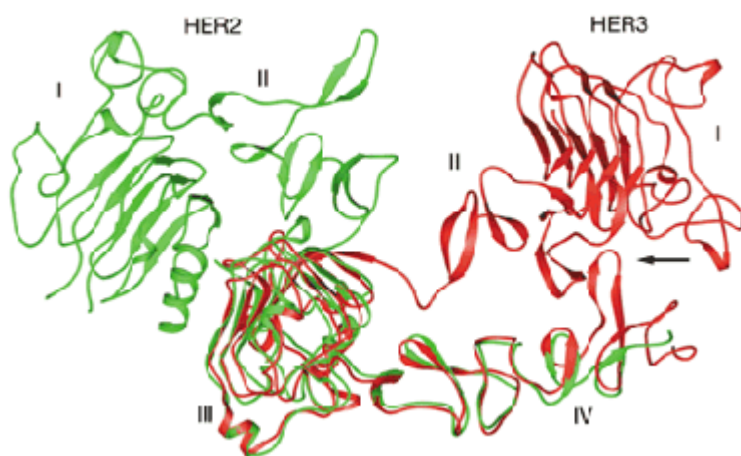
Obitelj receptora EGFR se sastoji od četiri strukturno srodna glikoproteinska receptora s aktivnošću tirozinske kinaze, receptorske tirozinske kinaze (RTK). Receptori se nazivaju i ErbB, što je izvedenica iz imena virusnih onkogenih s kojim su ti receptori homologni i prvi puta izolirani (virusni onkogen eritroblastične leukemije, eng. Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene) (58). Kod ljudi ova obitelj se zove i receptori HER od eng. Human Epidermal growth factor receptor, normalno se nalaze na stanicama različitih tkiva i imaju važnu ulogu u regulaciji bioloških procesa proliferacije i apoptoze. Njihova je ekspresija poremećena u mnogim tipovima karcinoma poput dojke, jajnika, mozga i prostate te su često povezani s lošijom prognozom bolesti (58,59).

Obitelj receptora EGFR sastoji se od četiri člana: receptor epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) poznat i kao ErbB1 ili HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 i ErbB4/HER4 (58,59,60). (Slika 2.11 i 2.12)



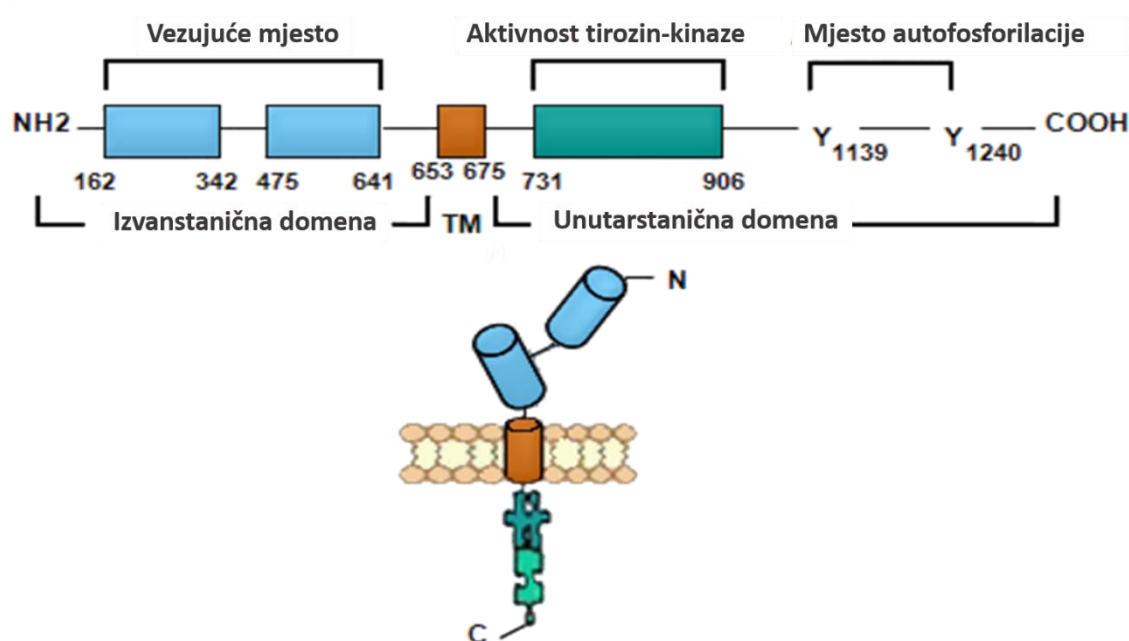
Slika 2.11. Receptori HER i njihovi ligandi, članovi su obitelji receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGF)

Izvor: Roskoski R (2004) The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. Biochem Biophys Res Commun. 18;319(1):1-11.



Slika 2.12. Trodimenzionalna struktura receptora HER2 i HER3 s pripadajuće četiri izvanstanične regije. Izvor: Nature Biotechnology 21, 377 (2003) doi:10.1038/nbt0403-377.

Svi receptori HER/ErbB su sastavljeni od izvanstanične regije ili ektodomene koja sadrži oko 620 aminokiselina, jedne membranski razgranate regije i citoplazmatske tirozin kinazne domene. Izvanstanično područje svakog člana obitelji sastavljeno je od četiri poddomene bogate leucinom i cisteinom (59-62). Domene I i III važne su za vezanje peptida, a dimerizacijska ruka se nalazi u domeni II (63,64) .



Slika 2.13. Shematski prikaz proteina HER2: unutarstanična citoplazmatska domena (zeleno) s katalitičkom aktivnošću tirozinske kinaze

Izvor: Casalini P, Marilena V ERBB2 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ERBB2ID162ch17q11.html>)

Ligandi koji aktiviraju HER signalne puteve su izvanstanični proteini iz skupine čimbenika rasta. Nakon vezanja liganda receptor HER se dimerizira s drugim (heterodimerizacija) ili istim članom obitelji (homodimerizacija) i dolazi do fosforilacije tirozina u unutarstaničnom dijelu receptora. Dimerizacija pokreće unutarstanične signalne puteve koji su važni u staničnoj proliferaciji i apoptozi. Nakon vezivanja liganda mijenja se konformacija receptora iz zatvorenog u otvoreni ili “spojni” oblik, u kojem se 10 aminokiselina duga dimerizacijska „ruka” može spojiti s drugim monomerom HER receptora (59,65). Ligandi su identificirani samo za HER1, HER3 i HER4. Za HER2 nema identificiranog specifičnog liganda te se tako još naziva i “receptor siročće”. Ipak, on se stalno nalazi u otvorenoj konformaciji i uvijek je na raspolaganju za dimerizaciju s drugim receptorima, što ga čini preferiranim dimerizacijskim partnerom za sve ostale članove obitelji receptora HER (66).

Postoji najmanje 16 različitih liganda koji se vežu na receptore HER. Ligandi se mogu grupirati u tri kategorije. Prva grupa uključuje EGF, Amphiregulin (Areg) i transformirajući čimbenik rasta-alfa (TGF-alfa, eng. Transforming Growth Factor alpha) koji se specifično vežu za HER1. Drugu grupu čine Betacelulin (BTC), Heparin vezajući EGF (HBEGF) i Epiregulin (Ereg) koji pokazuju dvojnju specifičnost vežući se za HER1 i HER4. Treću grupu čine Neuregulini (NRG) koji formiraju dvije podskupine na temelju njihove sposobnosti da vežu HER3 i HER4 (Nrg1 i Nrg2) ili samo HER4 (Nrg3 i Nrg4) (59,67). (Slika 2.11) U osnovi sve kombinacije parova četiri receptora mogu se aktivirati sa 16 do sada poznatih specifičnih HER liganda što čini veliki potencijal za različitost signalnog mehanizma (68).

Nakon vezanja liganda i dimerizacije receptora HER, signal se prenosi unutar stanice gdje se pokreće fosforizacija tirozina koju određuje podskupina Src homologije 2 (SH2) uz posljedičnu aktivaciju kaskadnog mehanizma fosforilacije (69,70,71).

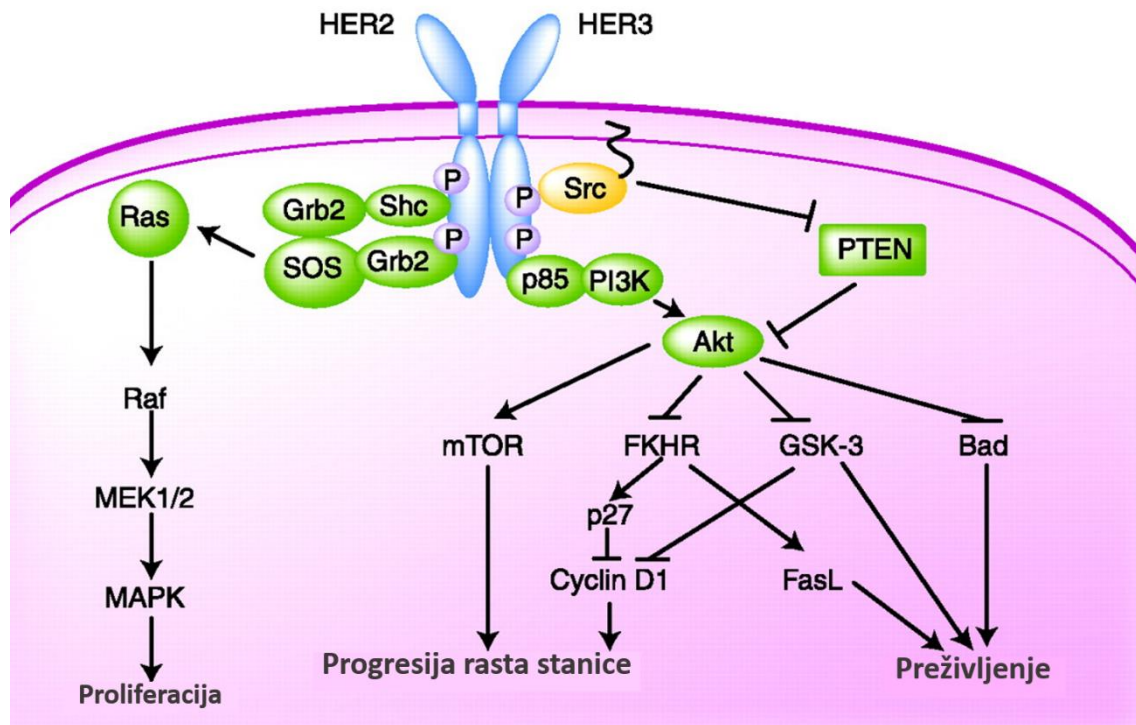
Čimbenici rasta ili ligandi vezanjem na receptor pokreću formiranje HER2 - HER3 heterodimera na površini stanice i aktivaciju citoplazmatskih kaskada fosforilacije te dovode do aktiviranja nekoliko važnih signalnih puteva, uključujući ERK2 (izvanstanične signalom regulirane kinaze) koja aktivacijom Ras-Raf putem c-myc onkoproteina čini glavni čimbenik transkripcije. Drugi važan put je PI3K-Akt koji je antiapoptotični i utječe na preživljenje stanice (59,72,73).

Glavni protein koji djeluje nizvodno od receptora HER2/HER3 je ciklin D1, koji promovira progresiju staničnog ciklusa. Aktivacija receptora HER dovodi do proliferacije, diferencijacije, adhezije i migracije stanice te takve stanice imaju povećani potencijal za metastaziranje (74,75).

Signalizacija koja se odvija preko receptora HER/ErbB, čak i u uvjetima prekomjerne izraženosti u tumorima, još se uvijek može regulirati. To znači da potencijalno postoji mnogo mjesta u signalizacijskim putevima na kojima terapijske intervencije mogu imati utjecaj na razvoj tumora (76).

### **2.2.2. Aktivacija receptora HER u stanicama raka**

Receptor obitelji HER može se nekontrolirano aktivirati u stanicama raka. U normalnim uvjetima aktivacija receptora je pod kontrolom, a time i proliferacijska aktivnost. Prekomjerna ekspresija receptora HER na površini stanice može dovesti do pojačanja unutarstaničnih signalnih puteva Ras-Raf te PI3K-Akt. (Slika 2.14.) Osim toga genetske mutacije mogu aktivirati receptor i bez vezanja liganda (77). Poremećena regulacija HER signalnih puteva povezana je s razvojem brojnih tumora, uključujući rak dojke, jajnika, mokraćnog mjehura, debelog crijeva, endometrija, rak jednjaka i želuca, maligni gliom, tumore glave i vrata, rak bubrežnih stanica, gušterače, prostate i ne-malih stanica pluća (77).



Slika 2.14. HER2 signalni put: Vezanje liganda inducira dimerizaciju HER2-HER3, što dovodi do fosforilacije tirozinske kinaze i aktivacije unutarstaničnih signalnih puteva.

Izvor: Lin U N, Winer Eric P (2007) Brain Metastases: The HER2 Paradigm. Clin Cancer Res 2007;13(6).

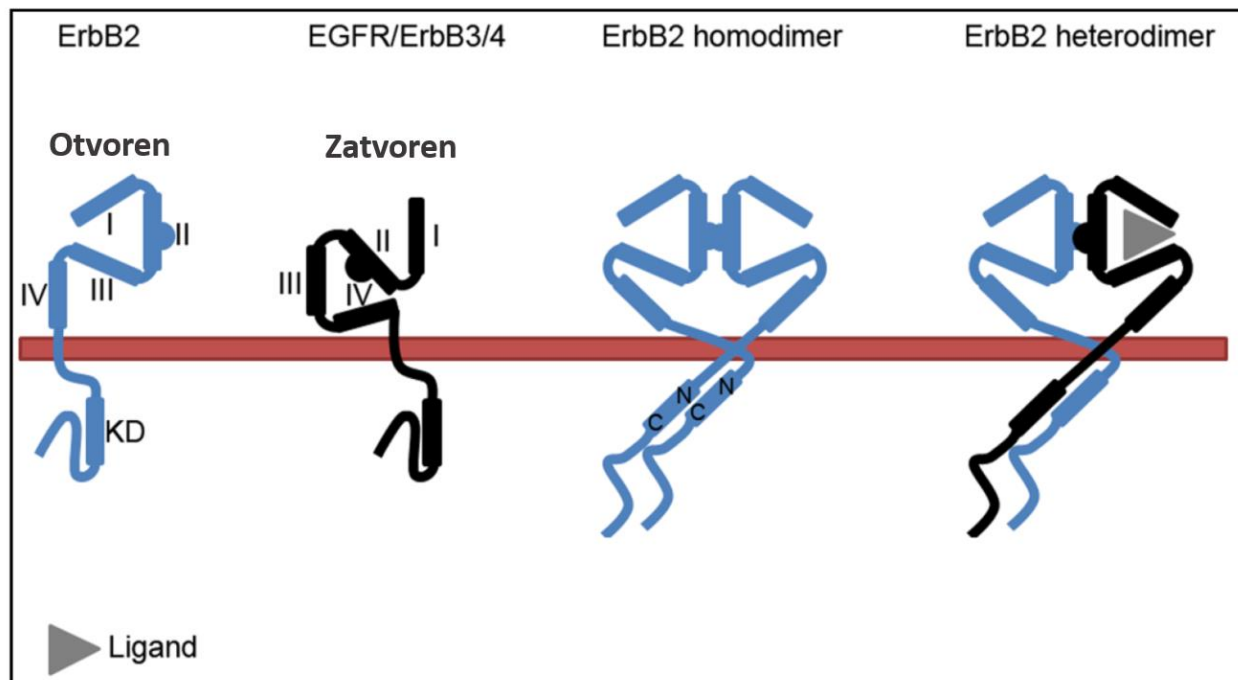
### 2.2.3. Receptor HER2

#### 2.2.3.1. Biologija i struktura receptora HER2

Receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (HER2), također poznat i kao ErbB2, je membranski glikoprotein koji pripada obitelji receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGF) s funkcijom tirozinske kinaze. Receptor se inače u malim količinama nalazi na epitelnim i mioepitelnim stanicama normalnog tkiva dojke. Zbog nedostatka vlastite domene za vezanje liganda i strukturne autoinhibicije glikoprotein HER2 ne može vezati ligand čimbenika rasta. Aktivacija tog receptora potiče niz događaja koji uvode stanicu u S-fazu staničnog ciklusa (59,78). Amplifikacija gena *HER-2/neu* dovodi do prekomjerne ekspresije receptora HER2, a tada iako nema poznatog vlastitog liganda, može se povremeno samoaktivirati putem spontane homodimerizacije. Češće ga međutim aktiviraju drugi članovi obitelji receptora HER koji vežu ligande, a s kojima formira heterodimere (79).

Dokazana je kristalna struktura vanstanične domene HER2 koja je fiksna i aktivirana konformacija, slična ligandom aktiviranom stanju drugih receptora (80,81). Dimerizacijska petlja koja je u vanstaničnoj domeni II stalno je otvorena i spremna za interakciju s drugim članovima obitelji receptora koji imaju sposobnost vezanja liganda (82). (Slika 2.15.) Zbog svoje strukture HER2 je preferirajući dimerizacijski partner za ostale receptore HER i uglavnom služi kao zajednički koreceptor (59,83). Kada formira dimere s drugim receptorima HER2 je u mogućnosti smanjiti postotak disociranja liganda od svojeg dimerizacijskog partnera te na taj način pojačava njegov signal i aktivira unutarstanične puteve u kontroli staničnog preživljenja (76). (Slika 2.16.) Upravo zbog aktivne konformacije HER2 posjeduje jedinstvenu poddomenu I-III koja interakciju liganda čini nemogućim, jer je mjesto za koje se veže ukopano duboko u strukturi receptora i nije dostupno za interakcije (59).

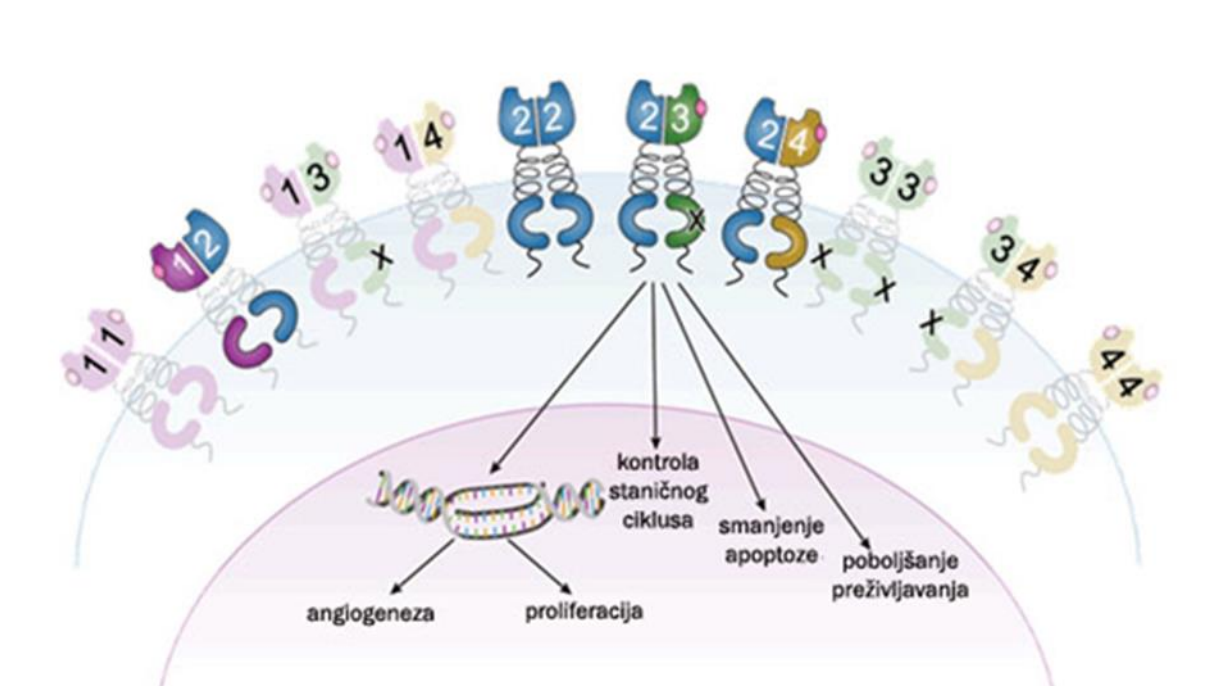




Slika 2.15. Konformiranje monomernih i dimernih proteina ErbB. Dok izvanstanična regija ErbB2 usvaja otvorenu konformaciju, EGFR, ErbB3 i ErbB4 ovise o vezanju liganda te se mijenjaju od zatvorene do otvorene konformacije i sudjeluju u dimerizaciji.

Izvor: Vibeke Bertelsen and Espen Stang (2014) The Mysterious Ways of ErbB2/HER2 Trafficking. *Membranes* 4(3), 424-446.

Poremećena regulacija signalizacije HER2 u stanicama raka rezultira viškom signala koji stimulira stanice raka na rast i širenje. Upravo je taj višak signala, više nego mutacija samog receptora, odgovoran za poguban učinak signalizacije HER2 u raku. Suvišak signalizacije nastaje amplifikacijom gena *HER-2/neu* i prekomjernom ekspresijom receptora HER2 (84).



Slika 2.16. Pojednostavljeni prikaz signalnih puteva koji su pokrenuti od 4 moguća dimera koji sadrže HER2 s naglaskom na ulogu genske ekspresije HER2 u karcinomu dojke

Izvor: Menard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Copyright © 2000 J Cell Phys; Preneseno iz Wiley-Liss, Inc, podružnica John Wiley & Sons, Inc

Više istraživanja je potvrdilo povezanost pojačane ekspresije HER2 sa višim stupnjem maligniteta i lošijom prognozom, uključujući rak dojke, prostate, jajnika i pluća (85). Prekomjerna ekspresija HER2 se nalazi u 15-30% slučajeva invazivnih duktalnih karcinoma dojke, a rijetko u invazivnom lobularnom karcinomu (59,86,87). Prekomjerna ekspresija HER2 povezana je s lošijom prognozom, pogotovo u bolesnika kojima su pazušni limfni čvorovi pozitivni na tumorske stanice (88).

### **2.2.3.2. HER signalizacija u razvoju raka dojke**

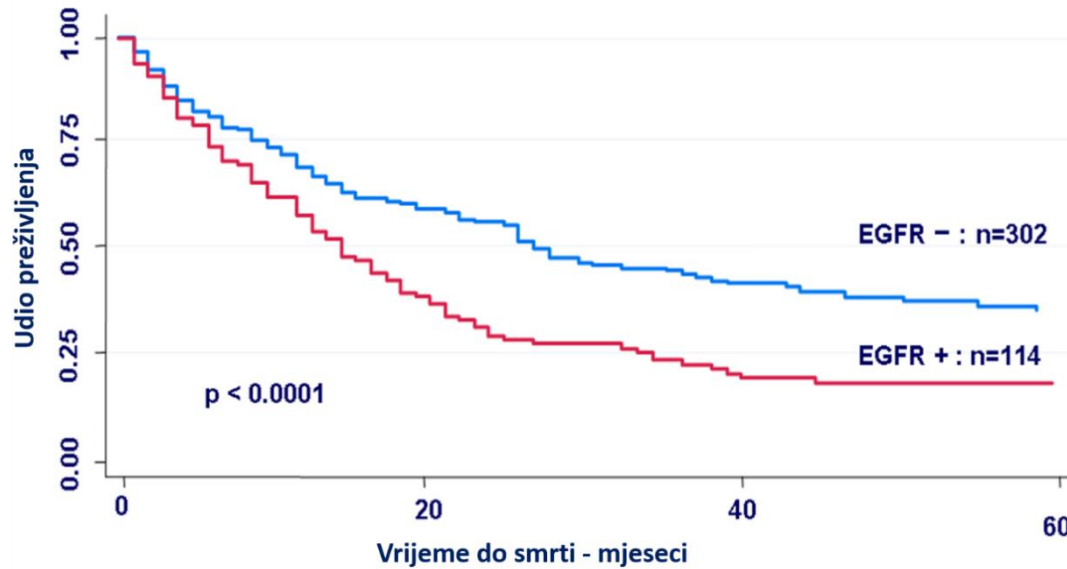
U regulaciji rasta i diferencijaciji dojke potrebno je normalno funkcioniranje sva četiri receptora HER obitelji EGFR (89). Nađeno je da su HER1 i HER2 prisutni u stromi i epitelu dojki mladih žena u fosforiziranom, aktivnom obliku. Receptor HER1 potreban je za razvoj mezenhima, ali ne i epitela (59,90). Prekomjerna ekspresija receptora HER2 u kulturi tkiva ili u mliječnoj žlijezdi transgeničnih miševa dovodi do transformacije, tumorogenosti i metastaziranja stanica (91). Čini se da je uloga HER2 glavna u inicijaciji i progresiji raka, a mogu biti prekomjerno izraženi HER1 i HER3. Nasuprot tome, ekspresija HER4 je rijetka, a kada je izražena povezana je s dobrom prognozom (92).

Ekspresija EGFR povezana je s agresivnim fenotipom tumora, ima veću sklonost proliferacije i genske nestabilnosti, češće prisutna u hormonski negativnih tumora, pogotovo progesteron (PR) negativnih. Istraživanja nisu pokazala povezanost veličine tumora i ekspresije EGFR (59,93).

### **2.2.3.3. Pozitivitet HER2 kao negativan prognostički čimbenik**

Kod raka dojke i jajnika pojačana ekspresija receptora HER2 povezana je s kraćim vremenom do povrata bolesti i lošijim preživljenjem, što su prvi dokazali Slamon i suradnici 1987.godine (59,64).

Utvrđeno je i da prekomjerna ekspresija receptora HER2 značajno korelirala s prekomjernom ekspresijom drugih tumorskih biljega karcinoma dojke poput endotelnog vaskularnog čimbenika rasta (VEGF, eng.Vascular Endothelial Growth Factor) te estrogenskih (ER) i progesteronskih receptora (PR). VEGF je odgovoran za tumorsku angiogenezu. Pozitivan HER2 fenotip do četiri puta ima češće negativni hormonski profil, njih 37% je hormonski negativno, u usporedbi s negativnim HER2 fenotipom gdje je 9% hormonski negativno (59,93,94). Hormoni kao što su estrogen i progesteron mogu suprimirati ekspresiju HER2 te su stoga na hormonske receptore pozitivni tumori, manje vjerojatno HER2 pozitivni (95). HER2 pozitivnost predstavlja negativan prognostički čimbenik na preživljenje bez progresije bolesti (DFS) i ukupno preživljenje (OS). (93). (Slika 2.17)



Slika 2.17. Kaplan-Meier krivulja preživljenja nakon povrata bolesti ovisno o statusu EGFR

EGFR pozitivni (HER2 pozitivni) bolesnici imali su značajno lošije preživljenje u odnosu na EGFR negativne bolesnike.

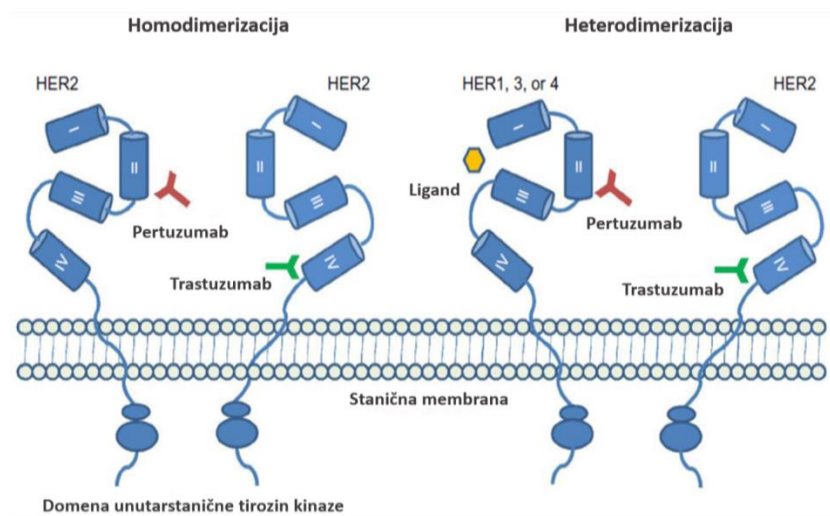
Izvor: Mothaffar F. Rimawi, Priya B. Shetty, Heidi L Weiss i sur. (2010) EGFR Expression in Breast Cancer Association with biologic phenotype and clinical outcomes. *Cancer*. 116(5): 1234–1242.

#### 2.2.3.4. Blokada HER2 signalizacije

Signalni putevi HER predstavljaju potencijalni terapijski cilj u mnogim tipovima tumora. Jedna od mogućih strategija liječenja uključuje razvoj molekula koje bi spriječile vezanje liganada na svoje receptore HER obitelji i koje bi na taj način blokirale aktiviranje signalnih puteva. Međutim, HER2 ne veže ligand, a kao preferirani partner za dimerizaciju receptora HER obitelji ima snažan utjecaj na prijenos signala. Druga je mogućnost ciljanje izvanstanične domene receptora na koju se veže ligand (s iznimkom HER2). Treća mogućnost je razvoj specifičnih monoklonskih protutijela koja bi se vezala za izvanstanične domene receptora HER obitelji i na taj način blokirala aktivaciju receptora ili spriječila njegovu dimerizaciju.

Tako se sprječava fosforilacija tirozinske kinazne domene receptora i pokretanje nizvodnih signalnih puteva (59,96).

Tirozinsko kinazna domena receptora HER koja se nalazi unutar stanice također može biti terapijski cilj. Inhibiciju tirozinske kinaze tumorske stanice mogu nadoknaditi povećavanjem aktivacije HER3. Dakle, HER3 ne ostaje "isključen" nakon liječenja inhibitorima tirozinske kinaze. Stoga postoji mogućnost da se fosforilizira, te omogućiti aktiviranje PI3K/Akt puta koji je kritički važan tumorski signalizacijski put. Ovi podaci ukazuju na ključnu ulogu koju HER3 može igrati u HER2 pozitivnom raku (59,97). Temeljem saznanja biologije HER2 signalizacije te nakon provedenih kliničkih istraživanja, 1998.godine FDA (eng.Food and Drug Administration) je odobrila prvi receptorski tirozinski kinazni inhibitor trastuzumab, humanizirano monoklonsko protutijelo. U godinama koje su slijedile primjenjuju se i drugi inhibitori tirozinske kinaze kao što su pertuzumab, trastuzumab emtanzine (TDM-1) te lapatinib (98). (Slika 2.18)



Slika 2.18. Monoklonska protutijela trastuzumab i pertuzumab se vežu na različite domene vanstaničnog dijela receptora HER2 te blokiraju tirozinsko kinaznu aktivnost EGFR-a.

Izvor: Lamond NW, Younis T REVIEW (2014) Pertuzumab in human epidermal growth-factor receptor HER-positive breast cancer: clinical and economic considerations.Vol 2014:6509-521.

### 2.2.3.5. Uloga HER2 u srčanom razvoju

Najčešća nuspojava liječenja karcinoma dojke trastuzumabom, monoklonskim protutijelom usmjerenim na receptor HER2 je razvoj kardiotoksičnosti, što je potaknulo ispitivanja utjecaja gena *HER-2/neu* u razvoju srca. Studije genske ablacije pokazale su da HER2 u srcu heterodimerizira s HER3 i HER4 te tada ima visok afinitet za ligand neuregulin-1 (NRG-1). Tijekom srčanog razvoja, neuregulin-1 se sintetizira u endokardu i stimulira receptore HER2/HER4 u miokardu. U razvijenom srcu HER2 i HER4 se nalaze u T-tubulima kardiomiocita, HER2 je prvenstveno u poprečnim kanalićima srčanih miocita, a HER4 na alveolarnim mikrodomenama unutar miocita (59,99). NRG-1 se nalazi u endokardu i mikrovaskularnim endotelnim stanicama (100). Važno je napomenuti da ni HER2 niti HER4 sami ne mogu nadoknaditi gubitak drugog receptora u srcu, što sugerira da NRG signalizacija u srcu zahtijeva HER2/HER4 heterodimer (101,102). (Slika 2.19 ).

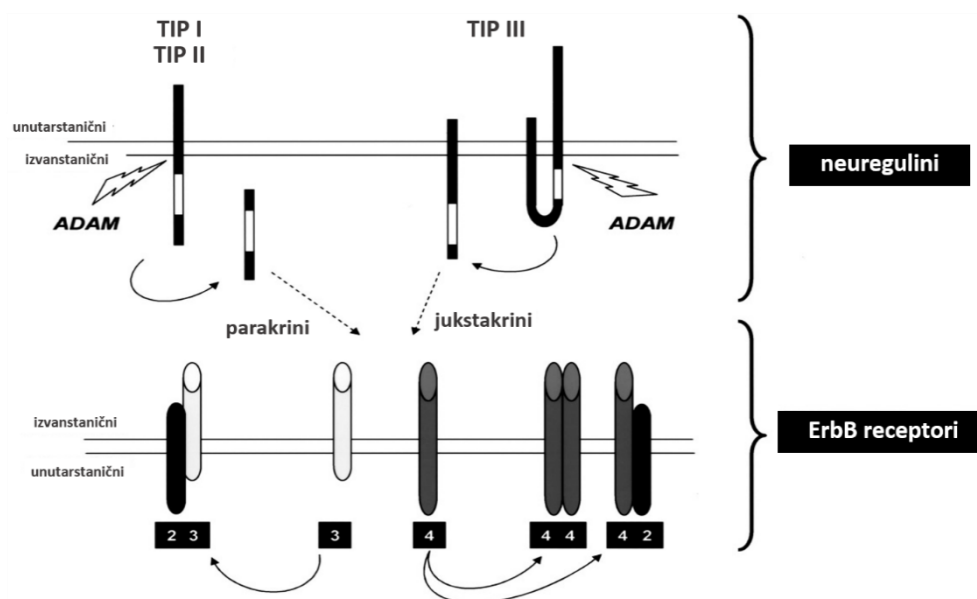
Za proučavanje uloge HER2 korišteni su transgenični miševi s izbrisanim genom *HER-2/neu*. Mišji embriji kojima nedostaje receptor HER2 ugibali su u sredini gestacije (11. dan) zbog nepravilnog formiranja trabekula srčanih klijetki (103,104). Takvi HER2 uvjetno mutirani miševi imali su složeni srčani fenotip uslijed gubitka kardiomiocita i opterećenja srca s posljedičnom hipertrofijom i dilatacijom klijetki te smanjenjem funkcije srčane pumpe. Također su pokazivali produljeno vrijeme repolarizacije klijetke (produljen QTc interval na elektrokardiogramu) i povećanu učestalost tahikardija. Slične promjene s produljenjem QTc i složenim ventrikulskim tahikardija tipa “torsada de pointes” nalaze se kod promjena u aktivnosti K<sup>+</sup> ili Na<sup>+</sup> kanala. Neuregulin/HER signalizacija povećava preživljavanje i hipertrofični rast odraslih srčanih miocita u kulturi stanica (59,105).

Kako bi se utvrdilo jesu li HER2 uvjetno mutirani srčani miociti osjetljiviji na antraciklinom induciranu staničnu smrt njihovi neonatalni izolirani srčani miociti tretirani su antraciklinom doksorubicinom. Mutirani HER2 miševi pokazali su povećanu osjetljivost na doksorubicin (106).

Jasno je da su kardiotoksični učinci trastuzumaba izravna posljedica gubitka HER2 signalizacije u srcu, a uvjetno mutirani miševi ustvari pokazuju isti oblik srčane disfunkcije kao i bolesnici liječeni s trastuzumabom (106). Budući da je i HER4 izražen u kardiomiocitima odraslih, moguće je da ima ulogu u kardiotoksičnosti koja je inducirana trastuzumabom. Međutim specifična protutijela na HER4 ne ometaju NRG1-induciranu HER2-HER4 heterodimerizaciju (107).

Embrionalna smrtnost miševa s izbrisanim genom HER3 pokazuje srčani fenotip različit od miševa bez NRG i receptora HER2/HER4. Receptor HER3 se može pronaći samo u mezenhimalnim stanicama endokardnih jastučića, u strukturi koja razdvaja embrionalne pretkljetke i kljetke, a nema ga u endokardu niti u miokardu. Miševi s izbrisanim genom za HER3 pokazuju abnormalnosti srčanih jastučića, što dovodi do insuficijencije srčanih zalistaka (108).

Osim za razvoj srca HER2 je nužan i za razvoj središnjeg živčanog sustava, osjetilnih ganglija iz kranijalnog neuralnog grebena kao i razvoj motoričkih živaca (109).



Slika 2.19. NRG-1 / ErbB signalizacija u srcu. NRG-1 izoforme se dijele u 3 vrste. Tip I i II NRG su pojedinačni transmembranski proteini. Proteolitička razgradnja od strane ADAM (eng. a-disintegrin and metalloprotease) rezultira oslobađanjem bioaktivnih fragmenata koji se vežu na domenu EGFR. Tip NRG III imaju cistein-bogatu domenu i pojedinačni transmembranski proteini. Cijepanje tipa III izoformi stvara transmembranski N-terminalni fragment. Dakle, tip I i II izoforme su specijalizirane za parakrinu signalizaciju, a tip III NRG za jukstakrine signale. Tip I NRG su dominantni, ako ne i jedini, tip u srcu. NRG-1 se može vezati na 2 receptora: ErbB3 i ErbB4. Vezanje liganda inducira formiranje homodimera i heterodimera. Homodimeri ErbB3 su nefunkcionalni jer ErbB3 ima smanjenu katalitičku aktivnost. ErbB2 ne može izravno vezati NRG-1, ali je omiljeni partner za heterodimerizaciju. Nakon dimerizacije aktivira se tirozinska kinaza s fosforilacijom specifičnih tirozinskih ostataka u citoplazmatskom repu receptora i time se signali provode nizvodno.

Izvor: Lemmens K, Kris Doggen i Gilles W. De Keulenaer (2007) Role of Neuregulin-1/ErbB Signaling in Cardiovascular Physiology and Disease. Implications for Therapy of Heart Failure. *Circulation*.116:954-960.



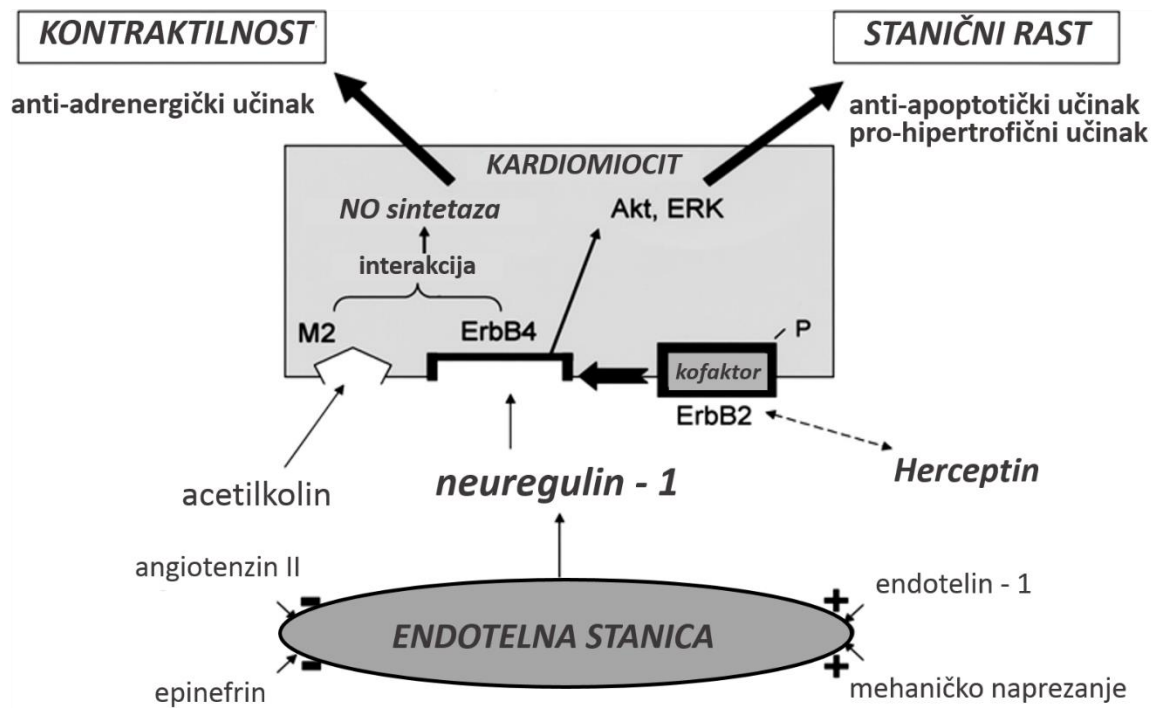
### 2.2.3.6. Neuregulin (NRG-1) regulator srčane funkcije

Neuregulin 1 (NRG-1) je ključan promotor rasta i razvoja miokarda, a NRG-1/HER sustav je važan i u srčanoj fiziologiji nakon završenog razvoja. Novi eksperimentalni dokazi pokazuju da NRG-1 regulira kontraktilnost miokarda, simpatikovagalnu ravnotežu te da dinamički sudjeluje u hemodinamskoj homeostazi kardiovaskularnog sustava (59,110).

Postnatalni poremećaj NRG-1/HER signalizacije kod miševa dovodi do razvoja dilatacijske kardiomiopatije. Neuregulinska signalizacija u srcu dovodi do sinteze proteina, stabilizacije kontraktilnih proteina, indukcije fetalnog genskog programa i smanjenja apoptoze (111).

Prvi dokaz funkcije NRG-1/HER puta u srčanoj morfogenezi otkriven je u istraživanjima na miševima s brisanim genom NRG-1. Ti miševi isto kao i oni s izbrisanim HER2 ugibaju na pola embriogeneze (10,5 dana) zbog nenormalne trabekulacije ventrikula (99).

Osim svoje uloge u trabekulaciji klijetke i u formaciji srčanih jastučića, NRG-1 također sudjeluje u diferencijaciji embrionalnih kardiomiocita u stanice provodnog sustava te potiče diferencijaciju i preživljenje kardiomiocita proizašlih iz embrionalnih matičnih stanica. Osim zaštitne uloge u integritetu tkiva miokarda, srčani sustav NRG-1/HER djeluje i na kardiovaskularni neurohormonalni autoregulatorni sustav. Antiadrenergička NRG-1/HER signalizacija i antiadrenergička muskarinska signalizacija međusobno su usko povezane, tako da antiadrenergička NRG-1/HER signalizacija nestaje kada je muskarinski acetilkolinski receptor blokiran (59,111). Također i obrnuto antiadrenergička muskarinska kolinergička signalizacija se smanjuje u odsustvu NRG-1. Sinteza i oslobađanje NRG-1 je barem dijelom pod kontrolom aktivnosti adrenergičkog i renin-angiotenzinskog sustava. Pronađeno je da angiotenzin II i fenilefrin izravno smanjuju količinu NRG-1 u kulturama endokarda i srčanih mikrovaskularnih endotelnih stanica, glavnih izvora NRG-1 u srcu (59,112). (Slika 2.20.)



Slika 2.20. Prikaz funkcije NRG-1 u srcu

NRG-1 se sintetizira u endotelnim stanicama u blizini kardiomiocitima, u endokardu i mikrovaskulaturi. Sinteza NRG-1 je potisnuta angiotenzinom II i epinefrinom, a stimulirana endotelinom-1 i mehaničkim naprežanjem. NRG-1 se veže na ErbB4 na kardiomiocitima te nakon homodimerizacije s ErbB4 ili heterodimerizacija s ErbB2 dovodi do aktivacije Akt i ERK signalnih puteva te staničnog rasta i antiapoptoze. U suradnji s muskarinskim receptorima (M2) i sintezom NO u kardiomiocitu utječe na kontraktilnost i adrenergičku aktivaciju.

Izvor: Lemmens K, Doggen K, Gilles W. De Keulenaer (2007) Role of Neuregulin-1/ErbB Signaling in Cardiovascular Physiology and Disease. Implications for Therapy of Heart Failure. Circulation. 116:954-960.

U životinjskim modelima su nađene značajne promjene u srčanom NRG-1/HER sustavu tijekom progresije kroničnog zatajivanja srca (KZS). Pojačana ekspresija NRG-1/HER se prvo javlja u ranim i smanjuje tek u kasnijim fazama bolesti, kada nastaje insuficijencija srca kao pumpe. Početni snažan rast NRG-1 mRNA u lijevoj klijetki javlja se tijekom faze koncentrične hipertrofije i najvjerojatnije je posljedica mehaničkog naprezanja zida klijetke. Naknadno smanjenje NRG-1 poklapa se s razvojem ekscentrične hipertrofije i nastanka insuficijencije srca kao pumpe, a prati ga smanjena regulacija mRNA razine HER2 i HER4 (59,113).

NRG-1 djeluje preko receptora HER2 i HER4 na parakrino poticanje Akt/PI3-kinaze kao glavnog medijatora ali i na MAPK, Src i NO sintetazu, koje zajedno potiču preživljavanje miocita u okruženju pojačanog stresa. Inaktivacija signalizacije NRG-1/HER u kasnijim fazama KZS može biti adaptivna barem u smislu hemodinamskih uvjeta periferne cirkulacije, kada treba povećati adrenergičku stimulaciju zbog smanjene funkcije srca kao pumpe. Gubitak NRG-1 posredovane zaštite tkiva je, međutim, štetan i ključni je korak u daljnjem procesu pregradnje klijetki (59,114).

Čini se da farmakološka aktivacija HER signalizacije ima povoljno djelovanje u liječenju zatajivanja srca i uz trenutačne lijekove obećavajući je terapijski pristup u sprječavanju ili smanjenju miokardne disfunkcije. Nađeno je da kratkoročno davanje intravenskog rekombinantnog NRG-1 $\beta$  poboljšava srčanu funkciju i preživljenje u bolesnika s različitim oblicima kardiomiopatija (115). Nađena je korelacija povećane razine cirkulirajućeg NRG-1 $\beta$  i težine bolesti te bi se NRG-1 $\beta$  mogao koristiti i kao novi biomarker u kliničkoj primjeni (116).

### **2.2.3.7. Inhibitori tirozinske kinaze i receptora HER2**

Za sada postoje dvije glavne grupe inhibitora tirozinske kinaze: inhibitori receptorskih tirozinskih kinaza (RTK), protutijela koja se vežu na vanstaničnu domenu receptora HER2 te male molekule inhibitora tirozinskih kinaza (TKIs) koji inhibiraju vezanje ATP-a u domeni tirozinske kinaze, inhibiraju nereceptorske tirozinske kinaze (117,118). Receptor HER2 je zbog svoje otvorene konformacije, stalno spremne za dimerizaciju, pogodan za terapiju s monoklonskim protutijelima koja se vežu za izvanstaničnu domenu receptora i tako smanjuju njegovu aktivnost.

Tirozinsko kinazna domena HER2 se nalazi unutar stanične membrane i može također biti cilj antitumorske terapije. Male molekule mogu spriječiti fosforilaciju tirozinsko kinazne domene HER2 (119). Ove molekule mogu biti specifične za HER2, ali mogu također djelovati na tirozin kinazne domene drugih staničnih receptora.

Protutijela koja ciljaju EGFR i HER2 imaju dodatnu sposobnost aktivacije imunološkog staničnog odgovora na tumor putem vezanja makrofaga i monocita na svoju Fc domenu koja ima specifičan receptor na ovim stanicama. U pretkliničkim modelima ovaj mehanizam je značajan za antitumorski učinak trastuzumaba, ali koliko je on značajan i u bolesnika oboljelih od raka ostaje nejasno (120).

## **2.3. Trastuzumab**

### **2.3.1. Otkriće i mehanizam djelovanja**

Trastuzumab (Herceptin ®; F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Švicarska) je humanizirano monoklonsko protutijelo usmjereno protiv receptora HER2 na membrani tumorske stanice (59). Princip terapije je usvojen otkrićem da protutijelo za onkogeni receptor štakora vezanjem za epitop p185 ljudskog receptora HER2 dovodi do njegove inaktivacije (121).

Štakorska protutijela ipak nisu optimalna za liječenje raka kod ljudi zbog smanjenog afiniteta za ljudski homolog. Kako bi prevladali imunološke posljedice terapije mišjim protutijelima u ljudi, Carter i sur. razvili su rekombinantnu humaniziranu verziju. Rezultirajuće molekule posjeduju tri puta veći afinitet za epitop p185 receptora HER2 (59,122). Humanizirano 4D5 protutijelo (kasnije nazvano trastuzumab, također poznato i kao Herceptin®) uvelike je proširilo svoj potencijal kliničkog korištenja. Mehanizmi kliničke djelotvornosti trastuzumaba su multipli, osim FC-posredovane funkcije, predklinička istraživanja su pokazala da protutijela smanjuju razine receptora HER2 na stanici i aktivaciju signalnih puteva posredovanih s HER2 (123).

### **2.3.2. Indikacije za primjenu trastuzumaba**

Rak dojke je u svijetu najčešća maligna novotvorina kod žena s procijenjenih 1,67 milijuna novih slučajeva raka godišnje (25% svih vrsta raka). Stopa pojavnosti manja je u slabije razvijenim zemljama (27/100 000 u srednjoj Africi i istočnoj Aziji) dok je u Sjevernoj Americi pojavnost 92/100 000. Najčešći je uzrok smrti od raka u manje razvijenim zemljama (324 000 smrtnih slučajeva), a drugi uzrok smrti od raka u razvijenim zemljama (198 000 smrtnih slučajeva) (124). Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo 2013. rak dojke je najčešći zloćudni tumor u žena (26% od svih tumora) te je 2013. bilo 2557 novodijagnosticiranih, a umrle su 994 žene (125).

Postoji više bioloških podtipova raka dojke, a oko 15-30% su HER2 pozitivni s prekomjernom ekspresijom receptora HER2, slabijom diferencijacijom, višom stopom stanične proliferacije i zahvaćenošću pazušnih limfnih čvorova. Pozitivitet HER2 je negativni prognostički čimbenik u preživljenju takvih bolesnica.

Liječenje trastuzumabom u monoterapiji (126) ili u kombinaciji s kemoterapeuticima rezultira značajnim kliničkim poboljšanjem i značajno boljim preživljenjem u odnosu na liječenje samo kemoterapijom (127).

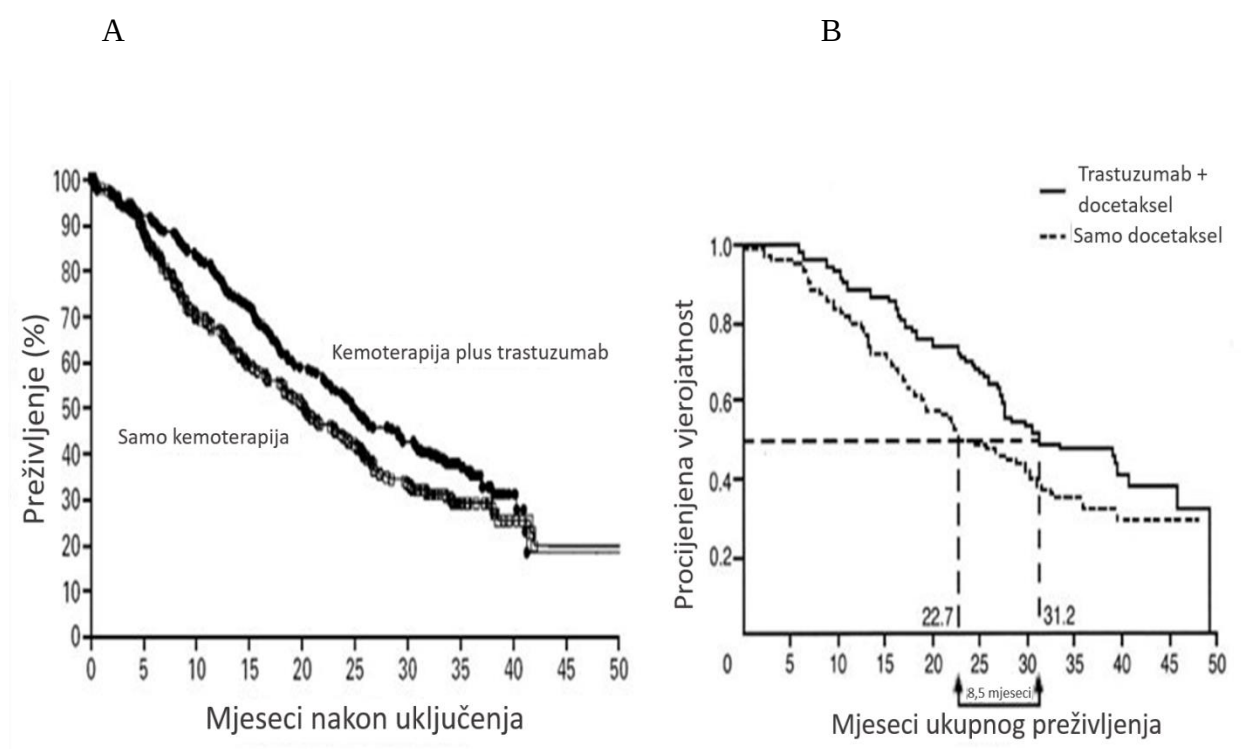
Antraciklini, kao što su doksorubicin i epirubicin i dalje čine osnovu liječenja raka dojke, ali je njihova primjena ograničena kardiotoksičnošću za koju se zna da ovisi o kumulativnoj dozi ovih kemoterapeutika (59, 128). Izrazito povišena incidencija kardiotoksičnosti (28%) nađena je u istraživanjima koja su uključivala istodobnu primjenu antraciklina s trastuzumabom (129).

### **2.3.2.1. Metastatski rak dojke**

Prvo randomizirano kliničko istraživanje faze III, H0648g (Slamon i sur. 2001. god.) u prvoj liniji liječenja metastatskog HER2 pozitivnog raka dojke pokazalo je da trastuzumab u kombinaciji s kemoterapijom (paklitakselom) značajno poboljšava medijan preživljenja u usporedbi sa samom kemoterapijom od 20,3 na 25,4 mjeseci (Slika 2. 21). Stopa ukupnog odgovora bila je 50%, dok je stopa ukupnog odgovora na samu kemoterapiju bila 32% ( $p < 0,001$ ). Dodatak trastuzumaba postojećim kemoterapijskim protokolima značajno smanjuje jednogodišnju smrtnost od 33% na 22% u usporedbi sa samom kemoterapijom ( $p = 0,008$ ). Trastuzumab smanjuje rizik smrtnosti kod metastatskog raka za 22,4% (129).

Analiza bolesnica liječenih trastuzumab+ AC (doksorubicin, ciklofosfamid) pokazala je medijan preživljenja 26,8 mjeseci u odnosu sa 22,8 mjeseci u onih koji su primali samo kemoterapiju AC (130). Tek je kasnije utvrđen povećan rizik od srčanog oštećenja, naročito u bolesnica koje su primale trastuzumab u kombinaciji s doksorubicinom (131).

Istraživanje M77001, objavljeno 2005. (Marty i sur.) s primjenjenom kombinacijom docetaksela i trastuzumaba, u metastatskom HER2 pozitivnom raku dojke je pokazalo još bolje rezultate u odnosu na sam docetaksel. Medijan ukupnog preživljenja od 31,2 mjeseca u bolesnica koje su primale docetaksel i trastuzumab u odnosu na sam docetaksel s medijanom preživljenja od 22,7 mjeseci, odnosno razliku u ukupnom preživljenju od 8,5 mjeseci (129). ( Slika 2. 21)



Slika 2.21. Slika A i B: Dvije studije u prvoj liniji liječenja metastatskog HER2 pozitivnog raka dojke ( A-studija H0648g; B-studija M77001) trastuzumab u kombinaciji s kemoterapeutikima (A-paklitaksel i B- docetaksel) značajno produžuje medijan ukupnog preživljenja u odnosu na samu kemoterapiju. Slika B: Trastuzumab u kombinaciji s docetakselom produžuje medijan ukupnog preživljenja za 8,5 mjeseci u odnosu na sam docetaksel. Medijan preživljenja 31,2 za kombinaciju naspram 22,7 mjeseca za monoterapiju docetakselom.

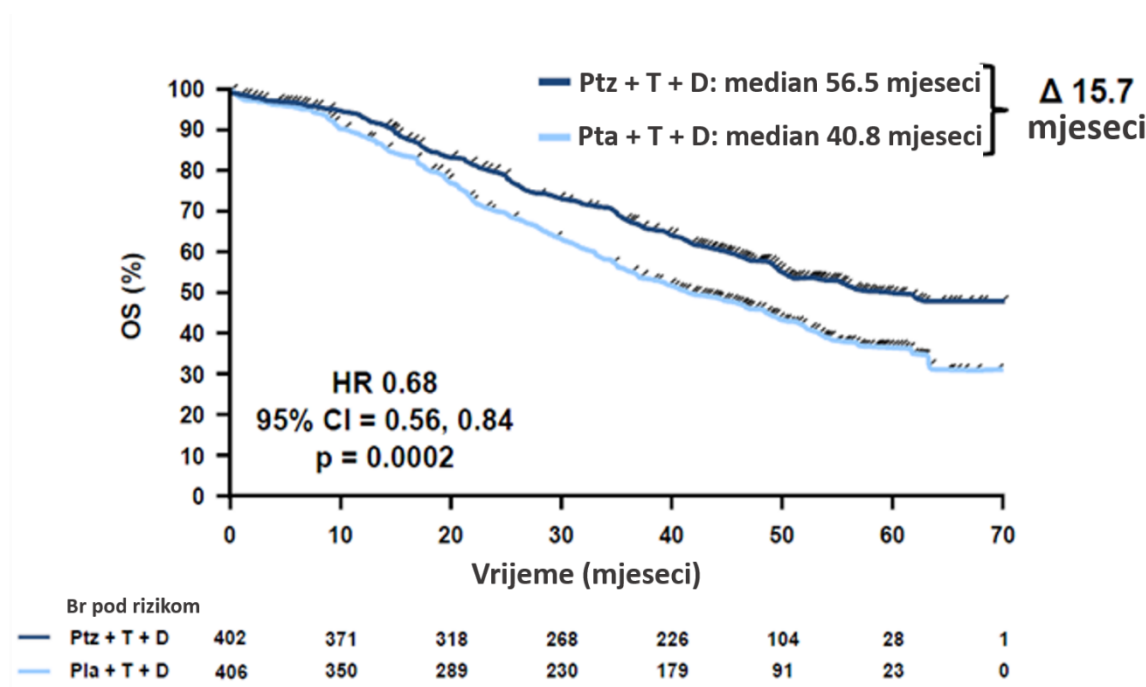
Izvor: Slamon i sur. (2001) Trastuzumab in 1st line of MBC increase OS H0648g. N Eng J Med  
Marty i sur. (2005) Trastuzumab in 1st line of MBC M77001. J Clin Oncol 32:23-38.

Trastuzumab je, nakon objave prvih pozitivnih rezultata studija u metastatskom raku dojke, u rujnu 1998. od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) odobren za liječenje metastatskog HER2 pozitivnog raka dojke.

Novi revolucionarni rezultati dualne blokade HER2 u metastatskom raku dojke objavljeni su 2012. (Baselga i sur.). Kombinacija kemoterapeutika docetaksela s dualnom blokadom HER2 (trastuzumab i pertuzumab), CLEOPATRA studija, pokazala je objektivnu stopu odgovora na dualnu blokadu od 80,2% u odnosu na docetaksel plus trastuzumab 69,3% (132). Završna analiza medijana ukupnog preživljenja (OS) je pokazala impresivne rezultate od 56,5 mjeseci za dualnu blokadu receptora HER2 trastuzumabom i pertuzumabom u odnosu na 40,8 mjeseci za docetaksel plus trastuzumab (133). (Slika 2.22).

Pojavnost kardiotoksičnosti kod dualne blokade bila je 6,8%, a kod grupe trastuzumab i docetaksel 8,8% (134).





Slika 2. 22. Prikaz završnih rezultata ukupnog preživljenja (OS) kod metastatskoga HER2 pozitivnog raka dojke, CLEOPATRA studija, dualna blokada receptora HER2 trastuzumabom (T) i pertuzumabom (Ptz) kao novi standard u liječenju HER2 pozitivnog metastatskog raka dojke.

Izvor: Swain S M i sur. Improved Survival in HER2+ Metastatic Breast Cancer. Final overall survival (OS) analysis from the CLEOPATRA study of first-line (1L) pertuzumab (Ptz), trastuzumab (T), and docetaxel (D) in patients (pts) with HER2-positive metastatic breast cancer (MBC) ESMO 2014 Abstract 350O-PR

### **2.3.2.2. Adjuvantno liječenje trastuzumabom ranog raka dojke**

Nakon ohrabrujućih rezultata liječenja trastuzumabom metastatskog HER2 pozitivnog raka dojke uslijedile su studije u adjuvantnom liječenju ranog raka dojke: Adjuvantna studija s herceptinom (eng. Herceptin Adjuvant trial [HERA]), Nacionalni kirurški projekt adjuvantnog liječenja dojke i debelog crijeva B-31 (eng. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project [NSABP] B-31), Sjeverno-središnja grupa liječenja raka N9831 (eng. North Central Cancer Treatment Group [NCCTG] N9831) i Internacionalna grupa za istraživanje raka dojke [BCIRG] 006 (eng. Breast Cancer International Research Group [BCIRG] 006). Studije su uključile više od 13.000 žena s HER2 pozitivnim ranim rakom dojke. Kumulativne analize ovih ispitivanja su pokazale da je trastuzumab smanjio 3-godišnji rizik od povrata raka dojke za oko jednu polovinu. Nakon dobivenih rezultata ovih istraživanja, terapija trastuzumabom davana u kombinaciji s jednim od kemoterapeutika (paklitaksel, docetaksel, karboplatin) trenutno je standard liječenja ranog stadija HER2 pozitivnog raka dojke (59, 126,127).

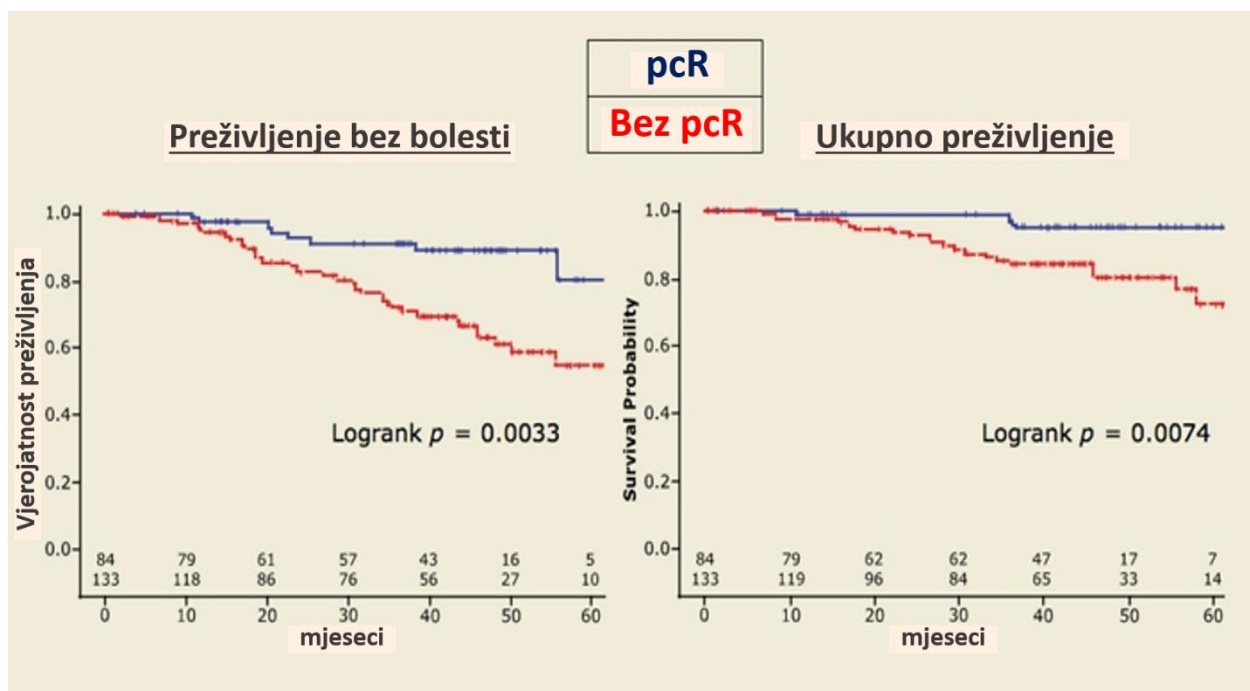
Jednogodišnje liječenje trastuzumabom ranog HER2 pozitivnog raka dojke u HERA studiji (Europska studija), gdje je trastuzumab primjenjivan sekvencijski nakon završenog liječenja kemoterapijom ( antraciklini, paklitaksel) i nakon završenog zračenja, reducira rizik povrata bolesti za 46% i rizik smrtnosti za 26% (134). Primjena trastuzumaba tijekom dvije godine (HERA studija) nije pokazalo veći benefit u odnosu na jednogodišnje liječenje (135,136). Pojavnost simptomatskog srčanog zatajivanja bila je 1,7% od kojih 0,54% teškog stupnja (134).

U Kanadsko - američkim studijama (NCCTG N9831/ NSABP B-31) gdje je trastuzumab primjenjivan konkomitantno s taksanima (paklitaksel, docetaksel) nakon četiri ciklusa antraciklina, jednogodišnje liječenje trastuzumabom reducira rizik povrata bolesti za 52% ( $p < 0,001$ ) i rizik smrtnosti za 37% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na samu kemoterapiju (137,138). Nakon 5-godišnjeg praćenja kumulativna pojava kardijalnih događanja bila je 0,9% u grupi bez trastuzumaba i 3,8% u grupi koja je primala trastuzumab istovremeno s paklitakselom (138).

U studiji bez primjene antraciklina, BCIRG 006, redukcija rizika recidiva bolesti bila je 28% i redukcija smrtnosti za 37%. Kumulativna pojava kardijalnih događaja nakon 5 godina praćenja bila je 0,4% (137).

### 2.3.2.3. Rani rak dojke- neoadjuvantno liječenje trastuzumabom

Neoadjuvanto (preoperativno) sustavno liječenje raka dojke terapijski je put kod biološki agresivnih podtipova tumora, tumora  $\geq 2$  cm ili lokalno uznapredovalih tumora uključujući i inflamatorni rak. Ovakav pristup nudi nekoliko kliničkih prednosti: u bolesnica s velikim tumorima dovodi do smanjenja veličine tumora, a time i mogućeg poštenijeg operativnog zahvata. Nadalje, omogućuje praćenje terapijskog odgovora i prekida u slučaju progresije bolesti te se bolesnik ne izlaže toksičnosti terapije bez kliničkog benefita. U novije vrijeme, preoperativna terapija je postala priznata kao in vivo biološki pokus. Učinak terapije procjenjuje se prema patološkom kompletnom odgovoru (pCR, eng. Pathological Complete Response) i eventualnoj rezidualnoj bolesti (RCB, eng. Residual Cancer Burden) (139,140). (Slika 2.23.)



Slika 2.23. Patološki kompletni odgovor (pCR) nakon neoadjuvantne kemoterapije + trastuzumab prediktor je preživljenja bez povrata bolesti (DFS) i ukupnog preživljenja (OS)

Izvor: Untch M i sur. Three year median follow-up data of the TECHNO trial. San Antonio Breast Cancer Symposium 2010; Abstract P1-11-03.

Provedeno je nekoliko studija neoadjuvantnog liječenja HER2 pozitivnog raka dojke (NOAH, NeoALTTO, NeoSphere) koje su pokazale jasan klinički benefit dodatka trastuzumaba postojećim kemoterapijskim protokolima. Temeljem rezultata NOAH studije Europska agencija za lijekove (EMA) je 2011. godine odobrila trastuzumab u neoadjuvantnom liječenju. Ovakav standard u RH postoji od 2013.godine. Prema rezultatima NOAH studije dodatak trastuzumaba smanjuje rizik povrata bolesti za 36% i rizik smrtnost za 34% uz srčanu toksičnost od 2% (141).

Dualna blokada receptora HER2 kombinacijom kemoterapeutika docetaksela sa dualnim blokatorima HER2 trastuzumabom i pertuzumabom pokazala je još impresivnije rezultate s patološkim kompletnim odgovorom 63,2% kod žena s hormonski nesenzitivnim HER2 pozitivnim rakom dojke (142).

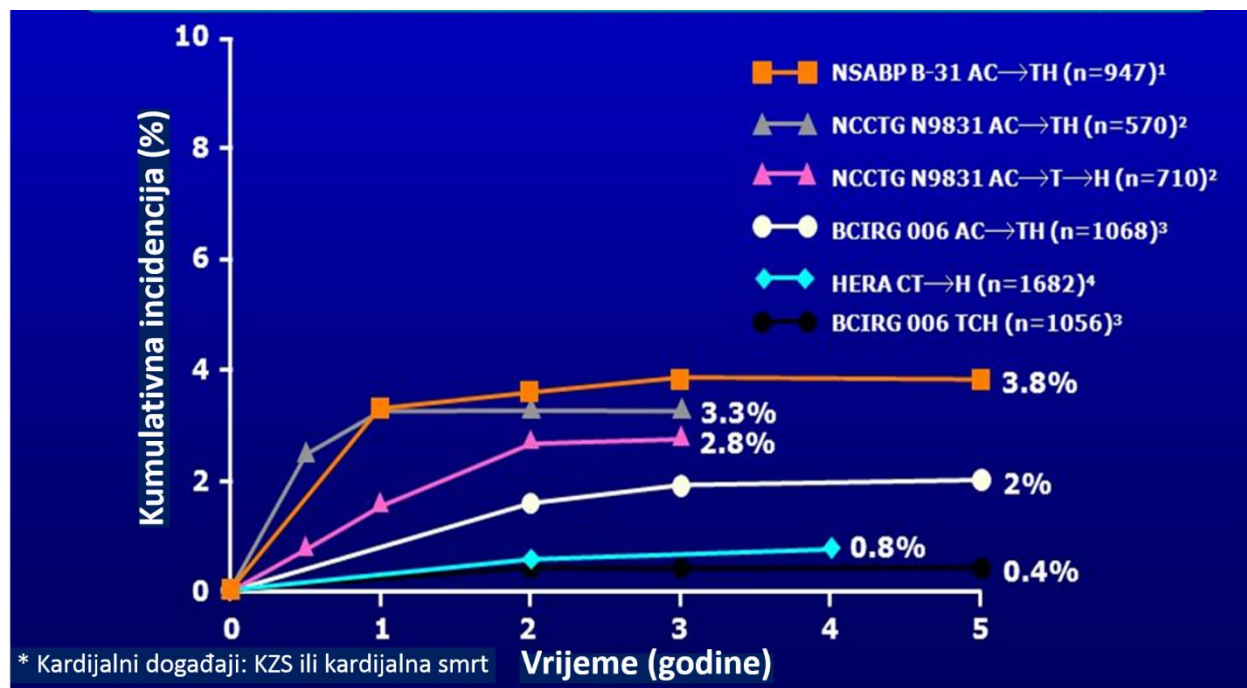
### **2.3.3. Kardijalna toksičnost trastuzumaba**

Imunoterapija trastuzumabom usmjerena na stanice raka povećava antitumorsko djelovanje u odnosu na samu kemoterapiju, a ima i drugačiji toksični profil u odnosu na kemoterapiju.

Ciljana HER2 terapija pokazala je neočekivane kardijalne nuspojave, uključujući disfunkciju lijeve klijetke (LK) s padom istisne frakcije lijeve klijetke (EFLV) i asimptomatskim ili simptomatskim zatajivanjem srca, abnormalnosti u provodnom sustavu uz produženje QT intervala, akutni koronarni sindrom, oštećenja miokarda, arterijsku trombozu i hipertenziju (143). Najčešća nuspojava trastuzumaba je reakcija na infuziju lijeka u vidu prolazne groznice i zimice koja se javlja u 25-30% bolesnika i to prvenstveno samo kod prve aplikacije lijeka. Ostale nuspojave uključuju moguće pogoršanje nekih nuspojava izazvanih kemoterapijom, uključujući gastrointestinalnu toksičnost i mijelosupresiju (59).

Sistolička disfunkcija srca s posljedičnim zatajivanjem srca ipak je najvažnija nuspojava tijekom liječenja trastuzumabom. U fazi III kliničkog ispitivanja, dodatak trastuzumaba antraciklinima je doveo do pojave kardiotoksičnosti u 28% bolesnika liječenih protokolom s istovremenom primjenom antraciklina, ciklofosfamida i trastuzumaba. U studijama adjuvantnog liječenja trastuzumabom, a nakon 5-godišnjeg praćenja pojavnost teškog srčanog zatajivanja bila je 0,4% do 3,8 % (137,144). (Slika 2.24.)

Potpuni ili djelomični oporavak kardijalne funkcije imalo je oko 80% bolesnica (145). U uvjetima izvan kliničkih studija pojavnost disfunkcije lijeve klijetke u bolesnica liječenih trastuzumabom nakon antraciklinske terapije kreće se od 11-28,6% (146,147).



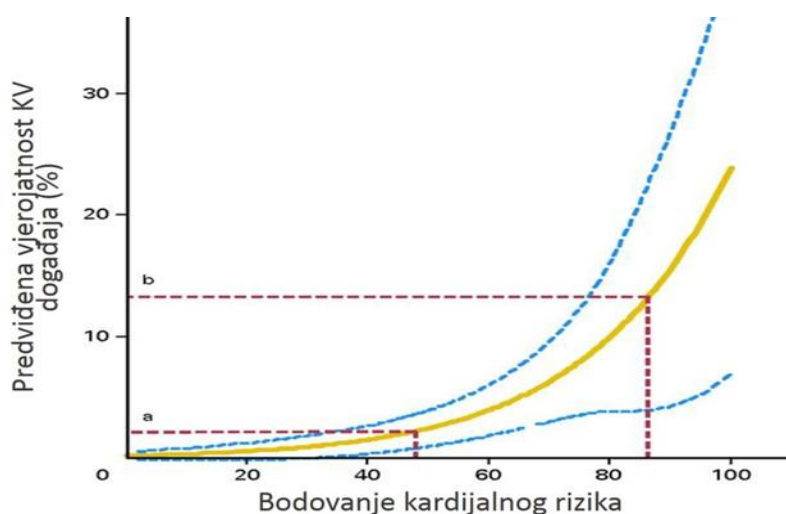
Slika 2.24. Kumulativna pojavnost kardijalnih događaja (KZS- kongestivno zatajivanje srca ili kardijalna smrt) u kliničkim studijama adjuvantne primjene trastuzumaba nakon 5-godišnjeg praćenja

Izvor: Slamon D i sur. (2011) Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast CancerN Engl J 365:1273–1283.

Na osnovu prisutnih faktora rizika za razvoj kardiotoksičnosti kao što su dob i bazična istisna frakcija lijevog ventrikla (EFLV), u NSABP B-31 kliničkoj studiji adjuvantne primjene trastuzumaba, postavljeni su parametri i izračun bodova srčanog rizika (CRS, eng. Cardiac risk score) uz predviđenu vjerojatnost srčanog događaja tijekom 5 godina (148,149). (Slika 2.25.)

$$\text{Rizik za razvoj kardiotoksičnosti (CRS)} = \frac{[7,0 + (0,04 \times \text{dob}) - (0,1 \times \text{bazična LVEF \%})] \times 100}{4,76}$$

4,76



Slika 2.25. Predviđena vjerojatnost kardiovaskularnog (KV) događaja tijekom 5 godina prema izračunatim bodovima srčanog rizika (CRS, eng. Cardiac risk score): žuto- idealna korelacija, plavo-modeli na kojima se temelji korelacija; a- kod CRS od 48,3 rizik za razvoj srčanog događaja je 2%; b- kod CRS od 86,1 rizik za razvoj srčanog događaja je 13% .

Izvor: Edward H. Romond i sur. (2012) Seven-Year Follow-Up Assessment of Cardiac Function in NSABP B-31, a Randomized Trial Comparing Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel (ACP) With ACP Plus Trastuzumab As Adjuvant Therapy for Patients With Node-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology 30, no. 31; 3792-3799.

Kumulativna pojavnost kardijalnih događaja nakon više godina praćenja konzistentno je niska i daje povoljan omjer koristi i rizika. U studiji NCCTG N9831 adjuvantne primjene trastuzumaba, nakon 9,2 godine praćenja ukupna pojavnost kardijalnih događaja bila je 3,4% kod primjene trastuzumaba i kemoterapije u odnosu na samu kemoterapiju gdje je bila 0,6% (150).

### **2.3.3.1. Meta analize kardijalne toksičnosti i benefita primjene trastuzumaba**

Ukupna stopa kardiotoksičnosti, s teškim oblicima srčanog zatajivanja, u studijama adjuvantnog liječenja trastuzumabom kretala se od 0,4% (BCIRG 006) do 3,8% (NSABP B-31). U meta analizi 9117 bolesnica liječenih adjuvantnom terapijom trastuzumabom vidi se da redoslijed primjene trastuzumaba i taksana te antraciklinske kemoterapije povećava rizik od teškog kongestivnog zatajivanja srca funkcionalnog razreda III ili IV (NYHA, eng. New York Heart Associatio Functional Classification) (151). Uvođenje trastuzumaba u terapiju značajno povećava rizik simptomatskog srčanog zatajivanja (4,5%) u odnosu na one bez trastuzumaba (1,8%), a vjerojatnost kardiotoksičnosti je 2,45 puta veća. Ipak, ukupna stopa smrtnosti je bila znatno niža u bolesnica liječenih trastuzumabom (6%), u odnosu na bolesnice koje ga nisu primale (8,5%) kao i stopa metastaziranja (6% : 10,8%).

U drugoj meta analizi na 10.955 bolesnica rizik od simptomatskog klinički teškog (NYHA III ili IV) zatajivanja srca s jednogodišnjom terapijom trastuzumabom u odnosu na one bez trastuzumaba bio je 1,9 naspram 0,3%, dok je rizik od asimptomatskog smanjenja EFLV u bolesnica liječenih trastuzumabom u odnosu na one bez trastuzumaba bio 13,3 naspram 6,1% (59,151). Podaci iz meta-analiza potvrđuju da dodatno jednogodišnje liječenje s trastuzumabom nakon antraciklinske i taksanske adjuvantne kemoterapije ima dokazano povoljni učinak na preživljenje i smanjenje povrata bolesti u bolesnica s HER2 pozitivnim rakom dojke. Ipak, povoljni rezultati u liječenju raka su na štetu značajnog porasta učestalosti simptomatske srčane disfunkcije i asimptomatskog smanjenja istisne frakcije lijeve klijetke (EFLV) (152).

### 2.3.3.2. Čimbenici rizika za razvoj kardiotoksičnosti

Otkriveno je više čimbenika rizika za razvoj trastuzumabom uzrokovane kardiotoksičnosti od kojih je najvažnija istodobna primjena antraciklina s visokom incidencijom srčanog zatajivanja do 28%. Dokazano je da postoji jasan učinak kumulativne doze antraciklina i trastuzumabom inducirane kardiotoksičnosti. S obzirom na navedeno ova kombinacija se ne preporuča u standardnom liječenju (59, 145). Kraće vrijeme nakon završetka antraciklinske terapije i početka aplikacije trastuzumaba predstavlja također čimbenik rizika (59,153).

Porast životne dobi također je važan čimbenik rizika. U adjuvantnim kliničkim studijama dob je najčešće limitirana do  $\leq 65$  godina, a bolesnice su bile bez značajnog kardiovaskularnog komorbiditeta (126,127).

U istraživanju koje je proveo Sawaki i suradnici kod bolesnica s medijanom dobi od 72 godine pojavnost teškog srčanog zatajivanja bila je 7,7% (154).

Serrano i suradnici , kod bolesnica s medijanom dobi 75,9 god. (70-92) liječenih trastuzumabom zbog ranog ili metastatskog raka dojke , izvjestili su pojavnost srčanog zatajivanja kod ranog raka dojke 12,5% i metastatskog 3,8%. Bolesnice s kardiovaskularnim rizikom (arterijska hipertenzija, povijest ranije srčane bolesti, niža bazična istisna frakcija lijevog ventrikla) imale su češće kardijalnu disfunkciju ( 33% vrs 9,1%  $p = 0.017$  ) u odnosu na bolesnice bez rizika. Signifikantni utjecaj imali su šećerna bolest i pušenje (155).

Šećerna bolest, postojeća kardijalna bolest kao i debljina smatraju se čimbenicima rizika dok su podaci za zarčenje lijevog prsiša nekonzistentni. Fizička aktivnost i tjelesna težina su dva glavna nezavisna čimbenika rizika za kardiovaskularne bolesti koji se često zanemaruju u procijeni kardiovaskularnih posljedica adjuvantne terapije raka dojke. U prosjeku, bolesnice s ranim karcinom dojke smanjuju svoju fizičku aktivnost do 2 h na tjedan u usporedbi s vremenom prije postavljanja dijagnoze (59, 156). Nadalje, više od 70% bolesnica s rakom dojke dobije između 2,5 do 6,2 kg na tjelesnoj težini tijekom adjuvantne terapije. Iako su fizička neaktivnost i debljanje jaki nezavisni prediktori kardiovaskularnog mortaliteta, njihov značaj u predviđanju povišenja specifičnog kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta kod bolesnica na terapiji raka dojke treba još istražiti (157).



Proturiječni su rezultati objavljenih istraživanja utjecaja polimorfizma gena *HER-2/neu* [Ile655Val] te će farmakogenomika u bliskoj budućnosti imati važnu ulogu u otkrivanju bolesnika s visokim rizikom za razvoj kardiotoksičnosti (53,56,57).

Osim trastuzumaba, dva dodatna anti-HER2 lijeka su razvijeni i odobreni za liječenje HER2 pozitivnog raka dojke: inhibitor tirozinske kinaze lapatinib je odobren u metastatskom liječenju te pertuzumab monoklonsko protutijelo, umjereno na receptor HER2, u neoadjuvantnom i metastatskom liječenju. Lapatinib (dualni inhibitor ErbB1/ ErbB2, TKIs) aktivira adenozin monofosfat kinazu (AMPK) i štiti od apoptoze, djeluje kardioprotektivno za razliku od inhibicije ErbB2 trastuzumabom. U prospektivnoj analizi liječenja lapatinibom zabiježen je pad EFLV 1,6% od kojih je 0,2% imalo simptome srčanog zatajivanja. Pojavnost srčane disfunkcije je manja nego u općoj populaciji gdje je 3-6% asimptomatskog smanjenja EFLV (158).

O sigurnosti istodobnog zračenja prsnog koša i primjene trastuzumaba dostupni podaci su oskudni i proturiječni.

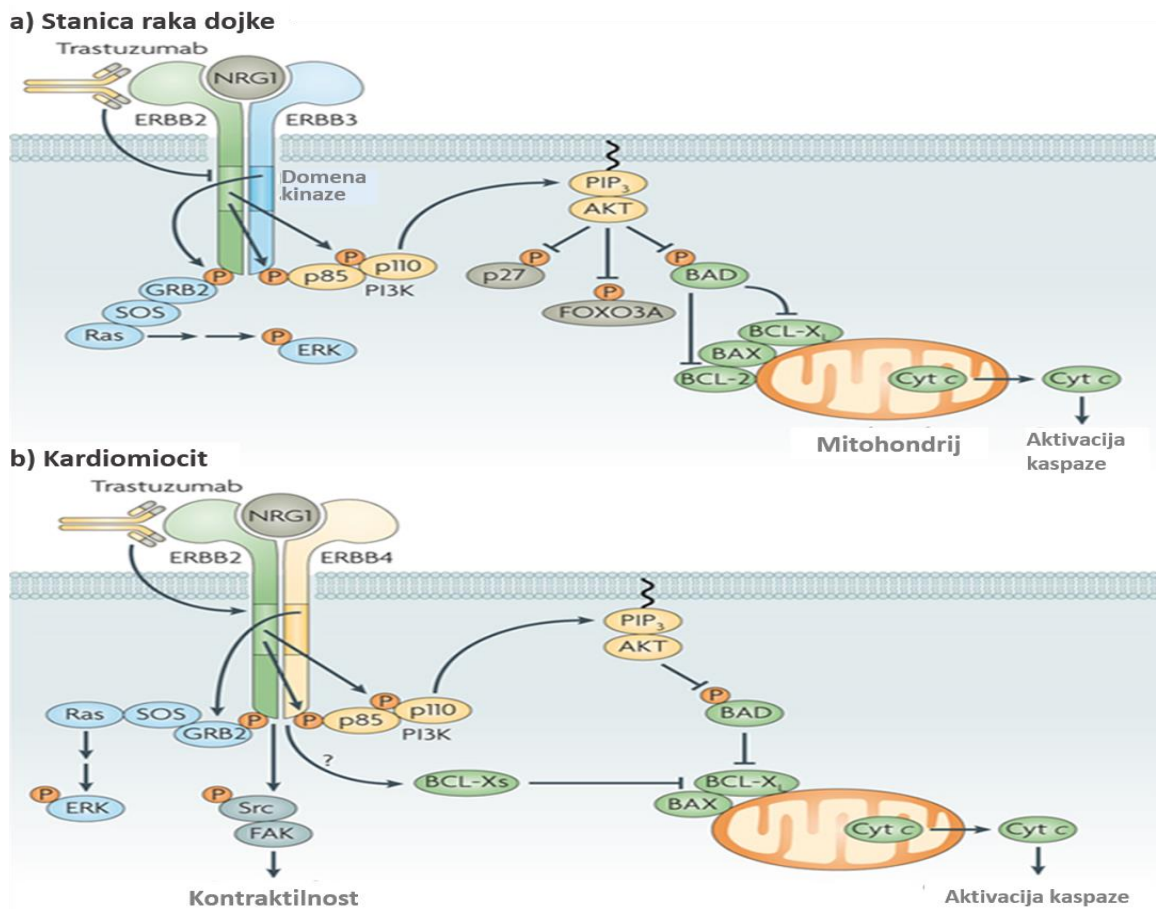
U retrospektivnoj seriji MD Anderson Centra u bolesnica koje su primale trastuzumab značajno je bila veća učestalost srčanih događaja u onih kojima je provedena radioterapija (zračenje) lijevog u odnosu na desnu stranu prsnog koša (26 :7 %). Međutim, u multivarijantnoj analizi, prethodno zračenje se nije pokazalo značajnim čimbenikom rizika za trastuzumabom uzrokovanu kardiotoksičnost (159).

Također, nije bilo dokaza da zračenje povećava učestalost kardiotoksičnost u subanalizi na 1286 bolesnica uključenih u adjuvantnu N9831 studiju (59,160). U toj studiji je tijekom liječenja trastuzumabom, nakon završetka terapije antraciklinom i taksanom, pojava srčanih događaja bila 2,2% za one kojima je prsni koš zračen naspram 2,9% gdje nije provedeno zračenje. U istoj studiji nije uočena razlika u riziku od srčanih događaja ovisno o zračenju desnog ili lijevog prsišta (59, 161).

### **2.3.3.3. Mehanizmi kardiotoksičnosti trastuzumaba**

Razjašnjenje utjecaja trastuzumaba na rad srca otežava činjenica da protutijela prepoznaju specifično samo ljudski protein HER2 i ne mogu se analizirati na životinjskim modelima. Do nuspojava dolazi jer HER signalni putevi koji potiču patološko preživljavanje i abnormalnu proliferaciju stanica raka sudjeluju u regulaciji normalnih stanica, uključujući i kardiomiocite. Inhibiranje tih puteva u stanicama raka može dovesti do inhibicije tih istih kinaza u normalnim kardiomiocitima (59, 162). (Slika 2.26)

U tkivima koja sadrže nisku koncentraciju HER2 učinci nuspojava trastuzumaba će biti zanemarivi, a posebice zato što svojim vezanjem na HER2 inducira dimerizaciju i regulatorno smanjuje broj receptora na površini stanice (163). U srcu su receptori HER2 i HER4 lokalizirani u specifičnim membranskim pretincima T-tubulnog sustava kardiomiocita. Unatoč ukupnom niskom broju HER2 u srcu, njegove povećane lokalne koncentracije bi mogle utjecati na toksičnost trastuzumaba. T-tubulna invaginacija površne membrane uz prosječni promjer od 250 nm formira oblik retikuluma, koji je otvoren za izvanstanične prostore i mogu mu pristupiti makromolekule (59,164). Dilatacija T-tubula je od ranije poznata sekundarna promjena u kardiomiopatijama, a mogla bi olakšati pristup protutijelima na T-tubule u oboljelom srcu. Zanimljivo, takve T-tubularne promjene uočene su i nakon antraciklinskog liječenja (59, 165). Međutim, kardiotoksičnost uzrokovana trastuzumabom neovisna je o dozi i uglavnom je reverzibilna, što upućuje na drugačiji mehanizam od onoga antraciklinskog (166).



Slika 2.26. Usporedba HER2 signalizacije i trastuzumabom uzrokovane inhibicije u stanicama raka dojke i kardiomiocitima. A) U stanicama raka dojke prekomjerna ekspresija HER2, HER2 homodimera ili HER2/HER3 heterodimera, dovodi do pretjerane aktivacije ERK, PI3K/Akt i STAT5 puteva. Trastuzumab u raku dojke: inhibira proliferaciju i preživljenje (Ras-ERK signalni put), inhibira Akt signalni put i bcl2 koji je antagonist apoptoze te aktivira kaspaze što dovodi do stanične smrtnosti. B) u kardiomiocitima izloženost neuregulinu (NRG-1), formira HER2/HER4 heterodimer i aktivira ERK i Akt signalni put. Signalizacija kroz HER2/HER4 dimerizaciju bitna je za proliferaciju, preživljenje i kontraktilnost. Neuregulin (NRG-1) posreduje u dimerizaciji, zaštiti od oksidativnog stresa i apoptoze. Trastuzumab također blokira NRG-1 posredovanu aktivaciju Src i FAK, što čini se pogoršava disfunkciju lijeve klijetke.

Izvor: Trevor T. Hansel, Kropshofer H, Singer T (2010) The safety and side effects of monoclonal antibodies. Nature Reviews Drug Discovery 9, 325-338.

Na temelju istraživanja s genski modificiranim miševima utvrđeno je da je signalizacija HER2 važna za održavanje kontraktilne funkcije i strukture srca. HER2 može biti zaštitni faktor srca izloženog stresu.

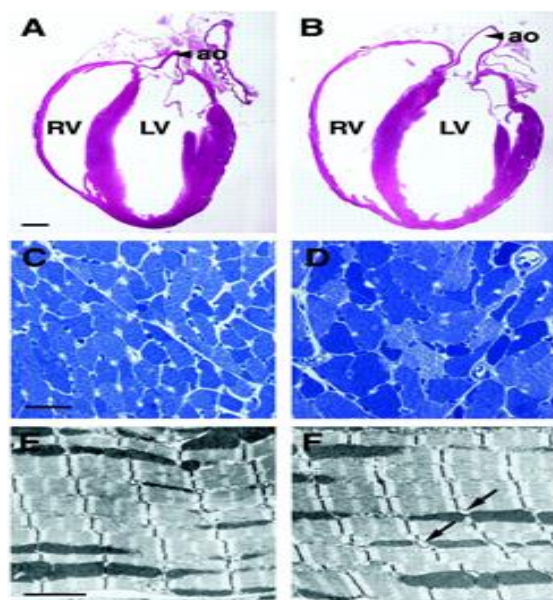
Iako je najvjerojatnije uzrokovana direktnom blokadom HER signalizacijskih puteva u srcu, substancijski mehanizmi odgovorni za trastuzumabom uzrokovanu kardiotoksičnost do sada nisu potpuno razjašnjeni. Osnovna karakteristika je reverzibilnost i u većine bolesnika sa srčanom disfunkcijom koja je uzrokovana trastuzumabom, u roku od nekoliko tjedana ili mjeseci nakon početka liječenja zatajivanja srca doći će do oporavka srčane funkcije.

Utvrđena je povećana osjetljivost miofilamenata na antracikline u prisutnosti protutijela na receptor HER2 (167). Isto tako, neuregulin može umanjiti antraciklinom izazvana strukturna oštećenja srčanih miocita. Mogući drugi dodatni mehanizmi trastuzumabom uzrokovane kardiotoksičnosti su promjene u kontrakcijskim jedinicama i oksidativni stres. Kako se receptori HER2 i HER4 nalaze pretežno u poprečnim tubulima kardiomiocita, oni su u neposrednoj blizini proteina koji sudjeluju u regulaciji kalcija poput sarkolemskih kalcijevih kanala i kanala za puštanje kalcija iz sarkoplazmatskog retikuluma. Na taj način mogu izravno utjecati na homeostazu kalcija u srčanim miocitima. Promjene koncentracije unutarstaničnog kalcija mogu imati više efekata, primjerice aktivirati citosolske proteinaze, mijenjati kontraktilnost miokarda i izazvati smrt miocita (59,167).

Pregled prekliničkih podataka sugerira da je HER/neuregulin osnova za preživljavanje miocita, posebice pri izlaganju srca stresu (168). To djelomično objašnjava relativno nisku toksičnost trastuzumaba kada se koristi u bolesnika koji nisu primali antracikline jer nije došlo do antraciklinima uzrokovanog oksidativnog stresa (167).

Kardiotoksičnost uzrokovana trastuzumabom nije imunološki posredovana i ne proizlazi samo iz modifikacije antraciklinom potaknute srčane toksičnosti. Za razliku od kardiotoksičnosti uzrokovane antraciklinima, toksičnost povezana s trastuzumabom nije povezana s dozom i obično reagira na standardnu medicinsku terapiju ili prekid liječenja trastuzumabom (169). Histopatološkom analizom bioptata endomiokarda bolesnica koje su razvile kardiotoksičnost ovisnu o trastuzumabu nisu nađene tipične antraciklinom uzrokovane ultrastrukturne promjene. U istraživanjima iz MD Anderson Centra analizom su uzoraka endomiokardijalne biopsije, koji su

svjetlosnim mikroskopskom bili potpuno uredni, elektronskim mikroskopom nađene žarišne vakuolske promjene, pleomorfni mitohondriji, hipertrofija stanica miokarda, te blaga intersticijska fibroza. Taj nalaz je u skladu s reverzibilnim uzorkom srčane ozljede (164). Patohistološki trastuzumabom uzrokovana inhibicija može posebno promijeniti mitohondrijski integritet, što dovodi do nedostatka adenozin trifosfata i kontraktilne disfunkcije i bez značajnijih promjena u ultrastrukтури kardiomiocita (59,163). (Slika 2. 27.)



Slika 2.27. Pokazuje dilataciju klijetki i hipertrofiju kardiomiocita u miševa s uvjetnom mutacijom HER2. Histološke analize (A-D) i elektronskomikroskopske analize divljeg tipa (A, C i E) i mutanta HER2 (B, D, and F). Na slikama A i B vidljiva je dilatacija šupljina obje klijetke u miševa s HER2 mutacijom (ao - aorta; RV – desna klijetka, LV – lijeva klijetka). Na slikama C i D vidljiva hipertrofija u uvjetnih mutanata. Slike E i F elektronske mikroskopije normalna struktura kardiomiocita.(strelica). Izvor: Özcelik C, Erdmann B, Pilz B i sur. (2002) Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. PNAS vol. 99 no. 13 8880-8885.

#### **2.3.3.4. Klinički aspekti kardiotoksičnosti uzrokovane trastuzumabom**

Kardiotoksičnost uzrokovana trastuzumabom najčešće se očituje u asimptomatskom smanjenju istisne frakcije lijeve klijetke, a rijede u klinički simptomatskom zatajivanju srca.

Za razliku od antraciklina, s trastuzumabom povezana srčana disfunkcija ne ovisi o kumulativnoj dozi, češće je reverzibilna nakon prekida liječenja i uglavnom se dobro tolerira uz moguće ponovno uvođenje terapije nakon oporavka (170). Te razlike su dovele do toga da se predlože pojmovi "Tip I" i "Tip II" srčane disfunkcije uzrokovane onkološkim liječenjem. Tip I uzrokuju antraciklini koji dovode do apoptoze kardiomiocita i kliničkog zatajivanja srca. Tip II je fenomen povezan s trastuzumabom koji dovodi do gubitka kontraktilnosti (vjerojatno oblik „staninga“ ili hibernacije, a ne smrti miocita) i vjerojatnije je da će biti reverzibilan (59,171).

TANDEM studija faze III ispitivanja trastuzumaba s anastrozolom u metastatskom raku dojke potvrdila je da se zatajivanje srca može naći čak i ako bolesnici nisu primili antracikline. Na taj način potvrđeno je da je kardiotoksičnost uzrokovana trastuzumabom neovisna i različita od one uzrokovane antraciklinima. Srčana disfunkcija javila se u 13 od 103 bolesnice koje su primile trastuzumab i anastrozol naspram 2 od 104 bolesnice liječene samo anastrozolom (172).

Iako uloga HER2 u patofiziologiji zatajivanja srca nije još dobro razjašnjena, razine serumskog HER2 su povećane u bolesnika s kroničnim zatajivanjem srca i obrnuto proporcionalne s funkcijom LV. Svi ti podaci ukazuju na to da je trastuzumabom uzrokovana kardiotoksičnost većim dijelom izravna posljedica HER2 blokade.

Nakon objave rezultata o kardiotoksičnosti uzrokovanoj trastuzumabom u studijama faze III, formiran je neovisan Kardiološki odbor za ocjenu (CREC, eng. Cardiac Review and Evaluation Committee) kako bi se ocijenili neželjeni učinci terapije trastuzumabom (173). Retrospektivno su analizirani podaci 1219 bolesnika uključenih u 7 studija. Cjelovita ocjena kardiotoksičnosti bila je otežana jer su studije varirale u dizajnu u odnosu na broj bolesnika, definicijama kardiotoksičnosti, analizama krajnjih ciljeva te trajanju praćenja.

CREC je koristio četiri kriterija za potvrdu ili revidiranje preliminarne dijagnoze kardiotoksičnosti, a to su: 1) kardiomiopatija karakterizirana padom EFLV, bilo globalno ili uz izraženiju hipokineziju interventrikulskog septuma, 2) simptomi kongestivnog zatajivanja srca (KZS), 3) klinički znakovi povezani s KZS, poput S3 galopa, tahikardije ili oboje i 4) padom u EFLV od najmanje 5% na ispod 55% s pripadajućim znakovima ili simptomima KZS ili padom EFLV od najmanje 10% na ispod 55% bez popratnih znakova ili simptoma. Ukoliko je bio prisutan bilo koji od 4 kriterija potvrdila se dijagnoza kardiotoksičnosti. Pomoću ovih kriterija kardiotoksičnost je utvrđena u 112 bolesnika (9,2%). Stopa srčane disfunkcije pri liječenju trastuzumabom varirala je od 1% do 28% u različitim grupama tih studija i bila je veća kada se trastuzumab davao istovremeno s antraciklinima (59,171). Usprkos nalazima CREC-a značajno poboljšanje liječenja žena s metastatskim rakom dojke dovelo je do toga da se u kasnijim ispitivanjima trastuzumaba uvede odgovarajuće praćenje srčane funkcije. Dizajn studija bio je takav da se na početku mandatorno mjerila EFLV pomoću radionuklidne ventrikulografije ili ehokardiografije, a terapija se nije uvodila u bolesnika s abnormalnom srčanom funkcijom, visokim kumulativnim dozama izloženosti antraciklinima i postojećim težim srčanim bolestima (174).

Udružena analiza randomiziranih kontroliranih studija pokazala je učestalost kardiotoksičnosti od oko 10%, a učestalost kardiotoksičnosti u studijama s kontrolnom skupinom bez trastuzumaba bila je 2% (175). U odvojenoj meta-analizi pet randomiziranih kontroliranih studija, nađeno je značajno povećanje rizika (omjer rizika 1,61  $p < 0,00001$ ) teškog KZS u bolesnika kojima je liječenje trastuzumabom trajalo 1 godinu, što znači da će od 62 liječena bolesnika 1 imati nepovoljan učinak trastuzumaba (59, 176).

Studije s adjuvantnom terapijom su potvrdile da je najčešća manifestacija trastuzumabom uzrokovane kardiotoksičnosti asimptomatski pad u EFLV. U HERA studiji, asimptomatski se pad EFLV javio u 7,1% bolesnika liječenih trastuzumabom, dok je simptomatsko zatajivanje srca nađeno u 0,8% bolesnika (177). Isto tako analize NSABP B-31 i Sjeverno Središnje grupe liječenja raka N9831 studije otkrile su da je 14,2% bolesnika liječenih trastuzumabom prekinulo terapiju zbog asimptomatskog pada EFLV, dok je u samo 3,8% bolesnika terapija prekinuta zbog kliničkog zatajivanja srca (178).

Iako smjernice Američkog društva za zatajivanje srca ne preporučuju rutinsko ispitivanje srčane funkcije neinvazivnim ili invazivnim metodama, učestalost potencijalno reverzibilne kardiotsičnosti inducirane trastuzumabom nalaže ispitivanje funkcije LV u redovitim razmacima. Britansko društvo za ehokardiografiju objavilo je priopćenje u kojem se navodi da funkcija LV mora biti izmjerena prije početka liječenja i u 3-mjesečnim intervalima tijekom liječenja trastuzumabom (179).

Ehokardiografija je idealna metoda za procjenu funkcije LV. Potrebno je obratiti posebnu pažnju na smanjenje subjektivne varijabilnosti promatrača kao i između promatrača tijekom serijskih mjerenja EFLV(180). Preporučeno je korištenje dvodimenzionalne (Simpsonove) procjene ili 3-dimenzionalne ehokardiografije, kontrastne ehokardiografije kao i iskusnih kvalificiranih ehokardiografa.

#### **2.3.3.5. Procjena rizika, rano otkrivanje i praćenje kardiotsičnosti**

Prvi korak za otkrivanje bolesnika s povećanim rizikom za kardiotsičnost sastoji se od pažljive procjene rizika kardiotsičnosti.

Čimbenici rizika mogu biti kardijalni i nekardijalni. Kardijalni su: postojeća srčana bolest s redukcijom EFLV, asimptomatska disfunkcija lijevog ventrikla s EFLV<50% , povišena razina natrijuretskog peptida B (BNP,eng. Brain natriuretic peptide), odnosno vrijednost natrijuretskog peptida >100 pg/mL ili vrijednost N-terminalni pro-BNP >400 pg/ml, koronarna bolest, hipertenzivna bolest srca, hipertenzivna ili dilatativna kardiomiopatija, signifikantne aritmije (fibrilacija atrijske, ventrikulska tahikardija), arterijska hipertenzija. Nekardijalni čimbenici rizika: dob <18 godina i > 50 godina za terapiju trastuzumabom (kod antraciklina je > 65 godina), šećerna bolest, hiperkolesterolemija, obiteljska anamneza kardiovaskularne bolesti u dobi < 50 godina, prethodna terapija antraciklinima, zračenje prsišta ili medijastinuma, pušenje, konzumacija alkohola, debljina, sjedilački način života (181,182).



Potrebna je klinička procjena koja treba uključivati povijest bolesti, temeljiti klinički pregled i mjerenje srčane funkcije. Liječenje trastuzumabom treba započeti samo u bolesnika s normalnom vrijednošću početne EFLV i bez znakova ili simptoma zatajivanja srca. Iako nije apsolutna kontraindikacija za terapiju, potreban je poseban oprez pri liječenju bolesnika s anamnezom hipertenzije, dokumentirane bolesti koronarnih arterija i značajne bolesti srčanih zalistaka.

Srčani biomarkeri (natrijuretski peptidi ili troponini) mogu se smatrati kao dopuna procjene. Testovi koji se koriste moraju biti mjerljivi i usporedivi, to je izuzetno važno za otkrivanje subkliničke srčane abnormalnosti, koji mogu utjecati na kliničke odluke o izboru terapije, indikaciju za kardioprotektivnosti ili povećan nadzor (183).

Procjenu rizika kardiotsičnosti obavlja onkološki tim, a kod bolesnika s visokim rizikom potrebna je procjena kardiologa ili kardioonkološkog tima.

Za otkrivanje kardiotsičnosti potrebne su slikovne metode ( ehokardiografija, magnetska rezonancija srca, nuklearna slikovna metoda MUGA (eng. multigated radionuclide angiography) i biomarkeri (troponin i natrijuretski peptid). Izbor modaliteta ovisi o lokalnoj stručnosti i dostupnosti uz temeljno načelo da se koriste istovjetne i reproducibilne metode tijekom cijelog praćenja (184).

Kod korištenja ehokardiografije (3D bazična EFLV i 2D Simpson EFLV) dijagnostički je kriterij za kardiotsičnost smanjenje EFLV  $\geq 15\%$  od bazične vrijednosti ili smanjenje EFLV  $< 50\%$ .

Kardijalni biomarkeri kao što je visoko senzitivni Troponin I koristi se kod terapije antraciklinima za identifikaciju bolesnika koji mogu imati korist od kardioprotekcije inhibitorima angiotenzin pretvorbenog enzima (ACEi) (184). Rutinska uloga BNP-a i NTpro-BNP još se dodatno istražuju (185,186,187).

Bolesnici koji primaju trastuzumab najčešće su pretodno liječeni antraciklinima, u takvim slučajevima nadzor treba učiniti prije antraciklina. Standard probira tijekom liječenja ovisi o lokalnom protokolu i preporukama, ali pravila nalažu nadzor svaka tri mjeseca tijekom liječenja i jednom nakon završetka liječenja (184).

Trastuzumab treba izbjegavati ili barem pažljivo nadzirati kod EFLV<50%. Aplikacija se treba prekinuti u trajanju od najmanje 4 tjedna, u slučaju kad EFLV opada više od 15% od početne ili više od 10% ispod institucionalno definirane normalne vrijednosti, što je obično 50-55%. Trastuzumab se može ponovno uvesti u terapiju kod oporavka EFLV na normalnu vrijednost. Ukoliko unutar dva mjeseca ne dolazi do adekvatnog oporavka EFLV ili ako se po drugi puta razvila kardiotskičnost tada se trajno prekida liječenje trastuzumabom. Srčana disfunkcija uzrokovana trastuzumabom liječi se po algoritmima liječenja srčanog zatajivanja (188).

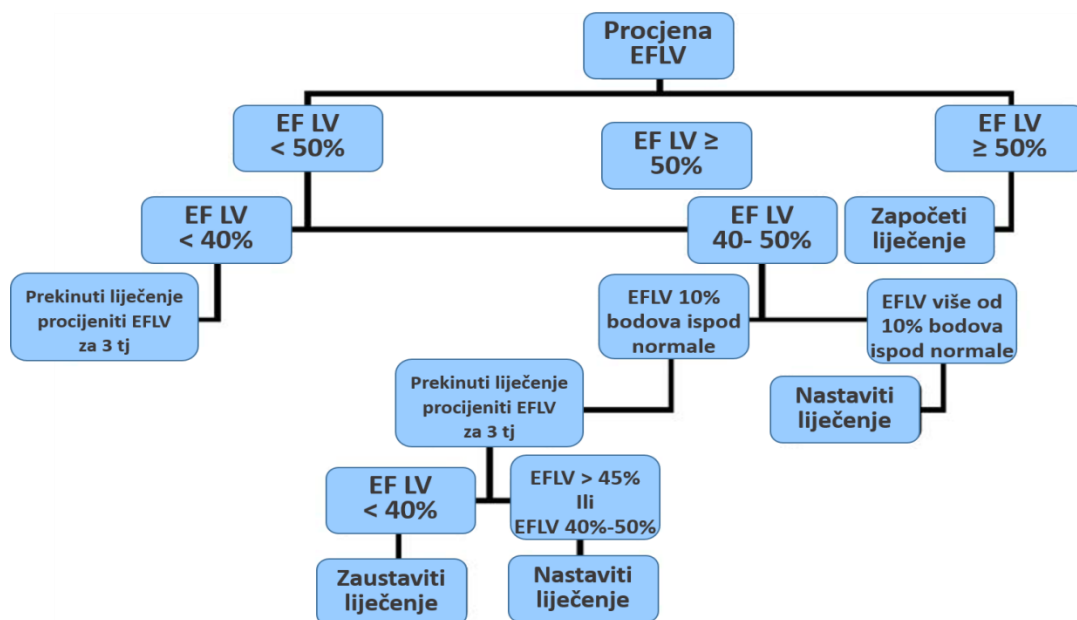
## **2.3.4. Dijagnostički alati za otkrivanje kardiotskičnosti**

### **2.3.4.1. Elektrokardiografija**

Elektrokardiografiju (EKG) potrebno je učiniti u svih bolesnika prije svakog ciklusa terapije trastuzumabom. EKG može otkriti znakove srčane toksičnosti, uključujući promjene srčanog ritma, smetnje provođenja, ST promjene i QT prolongaciju. Međutim, ove EKG abnormalnosti nisu specifične, mogu biti prolazne ali i mogu biti vezane uz kardiotskičnost onkološke terapije (183).

### **2.3.4.2. Ehokardiografija**

Ehokardiografija je metoda izbora za detekcija disfunkcije miokarda prije, tijekom i nakon terapije. Osim mjerenja EFLV prate se druge srčane morfološke i funkcionalne promjene kao i dijastolička funkcija lijeve klijetke. Glavno ograničenje 2-dimenzionalne ehokardiografije je relativno umjerena reproducibilnost što se može poboljšati korištenem 3-dimenzionalne ehokardiografije. Također se preporuča isti promatrač i oprema da se smanji varijabilnost te je potrebno slijediti algoritam praćenja (183,186, 187). (Slika 2.28.)



Slika 2.28. Prikazuje algoritam za praćenje kardiotsičnosti uzrokovane trastuzumabom

Izvor: Curigliano G, Cardinale D, Suter T (2012) Cardiovascular toxicity induced by chemotherapy, targeted agents and radiotherapy: ESMO Clinical Practice GuidelinesAnnals of Oncology 23(suppl 7):vii155-vii166.

#### **2.3.4.3. Srčani biomarkeri**

Upotreba srčanih biomarkera u potencijalno kardiotsičnim terapijama može otkriti ranu srčanu ozljedu. Trenutno ne postoji jasan dokaz o prekidu onkološke terapije temeljeno samo na vrijednosti biomarkera. Kod bolesnika koji imaju kontinuirani porast troponina mogu imati korist od liječenja ACE inhibitorima (184). U bolesnika liječenih trastuzumabom, osobito nakon prethodne izloženosti antraciklinima, vrijednost porasta troponina I može identificirati bolesnike koji će razviti srčanu disfunkciju i koji neće imati oporavak srčane disfunkcije unatoč liječenju. Upotreba visoko senzitivnog troponina I pruža najveću osjetljivost (93%) uz negativnu prediktivnu vrijednost (91%) za predvidjeti kardiotsičnost (59,183,185). Uloga srčanih biomarkera za otkrivanje kardiotsičnosti ciljanje anti HER2 terapije uključujući trastuzumab, je još uvijek nejasna.

Korištenje natrijuretskih peptida (BNP i NT-proBNP) može biti korisno ali nije etablirano u rutinskom nadzoru (185). Buduća istraživanja trebaju odrediti potrebu i optimalan vremenski redoslijed mjerenja.

### 2.3.5. Mogući utjecaj na smanjenje kardiotoksičnosti trastuzumaba

U studijama metastatskog HER2 pozitivnog raka dojke utvrđena je reverzibilnost trastuzumabom uzrokovane kardiotoksičnosti. Subanaliza reverzibilnosti kardiotoksičnosti učinjena je u studiji adjuvantnog liječenja NSABP B-31 na 33 bolesnice sa simptomatskim zatajivanjem srca i najmanje šest mjesečnim praćenjem; kod njih 12 (36%) je EFLV ostala trajno smanjena na  $\leq 50\%$ , u 5 bolesnica (15%) su zaostali simptomi KZS, a njih 20 (61%) je trebalo kardijalnu terapiju kroz šest mjeseci (187,188,189).

Nakon višegodišnjeg praćenja na više od 13 000 bolesnica adjuvatno liječenih trastuzumabom utvrđena je reverzibilnost u 86% trastuzumabom uzrokovane kardiotoksičnosti (145). Postoje dva pristupa za smanjivanje kardiotoksičnosti uzrokovane adjuvantnom terapijom trastuzumabom koja su korištena u kliničkim studijama.

U većini studija adjuvantno liječenje trastuzumabom provodilo se kroz 12 mjeseci. Smanjenje trajanja izloženosti trastuzumabom ispitivano je u FinHer studiji, u kojoj je trastuzumab primjenjivan 9 tjedana istovremeno s kemoterapijom (docetaksel ili vinorelbin), a nakon toga su uslijedila tri ciklusa antraciklina epirubicina. Nije nađen niti jedan slučaj kardiotoksičnosti kod 116 bolesnica koje su primale trastuzumab (189,190). Zbog malog broja uključenih bolesnica kao i inferiornijih rezultata efikasnosti u odnosu na veće kliničke studije, ovaj pristup ne predstavlja standard liječenja.

Uvođenje trastuzumaba u protokole s neantraciklinskom adjuvantnom kemoterapijom (docetaksel plus karboplatina) praćeno je u BCIRG 006 studiji, u kojoj se u jednoj od tri grane koristi neantraciklinska adjuvantna kemoterapija. Nakon 5-godišnjeg praćenja nađena je redukcija rizika smrtnosti za 37% u bolesnica koje su primale trastuzumab u odnosu na samu kemoterapiju. Kumulativna pojavnost kardijalne toksičnosti nakon 5-godišnjeg praćenja iznosila je 0,4% (137). Ovaj protokol primjenjuje se kod bolesnica sa značajnim rizikom za razvoj kardiotoksičnosti.

### 2.3.6. Nadzor i liječenje trastuzumabom uzrokovane kardiotoksičnosti

Prednosti liječenja trastuzumabom potrebno je pažljivo odvagati s rizicima od razvoja težeg oblika zatajivanja srca. EFLV-a treba procijeniti na početku citotoksične kemoterapije, po završetku kemoterapije (tj. prije početka trastuzumaba), te nakon tri, šest, devet i dvanaest mjeseci od uključanja trastuzumaba. Po završetku ranije antraciklinske kemoterapije, terapija s trastuzumabom se može započeti samo ako su ispunjeni kriteriji da bolesnica nema anamnezu zatajivanja srca ili srčane bolesti, te ukoliko tijekom početne kemoterapije nije imala kardijalnih simptoma (183).

Ostaje kontroverzno može li se trastuzumab započeti u bolesnica koje poslije antraciklinske terapije imaju EFLV ispod donje granice normale tj 50-55%. Podaci iz B-31 sugeriraju veću stopu kardiotoksičnosti u tih bolesnica, što međutim, nije potvrđeno u N9831 studiji (127).

Tijekom terapije trastuzumabom liječenje treba prekinuti ako EFLV padne više od 15 % u odnosu na početnu vrijednost ili >10% od normalne vrijednosti EFLV= 50%. Ponovno mjerenje EFLV potrebno je za 3 tjedna i u slučaju da je vrijednost veća od 50% može se nastaviti liječenje trastuzumabom, a u slučaju EFLV<44% ne nastavlja se liječenje. U slučaju vrijednosti EFLV 45-49% nastavak liječenja ovisan je o padu u odnosu na početnu vrijednost. U slučaju da je pad veći od 10% od početne izmjerene vrijednosti EFLV ne nastavlja se liječenje trastuzumabom (191).

Ako se pri ponovnoj procijeni EFLV nakon osam tjedna ne uoči poboljšanje, adjuvantnu terapiju trastuzumabom potrebno je trajno prekinuti. Također, kod bolesnica sa simptomima srčanog zatajivanja potrebno je prekinuti terapiju trastuzumabom (170,183). Još uvijek nije poznato kako liječenje čimbenika rizika kardiovaskularnih bolesti utječe na učestalost kardiovaskularne bolesti u žena s rakom dojke. U studiji su Cardinale i suradnici randomizirali bolesnice koje su imale porast troponina I ubrzo nakon kemoterapije te je jedna grupa primala ACE inhibitor (enalapril) dok je druga grupa liječena bez ACE inhibitora. Rezultati su pokazali značajno očuvanje funkcije LV u bolesnica liječenih enalaprilom (192). U retrospektivnoj studiji je nađeno da liječenje najvećom tolerabilnom dozom ACE inhibitora i  $\beta$ -blokatora omogućuje ponovo uvođenje terapije trastuzumabom u bolesnica s rakom dojke i ranijim kardiotoksičnim efektom trastuzumaba (193).

### 2.3.7. Medikamentozna prevencija kardiotsičnosti trastuzumaba

Trenutno postoji nekoliko farmaceutskih mogućnosti za liječenje i prevenciju srčanog zatajivanja, uključujući inhibitore angiotenzin pretvorbenog enzima (ACEi), blokatore receptora za angiotenzin (ARB) i blokatore  $\beta$ -adrenergičkih receptora. Nekoliko studija ispitivalo je korištenje ovih lijekova kao prevenciju disfunkcije lijeve klijetke i zatajivanja srca u kontekstu antraciklinskog tretmana, s velikim uspjehom (194). Međutim, razlike u mehanizmima nastanka antraciklinske i trastuzumabom uzrokovane kardiotsičnosti ukazuju na to da strategije za prevenciju antraciklinske kardiotsičnosti treba vrednovati odvojeno od prevencije trastuzumabom uzrokovane kardiotsičnosti (194).

Prevenciju trastuzumabom uzrokovane kardiotsičnosti retrospektivno su ispitivali Seicean i suradnici na 920 bolesnica s ranim stadijem raka dojke koje su primale adjuvantno antracikline i u nastavku trastuzumab (195). Bolesnice koje su primale kontinuirano bisoprolol, blokator  $\beta$ -adrenergičkih receptora (n=106) uspoređivane su s bolesnicama koje nisu liječene  $\beta$ -blokatorom. Peterostruko smanjenje pojavnosti srčanog zatajivanja zabilježeno je u bolesnica liječenih  $\beta$ -blokatorom, pružajući preliminarni dokazi da  $\beta$ -blokatori mogu biti korisni kao profilaksa kako bi se spriječila trastuzumabom uzrokovana kardiotsičnost (194,195).

Kombinacija  $\beta$ -blokatora metoprolola i blokatora receptora za angiotenzin candesartana kao moguća prevencija trastuzumabom uzrokovane kardiotsičnosti ispitivana je kod 130 žena s ranim rakom dojke liječenih trastuzumabom u PRADA studiji (196). Blokator receptora za angiotenzin (ARB) prevenira razvoj srčane disfunkcije dok to isto nije potvrđeno za metoprolol (197,198,199).

Potpuno oprečne rezultate za profilaktičku primjenu cansartana navodi Boekhout i sur. (2016.) analizirajući 206 žena koje su profilaktički primale ACE inhibitor cansartan. Dvogodišnja kumulativna pojavnost srčanih događaja u grupi sa cansartanom bila je 0,28 dok je u placebo grupi bila 0,16. Nije zabilježen utjecaj na NT-pro BNP kao ni troponin te nije potvrđena hipoteza da cansartan prevenira trastuzumabom uzrokovanu srčanu disfunkciju (200).

Povoljan učinjak primjene blokatora  $\beta$ -adrenergičkih receptora i prevencije trastuzumabom uzrokovane kardiotoksičnosti pokazala je multicentrična, placebo kontrolirana MANTICORE studija. Studija je imala tri grupe: u jednoj su bolesnici primali placebo, u drugoj blokator  $\beta$ -adrenergičkih receptora bisoprolol i treća grupa s primjenom ACE inhibitora perindopril. Bisoprolol je značajno spriječio pad EFLV u odnosu na placebo ( $p=0,001$ ). Zabilježen je pad EFLV od 5% u grupi s placebo, s perindoprilom 3%, dok je u grupi s bisoprololom bio 1%. Međutim studija nije pokazala prevenciju remodelacije lijevog ventrikla (201,202).



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorak

U ispitivanje je uključeno 177 ispitanica s HER2 pozitivnim ranim rakom dojke koje su adjuvantno liječene trastuzumabom u periodu 2007. - 2016. godine, u Klinici za tumore i Klinici za nuklearnu medicinu i onkologiju KBC "Sestre milosrdnice", Zagreb.

Svim ispitanicama je nakon provedenog kirurškog liječenja nastavljeno adjuvantno liječenje trastuzumabom s planiranim trajanjem 1 godine, odnosno 17 aplikacija, u trotjednim intervalima. Po međunarodnim smjericama, liječenje trastuzumabom je indicirano kod bolesnica s HER2 pozitivnim (IHC ili ISH) rakom dojke.

Nakon operacije bolesnice su prvo liječene kemoterapijskim protokolima baziranim na antraciklinima (doksorubicin, epirubicin) sa ili bez taksana (paklitaksel), a neke bolesnice ovisno o prisutnom povećanom kardiovaskularnom riziku primile su neantraciklinske protokole (CMF- ciklofosamid+ metotreksat+ fluorouracil; paklitaksel + trastuzumab; TCH-docetaksel + karboplatin + trastuzumab; endokrina terapija+trastuzumab). U slučaju indiciranosti zračenja, ono se provodilo nakon završenog kemoterapijskog liječenja, istovremeno s primjenom trastuzumaba. Trastuzumab je primjenjivan u kratkotrajnoj intravenoznoj infuziji ili potkožno.

Za dokaz HER2 pozitiviteta analiziran je uzorak tumorskog tkiva dojke IHC (Hercep Testom). U slučaju da je nalaz označen kao 3+ smatra se pozitivnim, a ukoliko je Hercep Testom procijena bila 2+, u skladu s postojećim smjericama, test je ponovljen metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH). Ukoliko je nalaz IHC ili FISH bio pozitivan, a ovisno o kliničkom i kardijalnom status, započeto je liječenje trastuzumabom.

Rani rak dojke definiran je kao maligni tumor koji je ograničen na dojk u i limfne čvorove pazušne jame, a bez prisustva udaljenih metastaza. Bolesnice s metastatskom bolesti nisu uključene u ispitivanje iz razloga što su do primjene imunoterapije trastuzumabom najčešće primile više linija kemoterapeutika s potencijalnim kardiotoksičnim djelovanjem.

Osim toga, parametri za prekidanje terapije trastuzumabom pri pojavi kardiotoksičnosti kod metastatske bolesti dojke nisu jasno definirani. Smjernice preporučuju da se o prekidu, odnosno nastavku terapije odlučuje individualno ovisno o procjeni rizika i težine maligne bolesti kao i stupnju oštećenja miokarda.

S ispitanicama, koje su odgovarale kriterijima istraživanja, proveden je razgovor i objašnjen cilj istraživanja. Ukoliko su pristale, pozvane su na ispitivanje koje se sastojalo od kontrolne ehokardiografije te uzimanja uzorka krvi za genotipizaciju *HER-2/neu* i određivanje koncentracije natrijuretskog peptida (NT-proBNP-a). Sve ispitanice su prije uključivanja u istraživanje potpisale informirani pismeni pristanak.

Ispitanice su podijeljene u dvije grupe; prva (grupa A) imala je 99 ispitanica u kojih imunoterapija trastuzumabom nije izazvala kardiotoksični učinak, a u drugoj, kontrolnoj skupini (grupa B) 78 ispitanica kod kojih je došlo do razvoja kardiotoksičnosti.

Nakon razgovora sa svakom ispitanicom te uvidom u medicinsku dokumentaciju prikupljeni su anamnestički podaci s posebnim osvrtom na moguće čimbenike rizika za razvoj trastuzumabom uzrokovane kardiotoksičnosti, a to su:

1. Primjenjena kemoterapija - analizirani su raniji kemoterapijski protokoli, broj apliciranih ciklusa te prisustvo kardijalnih simptoma tijekom kemoterapijskog liječenja
2. Prethodno zračenje prsišta - kao posebni rizični čimbenik analizirano je zračenje lijeve strane prsišta odnosno direktna izloženost srca polju zračenja
3. Postojeća ili ranija srčana bolest - da li je bolesnica preboljela infarkt miokarda ili drugu srčanu bolest ili ima tegobe koje mogu upućivati na srčanu bolest
4. Arterijska hipertenzija- ukoliko je prisutna trajanje hipertenzije te antihipertenzivna terapija
5. Poremećaj metabolizma masti (dislipidemija), bilo da se radi o hiperkolesterolemiji ili hipertrigliceridemiji
6. Šećerna bolest
7. Obiteljsko opterećenje kardiovaskularnim bolestima

Svim ispitanicama je nakon ispunjavanja upitnika učinjen klinički pregled koji je pored određivanja fizikalnog statusa uključivao i mjerenje arterijskog tlaka živinim tlakomjerom s nadlaktičnom narukvicom.

### **3.2. Procjena kardiotsičnosti**

Za procjenu kardiotsičnosti korištena je transtorakalna ehokardiografija (TTE) koja danas predstavlja zlatni standard za procjenu morfologije i funkcije srca. Ehokardiografski je procijenjena veličina srčanih šupljina, sistolička i dijastolička funkcija lijeve klijetke (LV), debljina stijenke LV, morfologija i hemodinamika valvulnog aparata, plućna hipertenzija, veličina i funkcija desne klijetke te morfologija perikarda. Svim bolesnicama je prilikom određivanja genotipa *HER-2/neu* i koncentracije Nt-proBNP-a, nakon završenog liječenja trastuzumabom, učinjena kontrolna ehokardiografija. Pregled je učinjen na aparatima Acuson Sequa ili Siemens Sonoline 007.

Iz medicinske dokumentacije prikupljeni su podaci svih ranijih ehokardiografija, učinjenih prije i tijekom terapije trastuzumabom.

Prema smjernicama se ehokardiografija trebala učiniti svim bolesnicama koje su primale trastuzumab prije početka terapije, u tromjesečnim intervalima tijekom terapije te pri pojavi simptoma ili znakova srčanog zatajivanja. Kardiotsičnost koja se prvenstveno očituje oštećenjem sistoličke funkcije lijeve klijetke je definirana padom istisne frakcije (EFLV) za više od 15% od početne vrijednosti EFLV ili za 10% ispod donje granice normale (EFLV= 50%).

Sistolička funkcija LV procjenjuje se ehokardiografski mjerenjem istisne frakcije metodom po Teichholzu. Tom metodom se nakon prikaza LV u jednodimenzijском M-modu iz parasternalne duge osi mjerenjem kaviteta u dijastoli i sistoli računski dobije EF. Ukoliko je nalaz EF procijenjen ovom metodom bio graničan ili dvojbен, istisna frakcija tada je procijenjena pomoću dvodimenzijske metode po Simsonu. Tom se metodom iz apikalne projekcije prikazom iz 4C i 2C ocrta endokard LV u dijastoli i sistoli.

Budući da je stvarna EF omjer volumena LV na kraju sistole (SV) i volumena na kraju dijastole (EDV) ( $EF(\%) = (SV/EDV) \times 100\%$ ) jednodimenzijско pojednostavljeno trodimenzijско prikaza u Teichholzovoj metodi ponekad može biti nedostatno.

Simpsonovom se metodom volumen klijetke računa po formuli  $V = (A1 + A2)h + A3h/2 + \pi h^3/6$  gdje je L duljina LV, A1 mitralna area dobivena iz kratke parasternalne osi, A2- area na razini papilarnih mišića, a A3 area apeksa također je određena iz kratke parasternalne osi. Stoga se na taj način uzima u obzir elipsoidni oblik presjeka lijeve klijetke, odnosno procjena volumena u dijastoli i sistoli koja je točnija, posebice ako postoje lokalni poremećaji kontraktiliteta.

Dijastolička funkcija LV procijenjena je putem pulsnoг doplera transmitalnog dijastoličkog protoka. Određivanjem visine i oblika A i E vala na krivulji transmitalnog dijastoličkog protoka, dijastolička disfunkcija se može graduirati od 0 do 4. U normalnom protoku E val je viši i njegova površina je dvostruko veća od A vala. Promjene punjenja lijevog ventrikla i atrijski doprinos punjenju može se poremetiti uslijed hipertrofije lijeve klijetke ili propadanja miocita što rezultira promjenama u dijastoličkom punjenju od pseudonormalizacije do restrikcije.

Pri svakoj pojavi kardiotsičnosti kod koje je bilo potrebno prekinuti terapiju trastuzumabom rađene su kontrolne ehokardiografije kojima je procjenjivana reverzibilnost procesa. Kontrolna ehokardiografija je u pravilu učinjena 3 do 5 tjedana od prethodne te se procjenila reverzibilnost i mogućnost nastavka liječenja trastuzumabom. Ukoliko je došlo do poboljšanja istisne frakcije do normalnih vrijednosti ( $EFLV=50\%$ ) određeno je da se radi o potpuno reverzibilnoj kardiotsičnosti, a ako je došlo do poboljšanja istisne frakcije za više od 10 postotnih bodova, dok je ona i dalje bila ispod donje granice normale, procijenjeno je da se radi o djelomičnoj reverzibilnosti.

### 3.3. Određivanje genotipa *HER-2/neu*

Standardnim postupkom venepunkcije svim ispitanicama je uzet uzorak krvi za određivanje genotipa *HER-2/neu*.

Iz uzorka od 6 ml pune krvi s EDTA izolirana je leukocitna deoksiribonukleinska kiselina i genomska (DNA) pomoću komercijalno dostupnog kita za izolaciju High Pure PCR Template Kit Roche (Roche diagnostics, Mannheim Germany) prema uputi proizvođača.

Uzorak pune krvi inkubira se s proteinazom K i puferom za lizu pri čemu dolazi do denaturacije proteina i lize membrana stanica. Denaturirani proteini i produkti razgradnje stanica se odbace, a supernatant koji sadrži nukleinske kiseline propušta se kroz kolone iz test paketa. Kolone sadrže polupropusnu membranu na kojoj se zadržavaju nukleinske kiseline, dok ostali stanični sadržaj prelazi u eluat koji se odbacuje. Vezane nukleinske kiseline ispiru se dvaput pomoću pufera za ispiranje. U posljednjem koraku, DNA vezana za membranu kolone eluira se pomoću pufera za eluaciju u sterilnu epruvetu. Izolirana DNA čuva se na +4°C do izrade analize. Koncentracija dobivene DNA je oko 50 ng/μL.

Genotip *HER-2/neu* je određen metodom lančane reakcije polimeraze (PCR, eng. Polymerase chain reaction ) u stvarnom vremenu analizom krivulje taljenja.

PCR reakcija je izvedena na LightCycler 480 analizatoru (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) koristeći komercijalno dostupan reagens LightCycler DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) te smjesu početnica i proba LightSNiP rs1136201 ERBB2 (HER2) (Tib Molbiol, Berlin, Germany).

Reakcijska smjesa od 10 μl sadrži 2.5 μl DNA, 5.2 μl H<sub>2</sub>O, 0.5 μl smjese početnica i fluorescento obilježenih proba, 1.0 μl FastStart DNA Master reagens (dNTP, Mg<sup>2+</sup>, Taq polimeraza, pufer) te 0.8 μl MgCl<sub>2</sub>. PCR program se izvodi prema protokolu navedenom u Tablici 4.1.

Tablica 4.1. Uvjeti PCR reakcije u stvarnom vremenu za *HER-2/neu*

|                           | Denaturacija | Umnažanje |       |       | Taljenje |       |       | Hlađenje |
|---------------------------|--------------|-----------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|
| <b>Broj ciklusa</b>       | 1            | 45        |       |       | 1        |       |       | 1        |
| <b>Temperatura (°C)</b>   | 95           | 95        | 60    | 72    | 95       | 40    | 75    | 40       |
| <b>Vrijeme (mm:ss)</b>    | 10:00        | 00:10     | 00:10 | 00:15 | 00:30    | 02:00 | 00:00 | 00:30    |
| <b>Akvizicija (po °C)</b> | /            | /         | /     | /     | /        | /     | 3     | /        |

#### Nečelo metode:

Detekcija genotipa zasniva se na određivanju krivulje taljenja (engl. melting curve analysis). Fluorescentno obilježene hibridizacijske probe su dizajnom komplementarne uzorku divljeg tipa. Temperatura taljenja ovisi o stupnju homologije između probi i DNA uzorka – na nižoj temperaturi će se rastaliti uzorak kod kojeg probe nisu savršeno komplementarne. Pri temperaturi nižoj od temperature taljenja ( $T_m$ ), hibridizacijska proba vezana je za komplementaran slijed DNA pri čemu se javlja fluorescencija. Povišenjem temperature, proba se odvaja te se gubi fluorescencija. Računalni program prevodi signal u krivulju s maksimumom na temperaturi taljenja na osnovi čega se očitava genotip.

Određeni su genotipovi: A/A (Ile/Ile), A/G (Ile/Val), G/G (Val/Val)

### 3.4. Određivanje NT-proBNP-a

Svim se ispitanicima nakon završetka adjuvantnog liječenja trastuzumabom odredila razina N terminalnog dijela molekule B-natrijuretskog propeptida (NT-proBNP) koji se koristi kao biljeg srčanog zatajivanja i čija je razina u serumu povezana s kliničkim stadijem srčanog zatajivanja i prognozom bolesti.

Koncentracija NT-proBNP određivana je u uzorcima seruma. Krv je uzimana venepunkcijom u standardnu epruvetu s crvenim čepom (Vacuette® s aktivatorom polietilen-tereftalat-glikolom, Greiner Bio-One, Austrija), a po završenoj koagulaciji (nakon 20 min) separiran je serum od krvnih stanica centrifugiranjem na brzini 3500 okretaja/minuti. Uzorci seruma odmah su pohranjeni na -20 oC do dana analitičkog postupka.

Za određivanje koncentracije NT-proBNP-a korištena je imunokemijska metoda s originalnim reagensima tvrtke Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka. Svi analitički postupci za navedene analize provedeni su elektrokemiluminescentnom tehnologijom (ECL) na automatskom analizatoru Cobas e 411 (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) čija tehnologija osigurava iznimnu kvalitetu – visoku osjetljivost za analite niskih koncentracija kao i detekciju ekstremno malih promjena u koncentraciji analita. Uz to ima i široko mjerno područje.

Za ECL metode koristi se rutenij-kelat kome je svojstvena luminiscencija, a oblik estera lako se veže s amino skupinama proteina, haptena i nukleinskih kiselina. To omogućava detekciju mnoštva analita.

Dvije elektrokemijski aktivne supstance, rutenij-kompleks i tripropilamin (TPA), uključene su u reakciju koja završava emisijom svjetla. Obje supstance stabilne su toliko dugo dok nema dotoka električne energije. ECL reakcija rutenij tris(bipiridil) $2^{+}$  i triprolidina događa se na površini platinaste elektrode. Električna energija stvara električno polje, što uzrokuje reakciju. Tripropilamin se oksidira, otpušta elektron i formira tripropilamino radikal, koji zatim otpušta proton ( $H^{\bullet}$ ) i nastaje TPA radikal ( $TPA^{\bullet}$ ). Rutenij-kompleks također otpušta elektron na površinu elektrode, oksidira se i nastaje  $Ru(bpy)_3^{3+}$  ion. Nastali rutenijum-ion komponenta je za sekundarnu reakciju s TPA radikalom.

TPA• i Ru(byp)33+ međusobno reagiraju, te se Ru(byp)33+ reducira u Ru(byp)32+ i prelazi u ekscitirano stanje. Ru(byp)32+ je nestabilan, raspada se, emitira foton na 620 nm i prelazi u osnovno stanje. Reakcijski ciklus se ponavlja. TPA• se reducira, što ne utječe na kemiluminescentni proces. Tijekom mjerenja TPA se potroši, a rutenij u osnovnom stanju konstantno se regenerira.

Tri osnovna koraka u analitičkom procesu:

- Separacija

Streptavidinske mikročestice, koje su vezane s antigen-protutijelo kompleksom, vezane su na elektrodu. Sistemskim puferom ispiru se mikročestice s elektrode, od suviška reagensa i uzorka iz mjerne jedinice.

- ECL reakcija

Magnetska se sila premješta na elektrodu na kojoj se nalaze mikročestice, vezane s antigen-protutijelo kompleksom, da bi inicirale ECL reakciju. Emisija svjetla mjeri se luminometrom, a sustav signale pretvara u proporcionalno ovisne mjerne jedinice.

- Otpuštanje mikročestica i čišćenje mjerne jedinice

Kada je mjerenje završeno paramagnetske mikročestice ispiru se s površine elektrode posebnom otopinom te se površina mjerne jedinice regenerira mijenjanjem potencijala na elektrodi. Potom je spremna za sljedeće mjerenje.

### **Načelo metode:**

Sendvič nekompetitivna imunokemijska tehnika s dva monoklonska protutijela temeljena na elektrokemiluminiscentnoj tehnologiji. NT-proBNP iz uzorka inkubira se s biotiniliranim protutijelom (na streptavidinskim česticama) na epitop 1–21 aminokiselina te s rutenijem obilježenim protutijelom na epitop 39–50 aminokiselina u slijedu humanog NT-proBNP (1–76). Formira se sendvič kompleks dvaju monoklonskih protutijela i NT-proBNP iz uzorka.



U mjernoj kiveti mikročestice prionu magnetskom silom na površinu elektrode, nevezane supstance ispiru se ProCell otopinom, a uključenje napona na elektrodi inducira kemiluminiscencijsku emisiju koja se mjeri na fotomultiplikatoru. Nastala kemiluminiscencija proporcionalna je koncentraciji analita NT-proBNP te se preračunava u koncentracijske jedinice prema specifičnoj kalibraciji u 2 točke i glavnoj kalibracijskoj krivulji pridruženoj reagensu kao crtični zapis.

### **3.5. Statistika**

Inicijalno je učinjena opisna statistika. Distribucija podataka analizirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom.

Budući da je većina varijabli pratila normalnu distribuciju, kontinuirane varijable izražene su srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom. Kontinuirane varijable koje su pratile normalnu distribuciju uspoređene su jednostrukom analizom varijance (eng. one-way ANOVA), a one koje nisu pratile normalnu distribuciju su uspoređene Kruskal-Wallisovim testom.

Zavisne kontinuirane varijable su analizirane analizom varijance za ponavljana mjerenja (eng. RM ANOVA), koja je i korištena u analizi utjecaja ometajućih čimbenika.

Kategoričke varijable su uspoređene Hi-kvadrat testom uz Yatesovu korekciju. Analiza povezanosti pojedinih parametara učinjena je Spearmanovom korelacijom, univarijatnom binarnom i multinominalnom logističkom regresijom, ovisno o tipu kategoričke varijable. Krivulje vremena do razvoja kardiotoksičnosti su kreirane Kaplan – Meierovom metodom, a razlike između pojedinih skupina su dodatno uspoređene Log-Rank testom. Receiver operating characteristic (ROC) analiza je korištena kako bi se analizirala prediktivna vrijednost pojedinog parametra u razvoju odnosno oporavku srčane funkcije te je određena osjetljivost i specifičnost pojedinog parametra.

Statistička analiza učinjena je uz programsku podršku SPSS verzija 20.0. Za granicu statističke značajnosti određena je vrijednost  $p = 0.05$ .

## 4. REZULTATI

Analizom prikupljenih anamnestičkih, kliničkih, ehokardiografskih i laboratorijskih podataka prikazani su tablicama i slikama rezultati istraživanja koji su uključivali kvantitativne i kvalitativne varijable.

U istraživanje je uključeno 177 ispitanica, adjuvantno liječene trastuzumabom u Klinici za tumore i Klinici za nuklearnu medicinu KBC “Sestre milosrdnice” u period od 2007-2016. godine. Sve ispitanice liječene su zbog ranog HER2 pozitivnog raka dojke, histološki potvrđenog imunohistokemijski (IHC) ili metodom hibridizacije in situ (ISH-FISH), a prije primjene trastuzumaba bile su operirane te nakon toga primile neki od kemoterapijskih protokola za adjuvantno liječenje raka dojke. Kod ispitanica koje su imale indikaciju za zračenje ono se provodilo konkurentno s aplikacijom trastuzumaba, a nakon završenog kemoterapijskog liječenja.

Ispitanice su podijeljene u dvije grupe: grupa A- ispitanice kod kojih nije došlo do razvoja kardiotoksičnosti tijekom terapije trastuzumabom, grupa B- ispitanice kod kojih je trastuzumab izazvao kardiotoksičnost.

### 4.1. Karakteristike ispitanica ovisno o razvoju kardiotoksičnosti

Na temelju prikupljenih anamnestičkih podataka, analize genskog profila, lokalizacije i bioloških karakteristika tumora te primjenjenih adjuvantnih kemoterapijskih protokola analizirane su varijable ovisno o razvoju kardiotoksičnosti.

Analizirano je ukupno 177 ispitanica. U grupi bez kardiotoksičnosti (A) je bilo 99 ispitanica dok je u grupi s kardiotoksičnošću (B) bilo 78 ispitanica. Prosječna životna dob svih ispitanica bila je  $59.4 \pm 10.7$  godina, u grupi A  $58.2 \pm 11.4$ , a u grupi B  $60.9 \pm 9.7$  godina. Analizirajući pojedine varijable (indeks tjelesne mase (BMI), HER-2/*neu* genski profil, primjenjene kemoterapijske protokole) nije nađena statistička značajna razlika u karakteristikama ispitanica između grupa A i B s obzirom na pojavnost kardiotoksičnosti, osim za lokalizaciju tumora u lijevoj dojci ( $p=0.002$ ) i zahvaćenosti pazušnih limfnih čvorova tumorom s N3 statusom ( $p=0.018$ ). Tablica 4.1.

4.1.Tablica: Karakteristike ispitanica grupe bez kardiotoksičnosti (A) i s kardiotoksičnošću (B)

|                               | Odsutna<br>kardiotoksičnost (A)<br>N = 99 | Prisutna<br>kardiotoksičnost (B)<br>N = 78 | P     |
|-------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|-------|
| Dob (godine)                  | 58.2 ± 11.4                               | 60.9 ± 9.7                                 | 0.095 |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )      | 27.1 ± 4.7                                | 26.4 ± 4.3                                 | 0.340 |
| Genski profil n (%)           |                                           |                                            | 0.934 |
| A/A                           | 63 (63.6)                                 | 48 (61.5)                                  |       |
| A/G                           | 33 (33.3)                                 | 27 (34.6)                                  |       |
| G/G                           | 3 (3.0)                                   | 3 (3.8)                                    |       |
| Prisutan polimorfizam n (%)   | 36 (36.4)                                 | 30 (38.5)                                  | 0.774 |
| Lijeva dojka n (%)            | 36 (36.4)                                 | 47 (60.3)                                  | 0.002 |
| Gradus n (%)                  |                                           |                                            | 0.382 |
| 1                             | 2 (2.0)                                   | 0 (0.0)                                    |       |
| 2                             | 44 (44.4)                                 | 32 (41.0)                                  |       |
| 3                             | 53 (53.5)                                 | 46 (59.0)                                  |       |
| T status n (%)                |                                           |                                            | 0.707 |
| 1                             | 48 (48.5)                                 | 34 (43.6)                                  |       |
| 2                             | 46 (46.5)                                 | 37 (47.4)                                  |       |
| 3                             | 3 (3.0)                                   | 5 (6.4)                                    |       |
| 4                             | 2 (2.0)                                   | 2 (2.6)                                    |       |
| N status n (%)                |                                           |                                            | 0.018 |
| 0                             | 54 (54.5)                                 | 41 (52.6)                                  |       |
| 1                             | 31 (31.3)                                 | 17 (21.8)                                  |       |
| 2                             | 13 (13.1)                                 | 11 (14.1)                                  |       |
| 3                             | 1 (1.0)                                   | 9 (11.5)                                   |       |
| ER n (%)                      | 60 (60.6)                                 | 51 (65.4)                                  | 0.514 |
| PR n (%)                      | 50 (50.5)                                 | 48 (61.5)                                  | 0.425 |
| HER-2 (ISH pozitivno) n (%)   | 15 (15.2)                                 | 11 (14.1)                                  | 0.845 |
| HER-2 (IHC pozitivno) n (%)   | 84 (84.8)                                 | 67 (85.9)                                  | 0.845 |
| Radioterapija n (%)           | 75 (75.8)                                 | 65 (83.3)                                  | 0.218 |
| Kemoterapijski protokol n (%) |                                           |                                            | 0.267 |
| 4 ciklusa antraciklina        | 22 (18.2)                                 | 22 (28.2)                                  |       |
| 6 ciklusa antraciklina        | 63 (62.6)                                 | 50 (62.8)                                  |       |
| Bez antraciklina n (%)        | 12 (13.1)                                 | 6 (7.7)                                    | 0.333 |
| Tip ACx4 protokola n (%)      |                                           |                                            | 0.170 |
| ACx4 + PH                     | 11 (61.1)                                 | 17 (81.0)                                  |       |
| ACx4 + Px4                    | 7 (38.9)                                  | 5 (19.0)                                   |       |

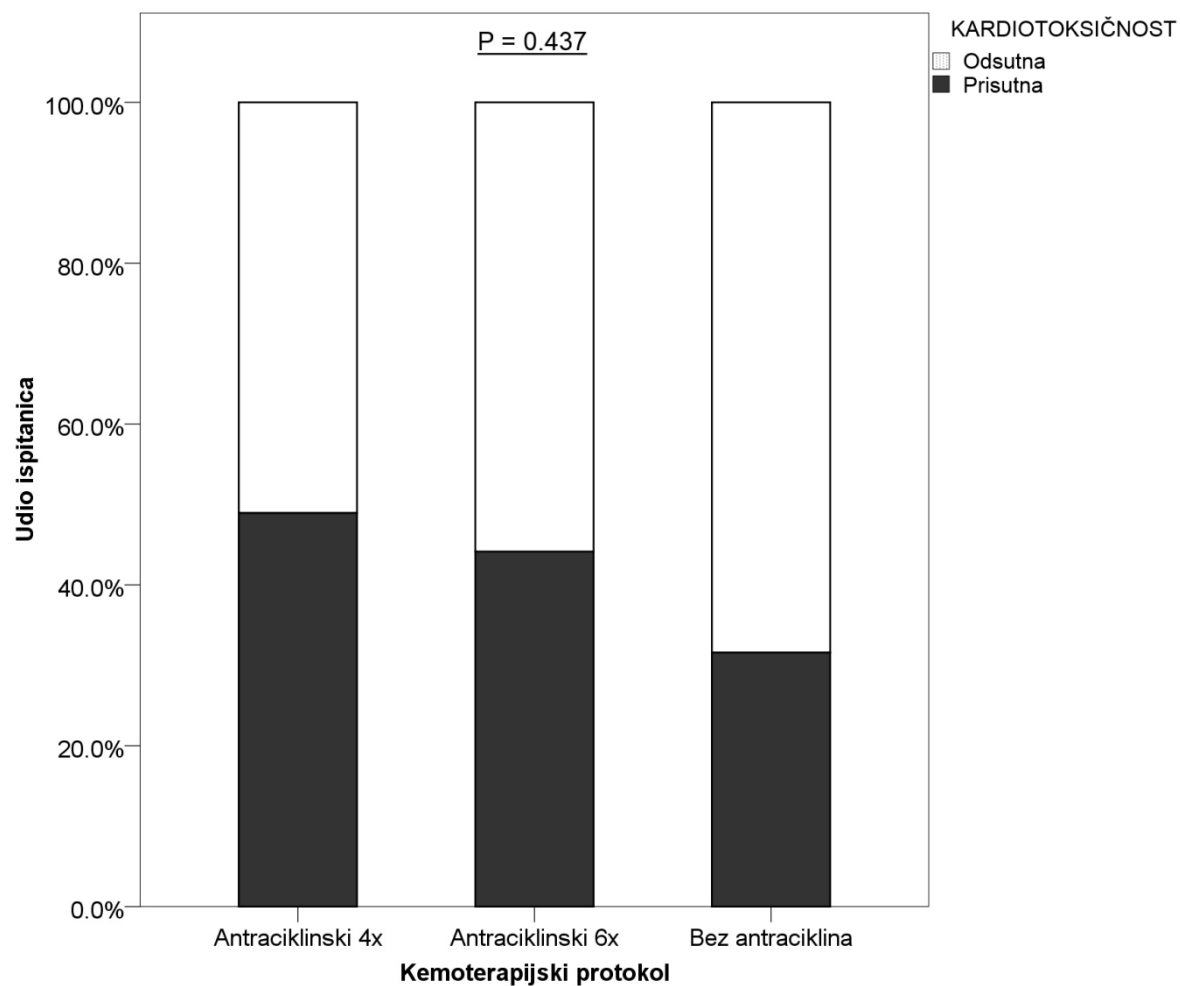
#### 4.2. Adjuvantni kemoterapijski protokoli i kardiotoksičnost

Od ukupno 177 ispitanica njih 18 (10,17%) primilo je adjuvantnu kemoterapiju bez antraciklina. Antraciklinsku kemoterapiju primilo je 159 (89,83%) ispitanica. Šest ciklusa antraciklina, kemoterapijske protokole AC (doksorubicin+ciklofosfamid), EC (epirubicin+ ciklofosfamid), FEC( fluorouracil+epirubicin+ ciklofosfamid ) i FAC (fluorouracil+doksorubicin+ciklofosfamid) primilo je 112 ispitanica (70,44%). Četiri ciklusa antraciklina primilo je ukupno 47 (29,59%) ispitanica, od toga kombinacijske protokole s paklitakselom primilo je 40 (85,10%) ispitanica dok je 7 (14,90%) ispitanica primilo četiri antraciklinska (ACx4) protokola bez paklitaksela.

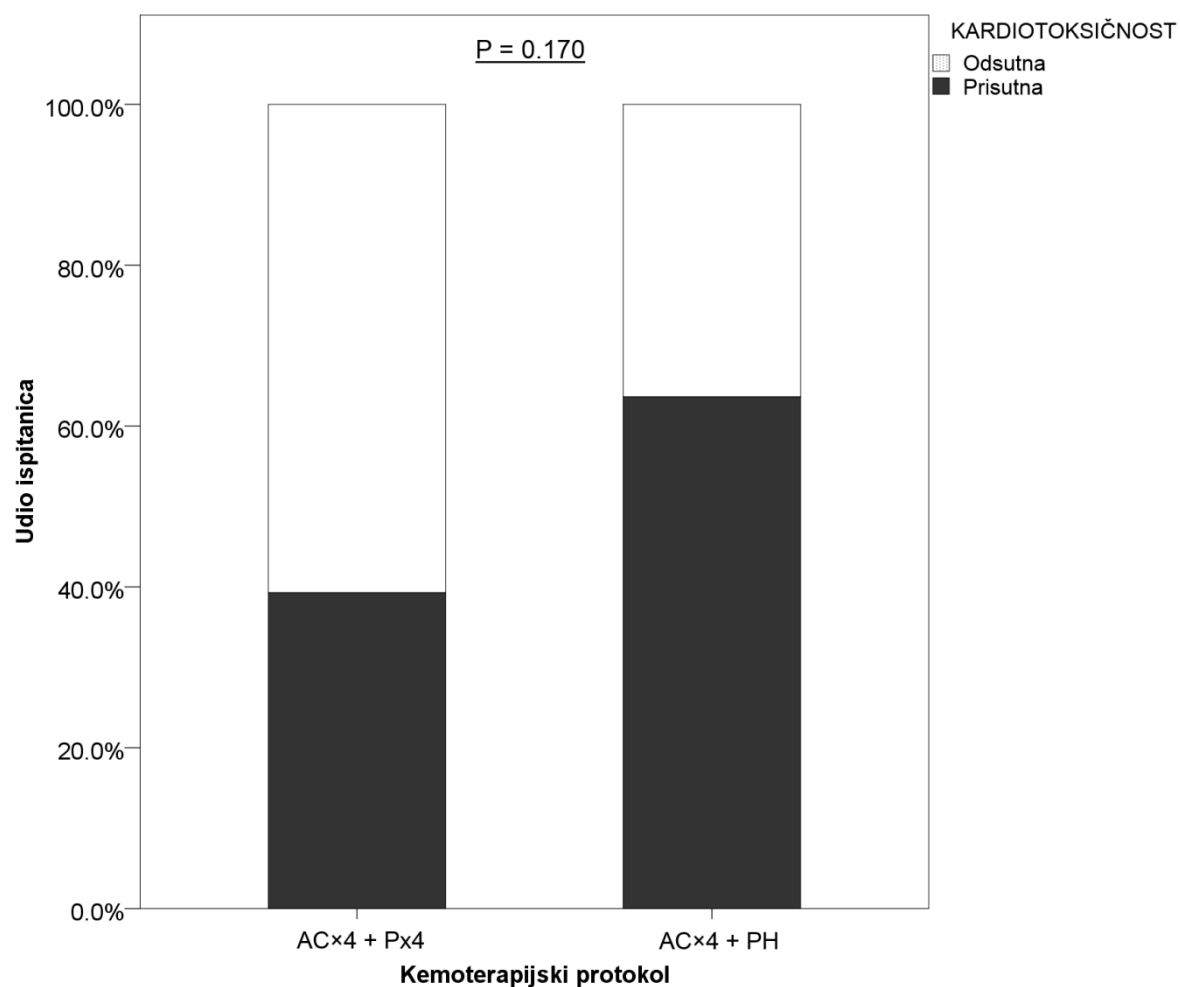
Kombinacijske protokole AC i paklitaksel primilo je 40 ispitanica, od toga ACx4 + Px4 (doksorubicin + ciklofosfamid x4 + pakitaksel x4 u trotjednim intervalima) njih 12 i ACx4 +PH (doksorubicin+ ciklofosfamid x4+ 12 tjednih ciklusa paklitaksela konkurentno s trastuzumabom u trotjednim aplikacijama) primilo je 28 ispitanica.

Neantraciklinske protokole: endokrina terapija i trastuzumab, paklitaksel i trastuzumab, CMF (ciklofosfamid+metotreksat+fluorouracil) i TCH (docetaksel +karboplatin + trastuzumab) primilo je 18 ispitanica.

Kardiotoksičnost se razvila u 45,3% (72/159) ispitanica koje su liječene antraciklinima i u 33,3% (6/18) ispitanica koje nisu liječene antraciklinima; navedena razlika nije dosegla statističku značajnost ( $p=0.333$ ). Kardiotoksičnost je zabilježena u 55% (22/40) koji su dobili 4 ciklusa kemoterapije antraciklinima i u 44,6% (50/112) ispitanica koje su dobile 6 ciklusa antraciklinske kemoterapije, navedena razlika nije dosegla statističku značajnost ( $p = 0.269$ ). Navedene razlike između pojedinih kemoterapijskih protokola prikazane su u slici 4.1. U kombinacijskim protokolima antraciklina i paklitaksela kardiotoksičnost je zabilježena u 60,7% (17/28) ispitanica u ACx4+PH te u 41,7% (5/12) ispitanica u ACx4+ Px4 skupini. Zbog malog uzorka navedena razlika nije dosegla statističku značajnost ( $p=0.170$ ) (Tablica 4.1 i Slika 4.2).



Slika 4.1. Nije bilo značajne razlike u razvoju kardiotoxičnosti obzirom na adjuvantni kemoterapijski protokol, antraciklini naspram neantraciklinskog protokola, iako su ispitanice koje su dobile kemoterapiju bez antraciklina imale nešto manju pojavnost kardiotoxičnosti naspram onih koje su dobile antracikline.

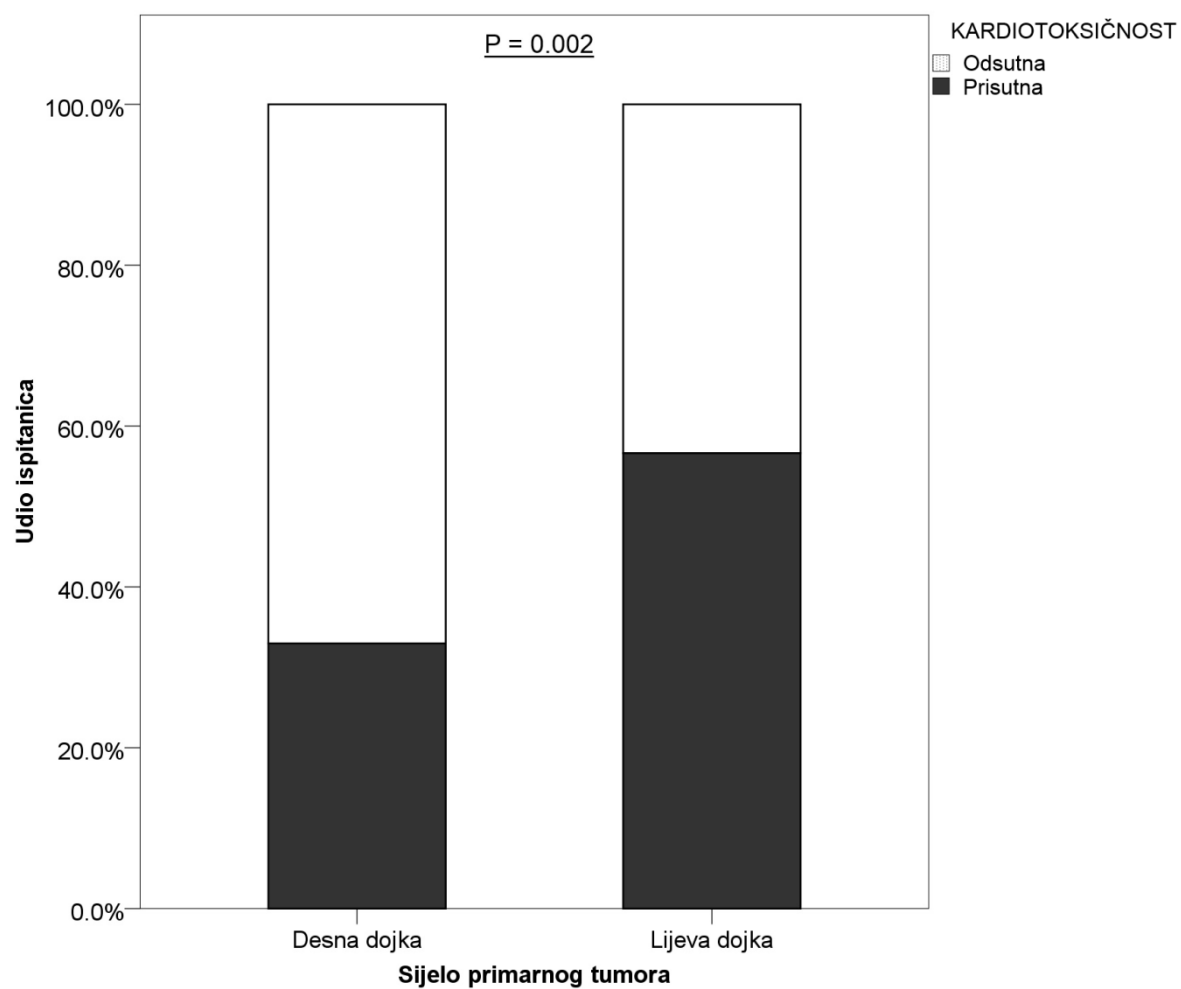


Slika 4.2. U kombinacijskim protokolima antraciklina AC (doksorubicin+ ciklofosfamid) četiri ciklusa te u nastavku paklitaksel (P) četiri ciklusa u trotjednom intervalu ( ACx4+Px4) i AC četiri ciklusa te u nastavku 12 ciklusa paklitaksela u tjednim intervalima konkurentno s trastuzumabom (PH) koji se primjenjivao svaka tri tjedna (ACx4+PH) nije bilo statistički značajne razlike u kardiotoksičnosti iako su ispitanice koje su primile protokol ACx4+PH češće razvile kardiotoksičnost.

### **4.3. Lokalizacija tumora, zračenje i kardiotoksičnost**

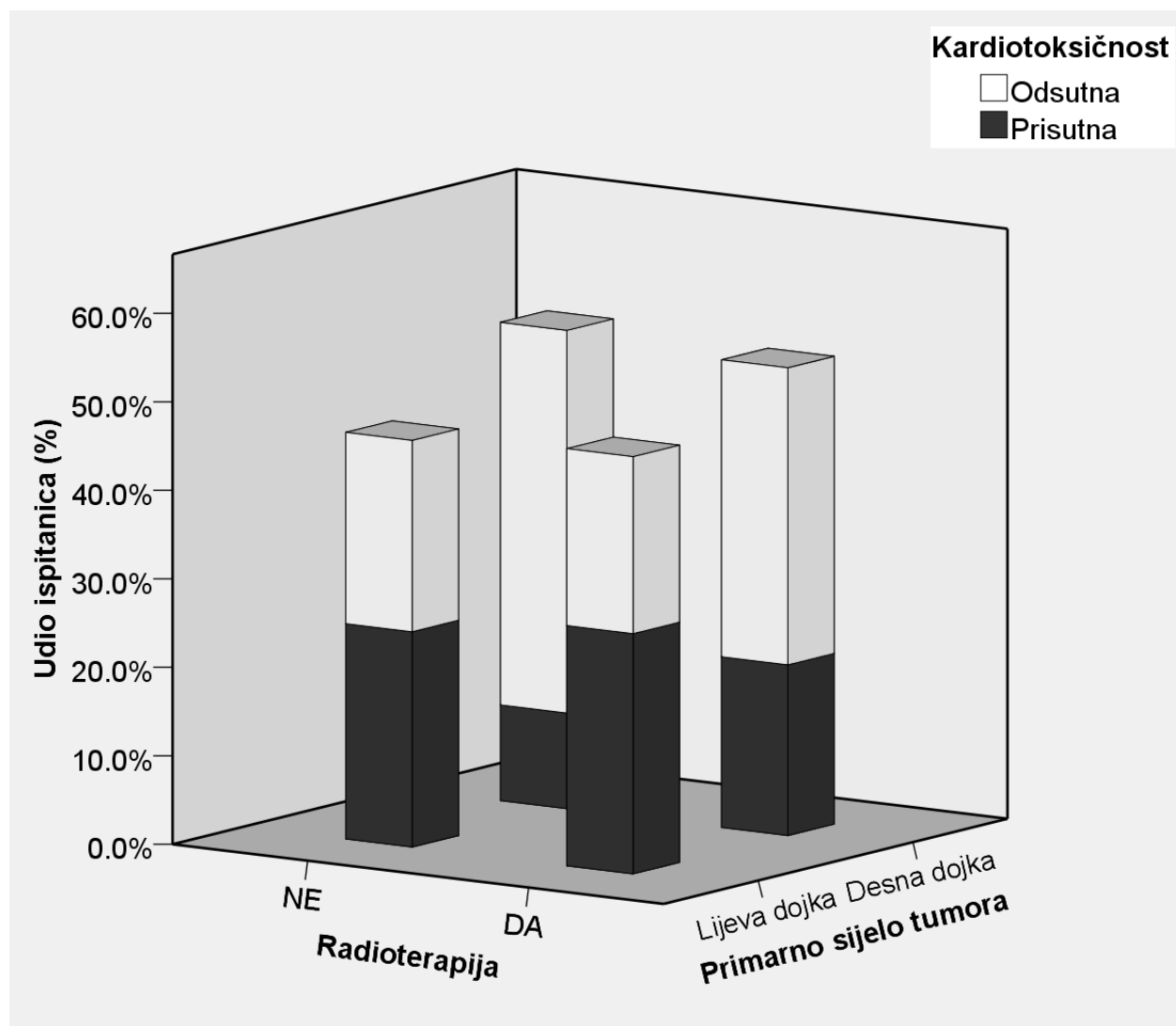
Od 177 ispitanica njih 94 imalo je tumor u desnoj dojci, a 83 u lijevoj dojci. Od ukupno 78 ispitanica koje su razvile kardiotoksičnost njih 47 (60,3% ) imalo je tumor lijeve dojke, dok je tumor u desnoj dojci bio prisutan kod 31 ispitanice (39,7%) te predstavlja statističku značajnost u razvoju kardiotoksičnosti ( $P=0.002$ ). Slika 4.3. U ispitanica koje su razvile kardiotoksičnost, zahvaćenost lijeve dojke je bila povezana samo s BMI ( $p= 0.026$ ).

U 78 ispitanica koje su razvile kardiotoksičnost, zračenje (radioterapija) je provedeno kod 65 ispitanice (83,33%) dok 13 ispitanica (16,67%) nije zračeno. Od 65 ispitanica s kardiotoksičnošću kod kojih je provedeno zračenje , njih 27 (41,53%) imalo je tumor u desnoj dojci dok je 38 (58,46%) imalo tumor u lijevoj dojci. U 13 ispitanica sa kardiotoksičnošću, a koje nisu zračene 9 (69,2%) ispitanica imalo je primarno sjelo tumora u lijevoj dojci, naspram 4 (30,8%) ispitanica s primarnim tumorom u desnoj dojci. Povezanost primarnog sjela u lijevoj dojci i kardiotoksičnosti, ostala je statistički značajna i nakon korekcije za radioterapijsko liječenje, T i N status te gradus tumora (HR 2.62, 95% CI 1.42 - 4.85,  $p=0.002$ ). Slika 4.4.



Slika 4.3. Lokalizacija tumora i kardiotoksičnost





Slika 4.4. Kardiotoksičnost ovisno o liječenju radioterapijom i primarnom sjelu tumora (postotci na y-osi se odnose na udio ispitanica liječenih radioterapijom). Radioterapija lijevog prsišta nije značajnije utjecala na pojavnost kardiotoksičnosti.

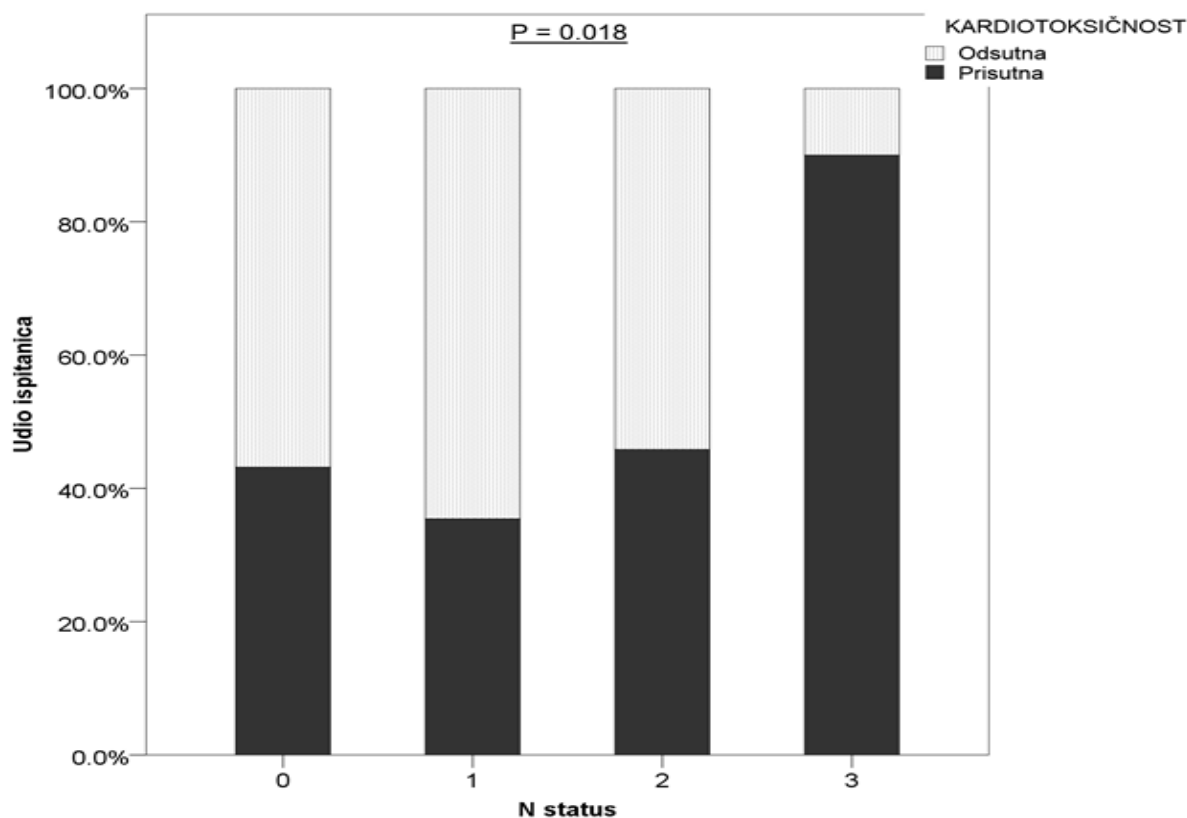
#### 4.4. Karakteristike tumora dojke i kardiotsičnost

S obzirom na karakteristike primarnog tumora gradus I bio je kod 2 ispitanice (1,13%), gradus II kod 76 ispitanica (43,18%) i gradus III kod 99 ispitanica (56,25%). Tablica 4.1. S obzirom na TNM klasifikaciju, ovisnu o veličini tumora, T1 tumor do 2 cm imale su 82 ispitanice (46,32%), T2 tumor veličine 2-5 cm imale su 83 ispitanice (46,89%), T3 tumor veličine veće od 5 cm imalo je 8 ispitanica (4,51%), T4 tumor bilo koje veličine s direktnim širenjem na zid prsnog koša ili kožu imale su 4 ispitanice (2,25%) Nije nađeno statistički značajne razlike u gradusu i veličini tumora s obzirom na razvoj kardiotsičnosti. Tablica 4.1.

Zahvaćenost pazušnih limfnih čvorova tumorom bila je sljedeća: bez zahvaćenih pazušnih čvorova (N0) imalo je 95/177 (53,67%) ispitanica, N1 statusa (čvorovi zahvaćeni i pomični) imalo je (48/177) 27,11% ispitanica, N2 statusa (pazušni limfni čvorovi srasli i fiksirani) imalo je 24/177 (13,55%) ispitanica i N3 status (zahvaćenost istostanih limfnih čvorova unutar dojke) imalo je 10/177 (5,65%) ispitanica. Tablica 4.1.

Ispitanice s N3 statusom u grupi A bile su zastupljene s 1%, dok u grupi B s 11,5% ( $p=0.018$ ). Ispitanice s kardiotsičnošću imale su veću prevelenciju N3 statusa. Slika 4.5.

Hormonski senzitivnih ispitanica, estrogen receptor (ER) pozitivnih bilo je 111/177 (62,71%). U grupi A ER pozitivnih bilo je 60 (60,6%) te u grupi B 51 (65,4%). Nije nađena statistički značajna razlika s obzirom na ER status i pojavnost kardiotsičnosti ( $p=0.514$ ). Progesteronski receptori (PR) bili su pozitivni kod 98/177 (55,36%) ispitanica, u grupi A kod 50 (50,5%) i u grupi B kod 48 (61,5%). Nije nađena statistički značajna razlika s obzirom na PR status i pojavnost kardiotsičnosti ( $p=0.425$ ).

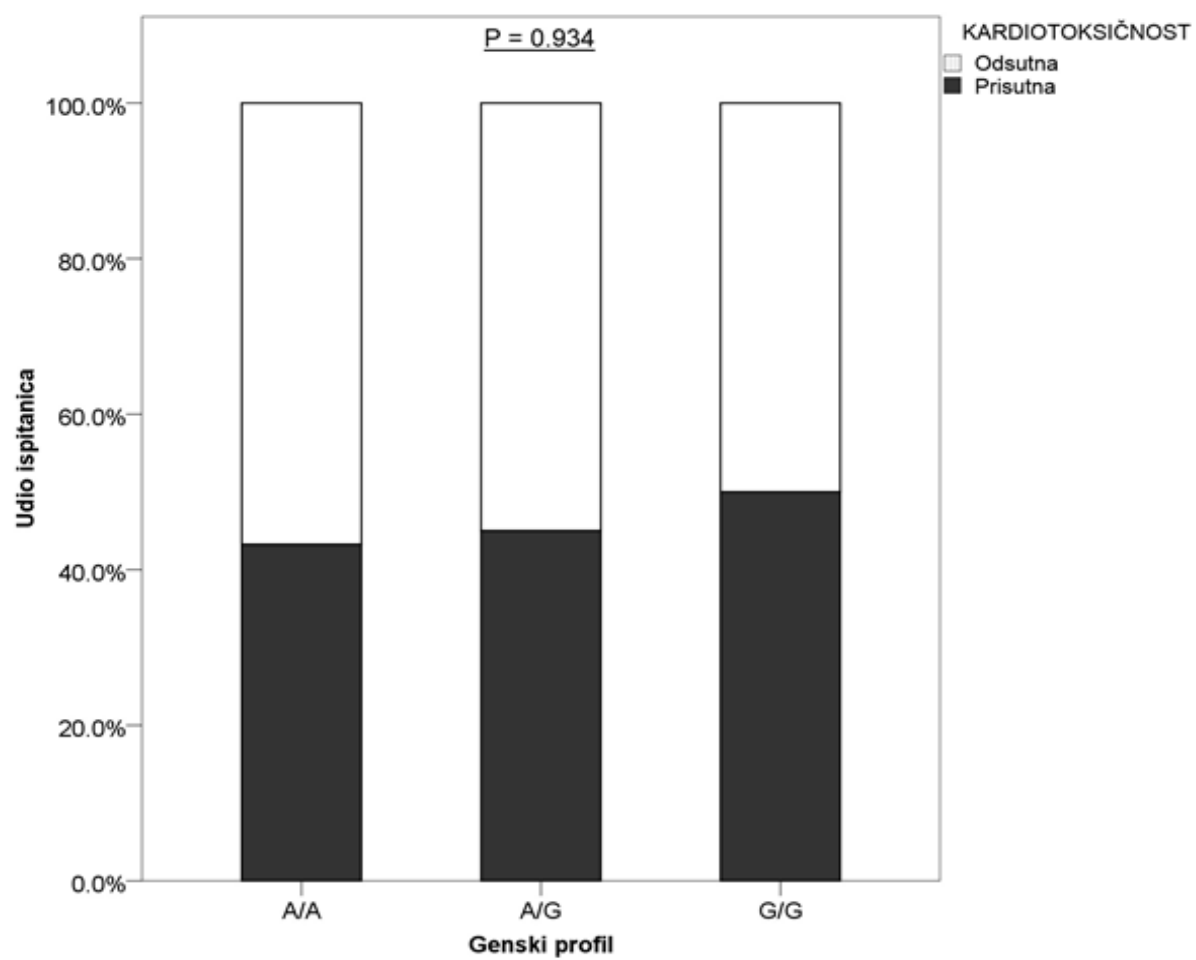


Slika 4.5. Prisustvo kardiotoksičnosti ovisno o zahvaćenosti pazušnih limfnih čvorova

#### 4.5. Genotip *HER-2/neu* i utjecaj na kardiotoksičnost

Genotip *HER-2/neu* u svih 177 ispitanica bio je zastupljen u sljedećoj distribuciji: A/A (Ile/Ile) u 111 ispitanica (62,7%), A/G (Ile/Val) u 60 ispitanica (33,9%) i G/G (Val/Val) u 6 ispitanica (3,4%).

S obzirom na distribuciju genotipa *HER-2/neu* u grupi (A) bez kardiotoksičnosti genotip A/A bio je prisutan kod 63 ispitanice (63,6%), a u grupi (B) sa prisutnom kardiotoksičnošću kod 48 ispitanica (61,5%). Genotip A/G u grupi (A) bio je kod 33 ispitanice (33,3%), a u grupi (B) kod 27 ispitanica (34,6%). Genotip G/G u grupi A bio je zastupljen kod 3 ispitanice (3,0%) i u grupi (B) kod 3 ispitanice (3,8%). Tablica 4.1. Distribucija genotipa *HER2/neu* u korelaciji s kardiotoksičnošću prikazana je slikom 4.6.



Slika 4.6. Distribucija genotipa *HER-2/neu* i kardiotoksičnost

#### **4.6. Parametri kardijalne funkcije tijekom terapije trastuzumabom i kardiovaskularni čimbenici rizika**

Početna istisna frakcija lijevog ventrikla (EFLV) u grupi A iznosila je  $64.1 \pm 4.3$ , a u grupi B  $63.3 \pm 4.4$ . Tijekom liječenja trastuzumabom došlo je do smanjenja istisne frakcije na najnižu vrijednost u grupi A  $60.9 \pm 3.7\%$  dok je u grupi B najniža vrijednost bila  $44.0 \pm 9.2\%$  ( $p < 0.001$ ). Završna vrijednost EFLV nakon završene terapije trastuzumabom u grupi A bila je  $62.1 \pm 3.7\%$ , a u grupi B nakon srčanog oporavka  $53.7 \pm 7.6\%$  ( $p < 0.001$ ). Tablica 4.5. Slika 4.7.

Osim promjene sistoličke funkcije (EFLV) postojala je statistički značajna promjena dijastoličke funkcije lijevog ventrikla ( $p < 0.001$ ), odnosno tijekom terapije trastuzumabom disfunkcija 1. stupnja u grupi A bila je zastupljena kod 5,1%, a u grupi B kod 43,6% ispitanica. Disfunkcija 2. stupnja u grupi A bila je kod 2,0%, a u grupi B kod 14,1% ispitanica. Tablica 4.2. Slika 4.8.

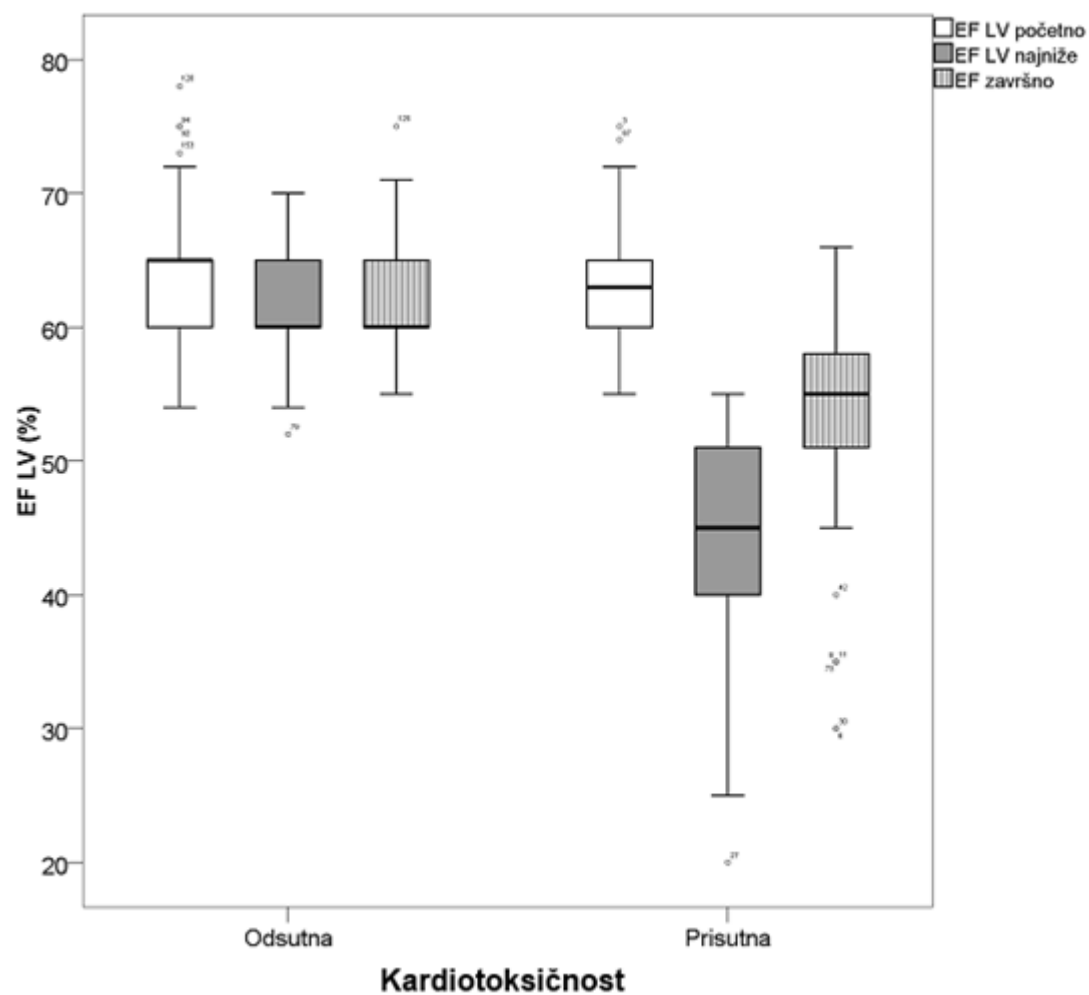
Vrijednosti N terminalnog dijela moždanog natrijuretskog peptide (NT-proBNP) u grupi A nakon završenog liječenja trastuzumabom bila je  $45.6 \pm 44.4$  pg/ml, dok je u grupi B nakon postizanja srčanog oporavka bila  $155.7 \pm 180.5$  pg/ml ( $p < 0.001$ ). Tablica 4.2., Slika 4.9.

Arterijska hipertenzija bila je prisutna kod 94 ispitanice (53,11%), od toga u grupi A kod 48 ispitanica (48,5%) i u grupi B kod 46 ispitanica (59,0%). Prevalencija dijabetesa, hiperlipidemije i koronarne bolesti bila je numerički viša u grupi B ali bez statističke značajnosti. Tablica 4.2.

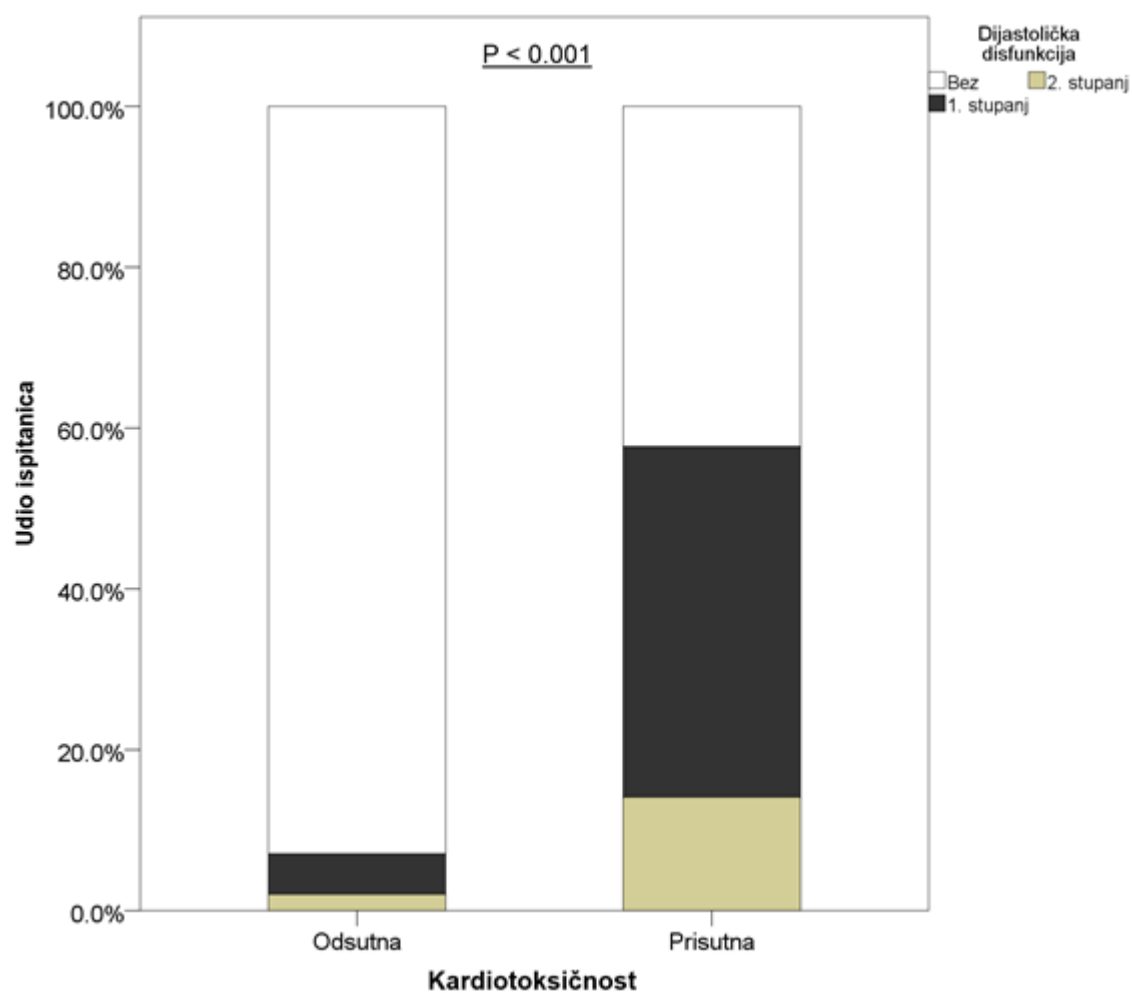
Pozitivnu obiteljsku anamnezu kardiovaskularne bolesti imale su 51 ispitanice (28,81%), u grupi A bilo ih je 20 (20,2%) dok je u grupi B 31 ispitanica (39,7%) imala pozitivnu obiteljsku anamnezu ( $p = 0.004$ ). Tablica 4.2.

Tablica 4.2. Srčana funkcija i kardiovaskularni čimbenici rizika u razvoju kardiotoksičnosti

|                                                           | Odsutna kardiotoksičnost<br>N = 99 | Prisutna kardiotoksičnost<br>N = 78 | P      |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------|
| EF početak (%)                                            | 64.1 ± 4.3                         | 63.3 ± 4.4                          | 0.236  |
| EF završno (%)                                            | 62.1 ± 3.7                         | 53.7 ± 7.6                          | <0.001 |
| NT-- proBNP (pg/ml)                                       | 45.6 ± 44.4                        | 155.7 ± 180.5                       | <0.001 |
| Dijastolička disfunkcija<br>početno n (%)                 |                                    |                                     | 0.646  |
| 0                                                         | 58 (58.6)                          | 42 (53.8)                           |        |
| 1                                                         | 37 (37.4)                          | 34 (43.6)                           |        |
| 2                                                         | 4 (4.0)                            | 2 (2.6)                             |        |
| Dijastolička disfunkcija<br>završno n (%)                 |                                    |                                     | <0.001 |
| 0                                                         | 92 (92.9)                          | 33 (42.3)                           |        |
| 1                                                         | 5 (5.1)                            | 34 (43.6)                           |        |
| 2                                                         | 2 (2.0)                            | 11 (14.1)                           |        |
| Hipertenzija n (%)                                        | 48 (48.5)                          | 46 (59.0)                           | 0.165  |
| Dijabetes n (%)                                           | 5 (5.1)                            | 8 (10.3)                            | 0.187  |
| Dislipidemija n (%)                                       | 20 (20.2)                          | 23 (29.5)                           | 0.153  |
| Koronarna bolest n (%)                                    | 0 (0.0)                            | 1 (1.3)                             | 0.259  |
| Pozitivna obiteljska anamneza<br>kardijalne bolesti n (%) | 20 (20.2)                          | 31 (39.7)                           | 0.004  |

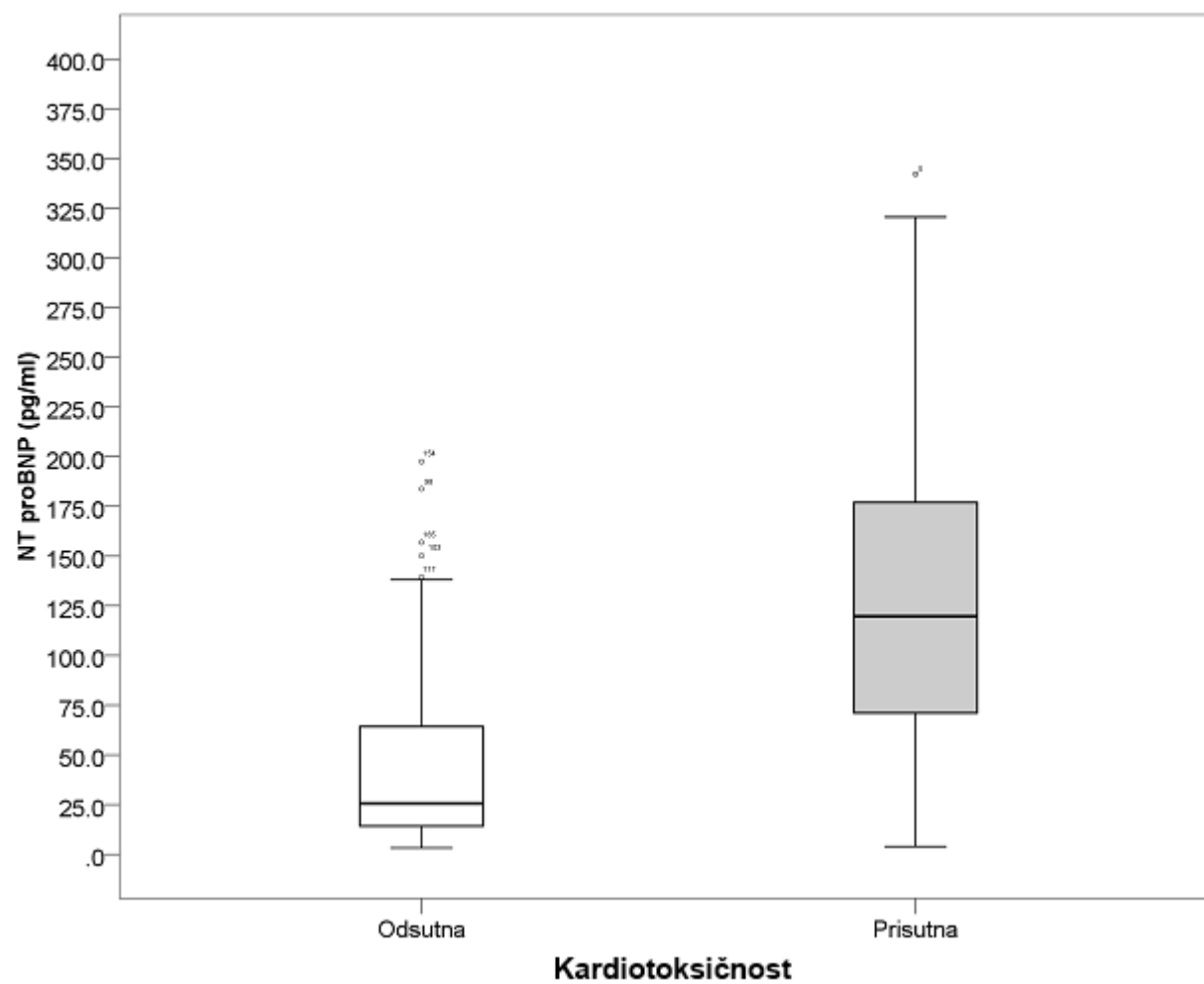


Slika 4.7. Dinamika promjene istisne frakcije lijevog ventrikla (EFLV) tijekom terapije trastuzumabom u grupi A i grupi B. U grupi A najniža vrijednost EFLV  $60,9 \pm 3,7$  % dok je u grupi B najniža vrijednost bila  $44,0 \pm 9,2$  %.



Slika 4.8. Promjene dijastoličke funkcije lijeve klijetke u grupama ispitanica bez kardiotoksičnosti i s razvijenom kardiotoksičnošću





Slika 4.9. Vrijednosti NT-proBNP-a kod ispitanica bez kardiotoksičnosti (A) te ispitanica s razvijenom kardiotoksičnošću (B)

#### 4.7. Karakteristike ispitanica ovisno o genotipu *HER-2/neu*

Ispitanice s genotipom G/G (Val/Val) su imale statistički značajno veći indeks tjelesne mase (BMI) te je nađen trend veće prevalencije arterijske hipertenzije i pozitivne obiteljske anamneze, iako navedene razlike nisu dosegle statističku značajnost. Tablica 4.3.

Nisu nađene statistički značajnije razlike u ispitivanim varijablama (dob, BMI, gradus tumora, veličina tumora, zahvaćenosti limfnih čvorova, hormonalnom status s obzirom na genotip *HER-2/neu*. Tablica 4.3.

Ekspresija receptora HER2 na membrani tumorske stanice izražena imunohistokemijski (IHC) kao 3+ bila je zastupljena kod 94 ispitanice (84,7%) s genotipom A/A, 52 ispitanice (86,7%) imalo je genotip A/G, a 5 ispitanica (83,3%) imalo je genotip G/G. Nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji receptora HER2 na tumorskoj stanici u odnosu na genotip *HER-2/neu* ( $p=0.932$ ). Tablica 4.3.

Ispitanice s genotipom G/G imale su nešto veći pad EFLV tijekom terapije trastuzumabom ali bez statističke značajnosti ( $p=0.323$ ). Nije nađeno značajnije razlike u težini srčanog zatajivanja, reverzibilnosti i vremenu oporavka obzirom na genotip *HER-2/neu*. Tablica 4.4.

Tablica 4.3. Karakteristike ispitanica ovisno o genotipu *HER-2/neu*

| Genotip                  | A/A<br>N=111 | A/G<br>N=60 | G/G<br>N=6 | P     |
|--------------------------|--------------|-------------|------------|-------|
| Dob (godine)             | 59.8 ± 10.3  | 58.3 ± 11.8 | 63.0 ± 6.9 | 0.590 |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | 26.5 ± 4.7   | 27.0 ± 4.4  | 30.5 ± 2.3 | 0.049 |
| Lijeva dojka n (%)       | 51 (45.9)    | 31 (51.7)   | 1 (16.7)   | 0.248 |
| Gradus n (%)             |              |             |            | 0.823 |
| 1                        | 2 (1.8)      | 0 (0.0)     | 0 (0.0)    |       |
| 2                        | 47 (42.3)    | 27 (45.0)   | 2 (33.3)   |       |
| 3                        | 62 (55.9)    | 33 (55.0)   | 4 (66.7)   |       |
| T status n (%)           |              |             |            | 0.411 |
| 1                        | 54 (48.6)    | 27 (45.0)   | 1 (16.7)   |       |
| 2                        | 48 (43.2)    | 30 (50.0)   | 5 (83.3)   |       |
| 3                        | 7 (6.3)      | 1 (1.7)     | 0 (0.0)    |       |
| 4                        | 2 (1.8)      | 2 (3.3)     | 0 (0.0)    |       |
| N status n (%)           |              |             |            | 0.840 |
| 0                        | 59 (53.2)    | 33 (55.0)   | 3 (50.0)   |       |
| 1                        | 28 (25.2)    | 18 (30.0)   | 2 (33.3)   |       |
| 2                        | 18 (16.2)    | 5 (8.3)     | 1 (16.7)   |       |
| 3                        | 6 (5.4)      | 4 (6.7)     | 0 (0.0)    |       |
| ER n (%)                 | 68 (61.3)    | 38 (63.3)   | 5 (83.3)   | 0.529 |
|                          |              |             |            | N/A   |
| PR n (%)                 | 111 (100.0)  | 60 (100.0)  | 6 (100.0)  |       |
| HER2 poz. ISH n (%)      | 17 (15.3)    | 8 (13.3)    | 1 (16.7)   | 0.932 |
| HER2 poz. IHC n (%)      | 94 (84.7)    | 52 (86.7)   | 5 (83.3)   | 0.932 |

Tablica 4.4. Razlike u srčanoj funkciji i komorbiditetima ovisno o genotipu *HER-2/neu*

| Genotip                                              | A/A<br>N=111 | A/G<br>N=60   | G/G<br>N=6   | P     |
|------------------------------------------------------|--------------|---------------|--------------|-------|
| EF početna (%)                                       | 63.5 ± 4.2   | 64.1 ± 4.8    | 64.2 ± 2.8   | 0.602 |
| EF najniža (%)                                       | 54.2 ± 10.3  | 52.7 ± 11.2   | 47.5 ± 13.7  | 0.323 |
| EF završna (%)                                       | 58.6 ± 7.2   | 58.5 ± 6.1    | 53.5 ± 12.5  | 0.368 |
| Dijastolička disfunkcija<br>početno n (%)            |              |               |              | 0.228 |
| 0                                                    | 66 (59.5)    | 33 (55.0)     | 1 (16.7)     |       |
| 1                                                    | 42 (37.8)    | 24 (40.0)     | 5 (83.3)     |       |
| 2                                                    | 3 (2.7)      | 3 (5.0)       | 0 (0.0)      |       |
| Dijastolička disfunkcija<br>završno n (%)            |              |               |              | 0.944 |
| 0                                                    | 78 (70.3)    | 42 (70.0)     | 5 (83.3)     |       |
| 1                                                    | 25 (22.5)    | 13 (21.7)     | 1 (16.7)     |       |
| 2                                                    | 8 (7.2)      | 5 (8.3)       | 0 (0.0)      |       |
| NT proBNP (pg/ml)                                    | 83.7 ± 92.9  | 110.6 ± 194.5 | 122.8 ± 59.2 | 0.164 |
| Hipertenzija n (%)                                   | 63 (56.8)    | 26 (43.3)     | 5 (83.3)     | 0.078 |
| Dijabetes n (%)                                      | 8 (7.2)      | 5 (8.3)       | 0 (0.0)      | 0.754 |
| Hiperlipidemija n (%)                                | 27 (24.3)    | 13 (21.7)     | 3 (50.0)     | 0.304 |
| Obiteljska n (%)                                     | 31 (27.9)    | 17 (28.3)     | 3 (50.0)     | 0.506 |
| Simptomatsko n (%)                                   | 29 (60.4)    | 16 (59.3)     | 3 (100.0)    | 0.375 |
| NYHA n (%)                                           |              |               |              | 0.839 |
| I                                                    | 25 (52.1)    | 14 (51.9)     | 1 (33.3)     |       |
| II                                                   | 17 (35.4)    | 8 (29.6)      | 1 (33.3)     |       |
| III/IV                                               | 6 (12.5)     | 5 (18.5)      | 1 (33.3)     |       |
| Hospitalizirani n (%)                                | 4 (8.3)      | 4 (14.8)      | 1 (33.3)     | 0.325 |
| Reverzibilno n (%)                                   | 42 (87.5)    | 21 (77.8)     | 2 (66.7)     | 0.407 |
| Vrijeme do razvoja<br>kardiotoksičnosti<br>(mjeseci) | 4.9 ± 2.5    | 4.7 ± 2.8     | 7.0 ± 2.6    | 0.225 |
| Vrijeme oporavka (dani)                              | 44.6 ± 33.0  | 48.4 ± 42.9   | 46.7 ± 21.4  | 0.817 |

#### 4.8. Karakteristike, reverzibilnost i liječenje kardiotoksičnosti

U grupi B bilo je 78 ispitanica u kojih je došlo do kardiotoksičnosti tijekom terapije trastuzumabom. Kod 48/78 (61,5%) ispitanica kardiotoksičnost je bila simptomatska s kongestivnim srčanim zatajivanjem (KSZ) i najzastupljenijim simptomima palpitacija (59,0%) i dispneje (42,3%). Teški oblik srčanog zatajivanja NYHA III/IV imalo je 12/78 (15,4%) ispitanica. Reverzibilnu kardiotoksičnost imalo je 65/78 (83,3%) ispitanica, a terapija trastuzumabom ponovno je nastavljena kod 48/65 (73,8%) ispitanica. Unatoč razvijenju kardiotoksičnosti, a uz primjenjenu kardijalnu terapiju, 40/48 ispitanica (83,3%) završilo je planiranu adjuvantnu imunoterapiju trastuzumabom.

U liječenju KSZ kod 61 ispitanice (81,3%) primjenjen je blokator beta adrenergičkih receptora, zatim diuretik 58 (77,3%) i inhibitor angiotenzin pretvorbenog enzima (ACEi) kod 58 (77,3%) ispitanica. Najmanje su primjenjivani digitalis, inhibitor angiotenzinogena II (ATII), spironolakton i antiaritmik. Tablica 4.5.

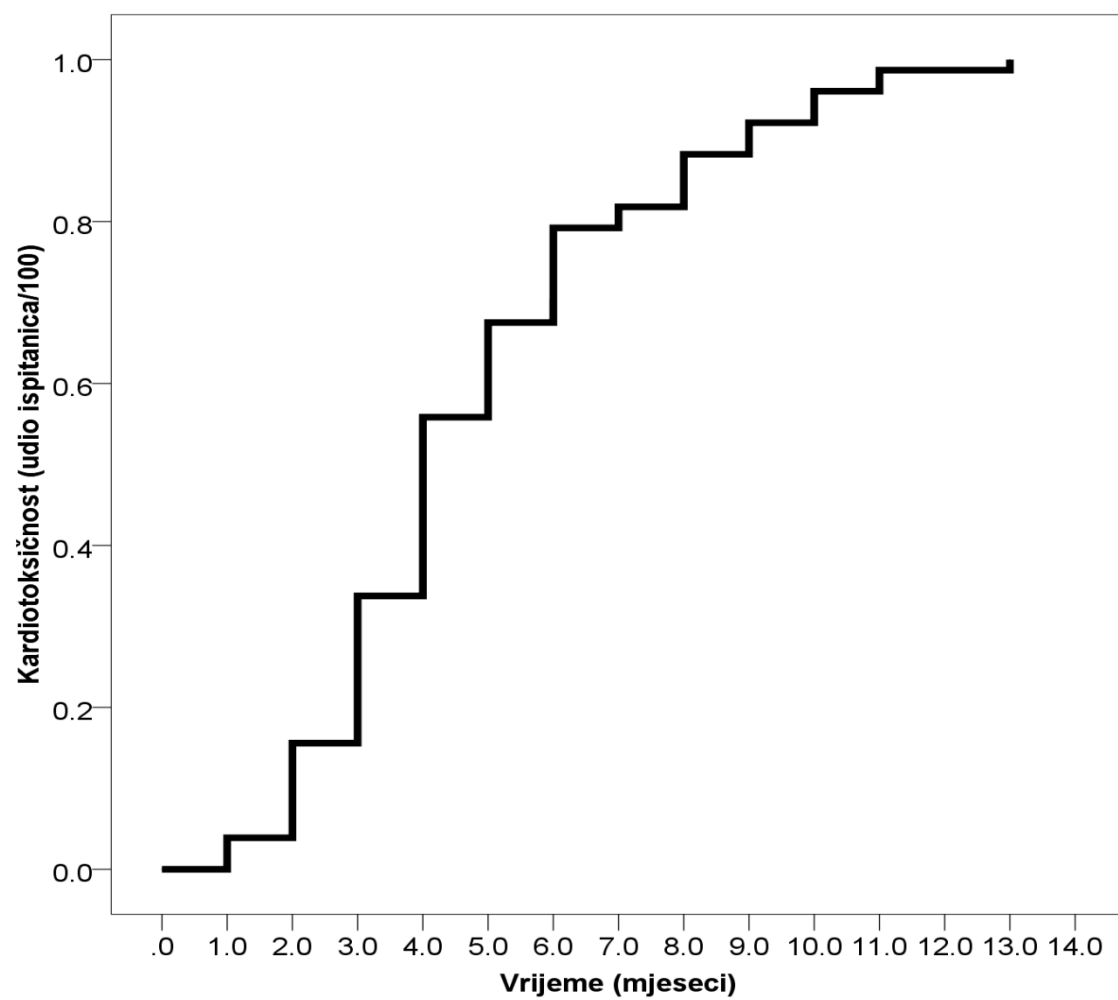
Vrijeme do razvoja kardiotoksičnosti bilo je prosječno  $4.9 \pm 2.6$  mjeseca, dok je vrijeme srčanog oporavka bilo prosječno  $46.0 \pm 36.1$  dana. Tablica 4.5.

Nakon medijana od 4.0 (3.5 - 4.5) mjeseca, 50% ispitanica razvilo je kardiotoksičnost .

Slika 4.10.

Tablica 4.5. Karakteristike ispitanica u kojih je došlo do razvoja kardiotoksičnosti

|                                                   |             |
|---------------------------------------------------|-------------|
| Simptomatska n (%)                                | 48 (61.5)   |
| Ortopneja n (%)                                   | 26 (33.3)   |
| Dispneja n (%)                                    | 33 (42.3)   |
| Edemi n (%)                                       | 24 (30.8)   |
| Palpitacije n (%)                                 | 46 (59.0)   |
| Aritmije n (%)                                    | 16 (20.5)   |
| NYHA n (%)                                        |             |
| 1                                                 | 40 (51.3)   |
| 2                                                 | 26 (33.3)   |
| 3                                                 | 12 (15.4)   |
| Hospitalizirani n (%)                             | 9 (11.5)    |
| Reverzibilna n (%)                                | 65 (83.3)   |
| Nastavljen trastuzumab n (%)                      | 48 (61.5)   |
| Završena th trastuzumabom<br>n (%)                | 40 (51.3)   |
|                                                   | 77 (98.7)   |
| Liječenje KSZ n (%)                               |             |
| Diuretik n (%)                                    | 58 (77.3)   |
| ACEi n (%)                                        | 58 (77.3)   |
| Betablokator n (%)                                | 61 (81.3)   |
| Digitalis n (%)                                   | 9 (12.0)    |
| Spirolakton n (%)                                 | 5 (6.7)     |
| Antiaritmik n (%)                                 | 2 (2.7)     |
| ATII n (%)                                        | 7 (9.3)     |
| Vrijeme do razvoja<br>kardiotoksičnosti (mjeseci) | 4.9 ± 2.6   |
| Vrijeme do oporavka srčane<br>funkcije (dani)     | 46.0 ± 36.1 |

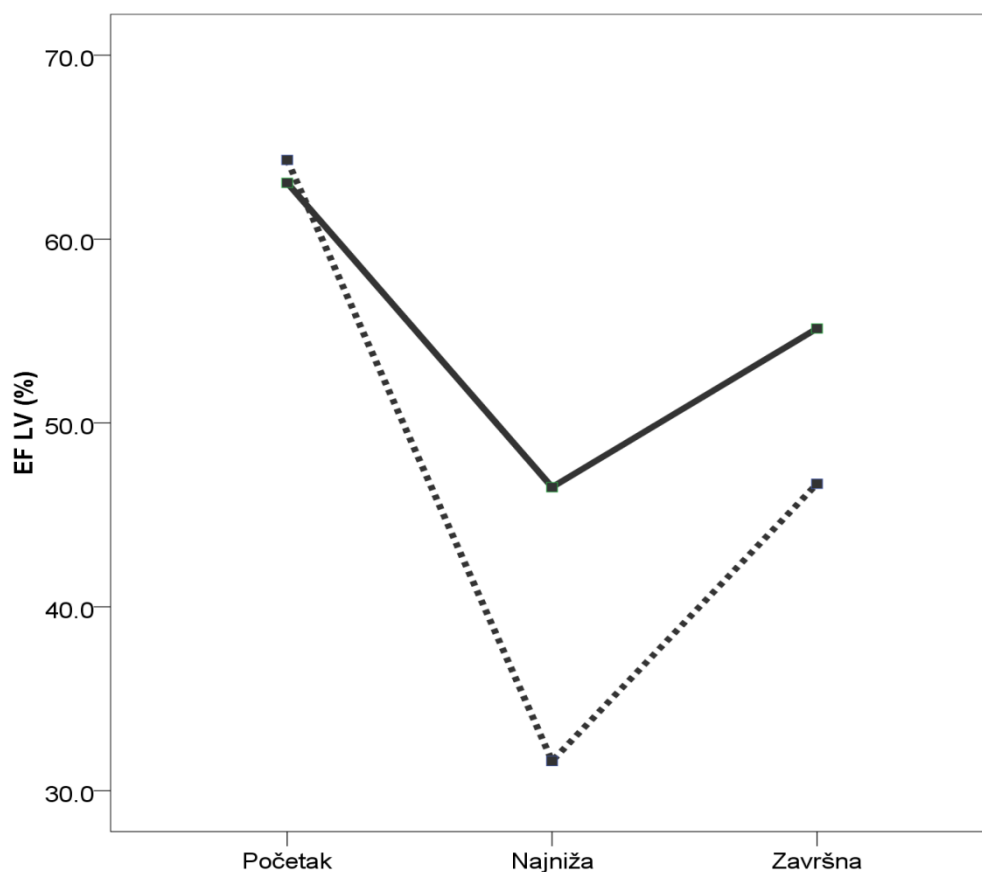


Slika 4.10. Vremenska dinamika nastanka kardiotoksičnosti

#### 4.9. Promjena istisne frakcije lijevog ventrikla (EFLV) tijekom terapije trastuzumabom

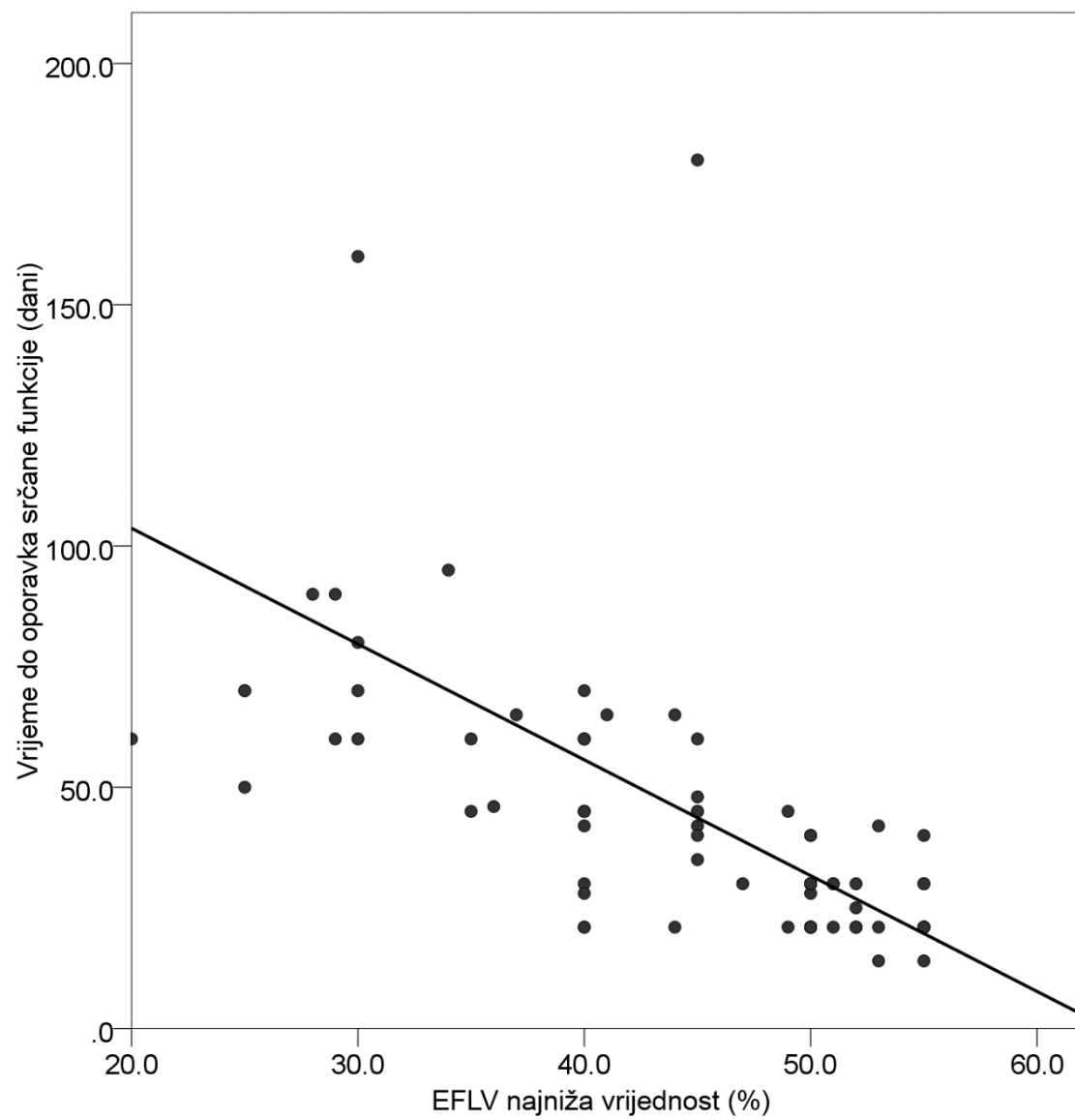
EFLV se značajno promijenila u svih ispitanica koje su razvile kardiotsičnost ( $F = 14.95$ ,  $p < 0.001$ ), no ispitanice u kojih je došlo do oporavka srčane funkcije su imale značajno veću najnižu vrijednost EFLV, odnosno značajno manji pad EFLV ( $F = 24.34$ ,  $p < 0.001$ ) (Slika 4.11).

Dodatno, što je najniža vrijednost EFLV bila veća, odnosno, što je pad EFLV bio manji, to je i oporavak srčane funkcije bio kraći ( $\rho = -0.761$ ,  $p < 0.001$ ) (Slika 4.12). Dob niti BMI nisu imali utjecaja na oporavak srčane funkcije.



Slika 4.11. Promjena istisne frakcije lijevog ventrikla (EFLV) između ispitanica u kojih je došlo do oporavka srčane funkcije (puna linija) i onih u kojih je zaostao poremećaj srčane funkcije (iscrtkana linija)





Slika 4.12. Povezanost najniže EFLV i vremena oporavka srčane funkcije

#### 4.10. Oporavak srčane funkcije

Nakon medijana od 35.0 (29.2 - 40.8) dana, u 50% ispitanica došlo je do oporavka kardiotsičnosti (Slika 4.13). No, u 16.3% ispitanica nije došlo do oporavka srčane funkcije niti nakon 100 dana.

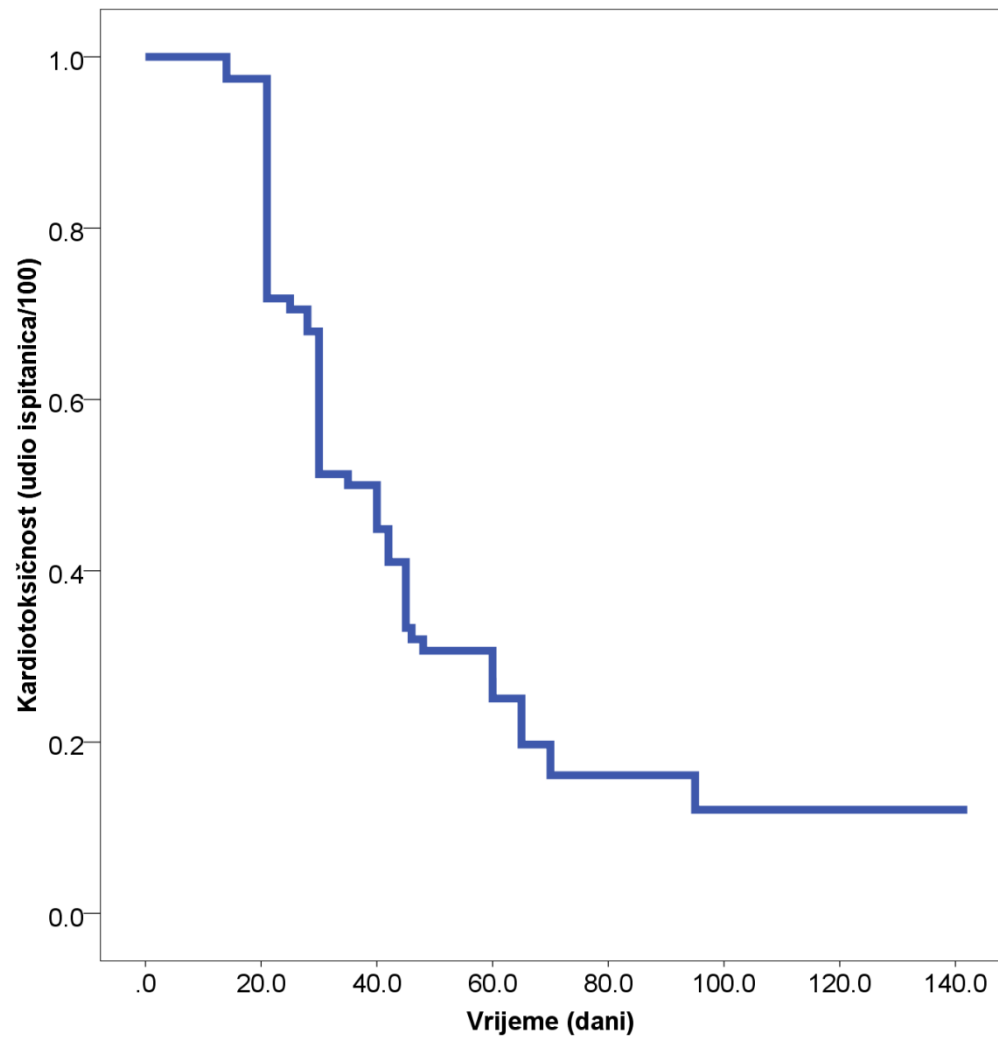
Najsnažniji prognostički čimbenici oporavka srčane funkcije bili su NYHA funkcionalni kardijalni status (Slike 4.14 i 4.15), činjenica da li je ispitanica bila hospitalizirana zbog kardiotsičnosti (Slika 4.16) te liječenje digitalisom (Tablica 4.6).

NYHA status je bio snažno povezan s oporavkom srčane funkcije (Tablica 4.6). U svih ispitanica s NYHA I statusom došlo je do oporavka srčane funkcije, u 84,6% (22/26) ispitanica u NYHA II skupini, no u samo 25% (3/12) ispitanica u NYHA III/IV skupini ( $p < 0.001$ ) (Slike 4.14 i 4.15.).

Prisustvo aritmija je također bilo negativno povezano s oporavkom srčane funkcije, a uzimanje digitalisa je bilo povezano s lošijim oporavkom srčane funkcije (Tablica 4.6 ).

Postojala je značajna razlika u oboravku i brzini oporavka ovisno o činjenici da li je nastavljena terapija trastuzumabom. Ispitanice u kojih je došlo do oporavka srčane funkcije, češće su nastavile terapiju trastuzumabom. (Slika 4.17)

S obzirom na činjenicu da je u velikoj mjeri riječ o presječnom istraživanju, nije moguće zaključivati o uzročno-posljedičnim vezama između digitalisa i oporavka srčane funkcije. NT- proBNP je pozitivno korelirao s vremenom potrebnim za oporavak srčane funkcije ( $\rho = 0.333$ ,  $p = 0.003$ ) i negativno je korelirao s završnom EFVL ( $\rho = -0.305$ ,  $p = 0.007$ ), no nije nađena statistički značajna korelacija sa samim oporavkom srčane funkcije (OR 0.998, 95% CI 0.995 - 1.000,  $p = 0.098$ ).

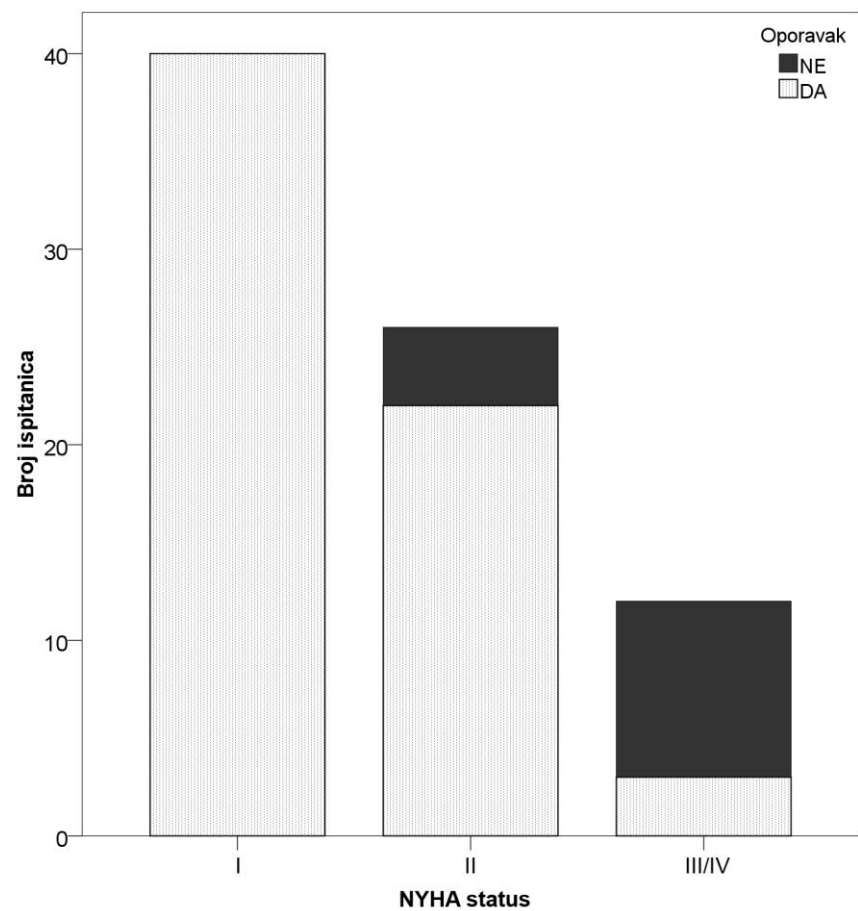


Slika 4.13. Vrijeme oporavka srčane funkciju u ispitanica u kojih je došlo do razvoja kardiotoksičnosti. Nakon medijana od 35.0 (29.2 - 40.8) dana, u 50% ispitanica došlo je do oporavka kardiotoksičnosti.

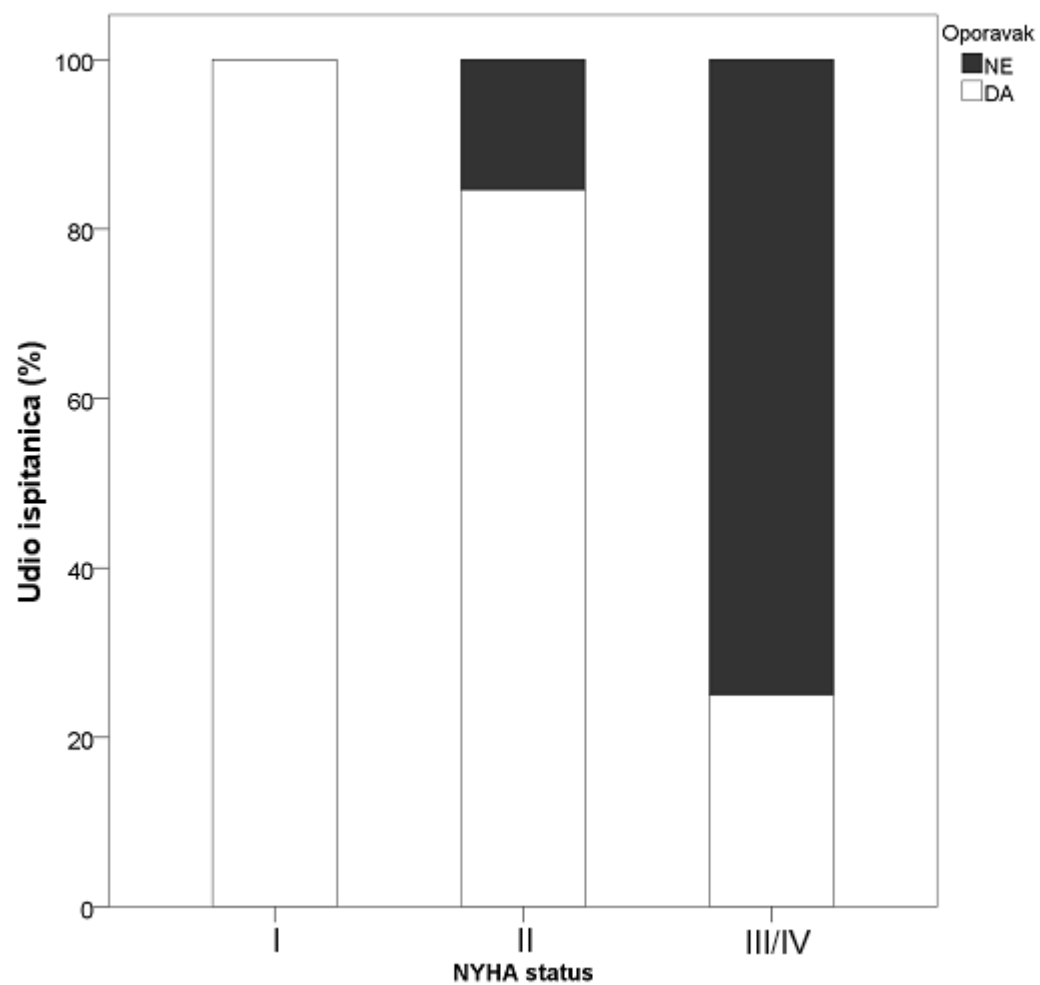
Tablica 4.6. Povezanost trajno oštećene srčane funkcije s pojedinim parametrima (binarna regresija)

|                                  | OR     | 95% interval<br>pouzdanosti |         | P    |
|----------------------------------|--------|-----------------------------|---------|------|
| EF najniža                       | 1.232  | 1.113                       | 1.363   | .000 |
| EF završna                       | 1.136  | 1.050                       | 1.229   | .002 |
| Dijastolička disfunkcija najniža | 12.917 | 2.014                       | 82.830  | .007 |
| Pozitivna obiteljska anamneza    | 6.984  | 1.738                       | 28.068  | .006 |
| Simptomatska kardiotoksičnost    | 9.667  | 1.186                       | 78.766  | .034 |
| Ortopneja                        | 10.208 | 2.497                       | 41.739  | .001 |
| Zaduha                           | 10.750 | 2.188                       | 52.811  | .003 |
| Edemi                            | 7.500  | 2.021                       | 27.839  | .003 |
| Palpitacije                      | 10.941 | 1.343                       | 89.103  | .025 |
| NYHA status                      | 16.500 | 3.057                       | 89.056  | .001 |
| Hospitalizacija                  | 17.714 | 3.609                       | 86.958  | .000 |
| Digitalis                        | 35.000 | 5.893                       | 207.859 | .000 |
| Spironolakton                    | 9.000  | 1.332                       | 60.798  | .024 |
| Trastuzumab nastavljen           | 0.075  | 0.015                       | 0.371   | .002 |

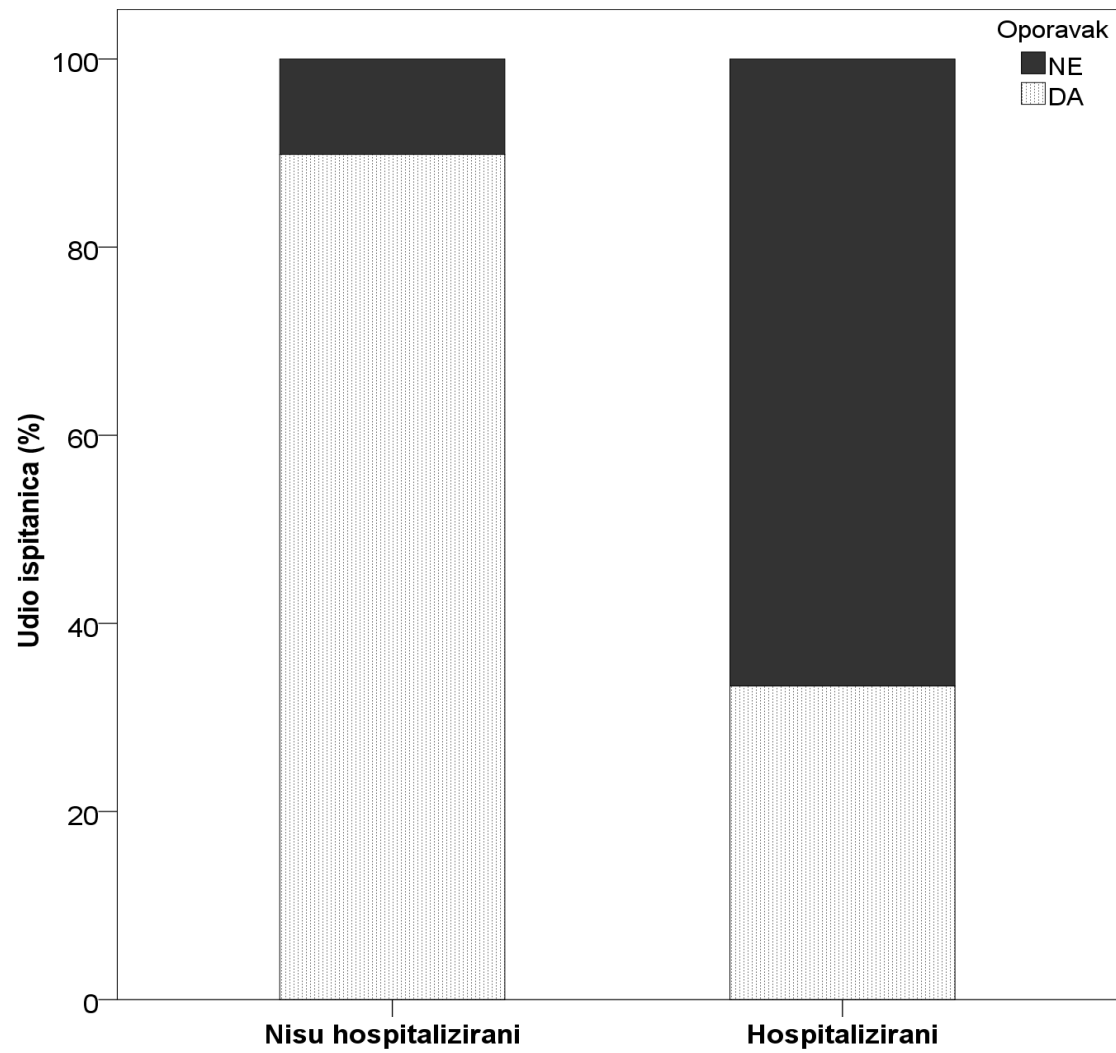
OR – omjer šansi (eng. odds ratio)



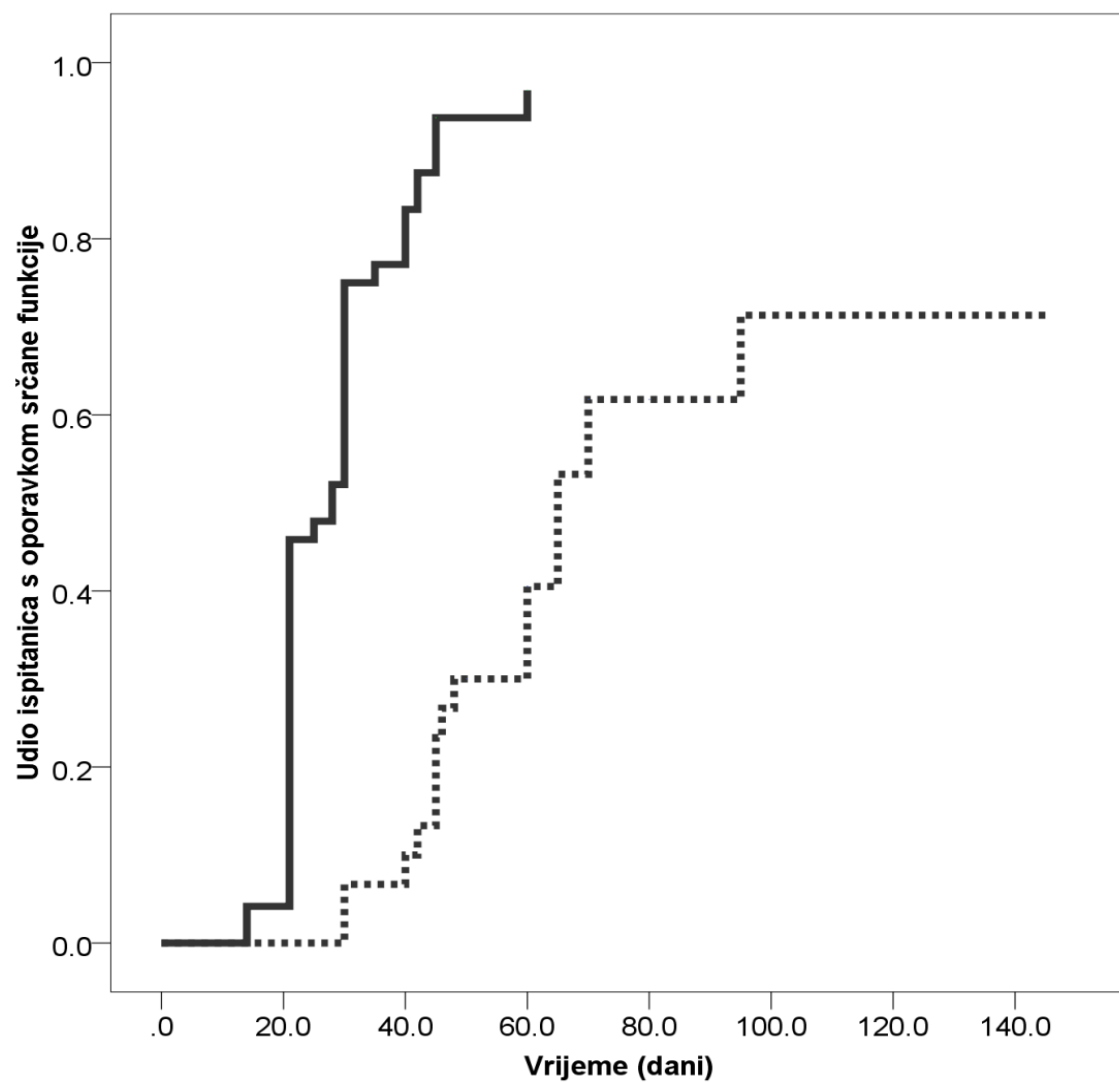
Slika 4.14. Broj ispitanica u kojih nije došlo do oporavka srčane funkcije ovisno o NYHA statusu



Slika 4.15. Udio ispitanica u kojih nije došlo do oporavka srčane funkcije ovisno o NYHA statusu



Slika 4.16. Oporavak srčane funkcije ovisno o potrebi za hospitalizacijom



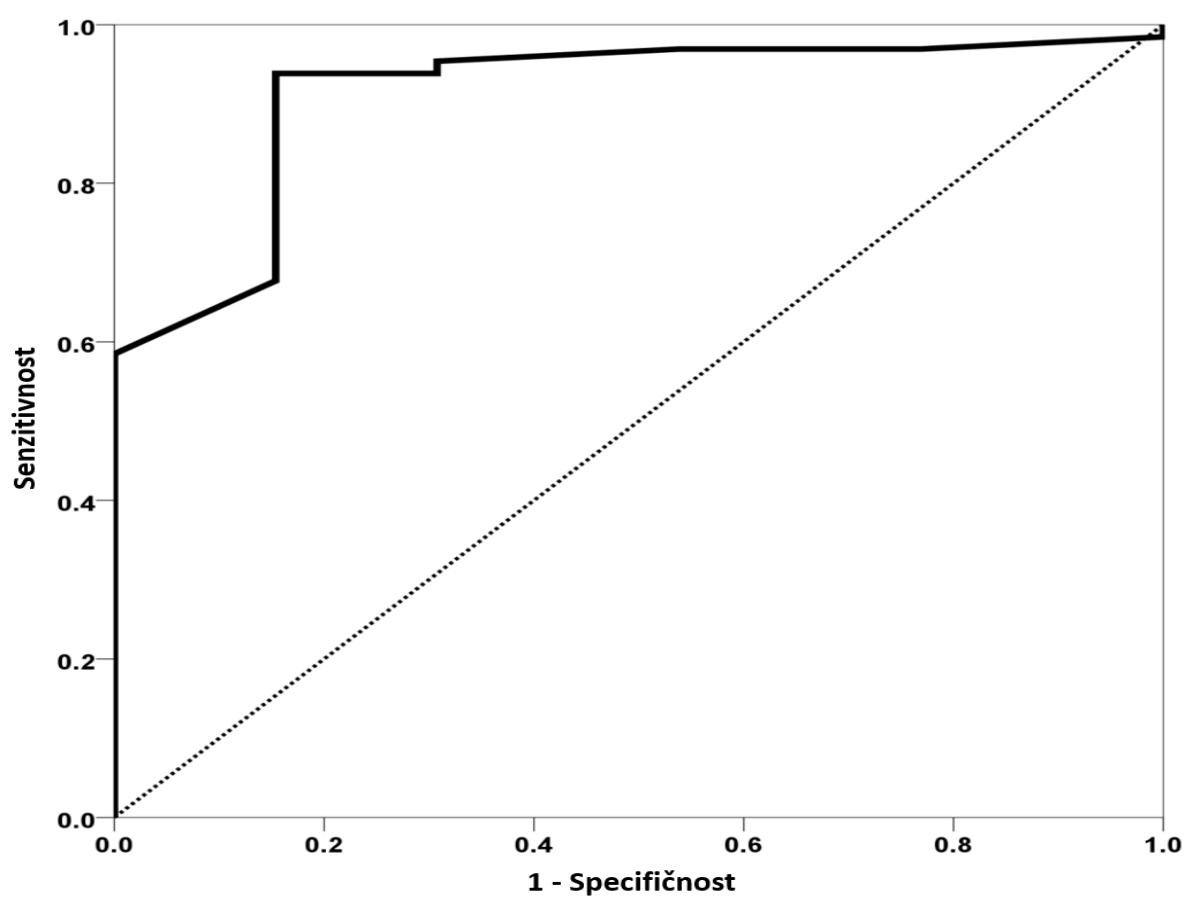
Slika 4.17. Razlike u oporavku srčane funkcije u ispitanica u kojih je nastavljena terapija trastuzumabom (puna linija) i onih u kojih je trajno obustavljena terapija (isprekidana linija)



#### 4.11. Prediktivna vrijednost najniže EFLV u oporavku srčane funkcije

Veličina smanjenja EFLV tijekom terapije trastuzumabom, odnosno najniža vrijednost EFLV bila je povezana s oporavkom srčane funkcije (AUC 0.912, 95% CI 0.833 - 0.992,  $p < 0.001$ ).

U slučaju da je najniža EFLV tijekom terapije trastuzumabom bila  $> 35.5\%$  imala je osjetljivost od 93,8% i specifičnost 84,6% u predikciji oporavka srčane funkcije. (Slika 4.18)



Slika 4.18. ROC krivulja prikazuje povezanost pada ejekcijske frakcije LV i oporavka srčane funkcije

## 5. RASPRAVA

Trastuzumab je humanizirano monoklonsko protutijelo za receptor HER2 koji je član obitelji EGFR, receptora epidermalnog čimbenika rasta, a čija je prekomjerna ekspresija nađena u 15-30% slučajeva raka dojke (59, 86, 87).

Ovaj receptor nema vlastitu veznu domenu za ligand, međutim stalno je u otvorenoj konformaciji i može se čvrsto vezati za druge članove obitelji receptora EGF. Aktivacija receptora HER2, homo ili heterodimerizacijom s drugim članovima obitelji EGFR-a, dovodi do fosforilacije unutarstaničnog dijela receptora i aktivacije dva najvažnija signalna puta: mitogen aktivirajuće protein kinaze (MAPK) čija aktivnost dovodi do stanične proliferacije te fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K) čija aktivnost smanjuje programiranu smrt stanice (apoptozu) (72,73).

Poremećena regulacija HER signalnih staničnih puteva povezana je s razvojem brojnih tumora, uključujući rak dojke, jajnika, želuca, debelog crijeva, mokraćnog mjehura, gušterače i prostate (77).

Glikoproteinski receptor HER2 nalazi se na membrani stanica, a njegovu ekspresiju kodira protoonkogen *HER-2/neu* koji je lokaliziran na dugom kraku (q) kromosoma 17, pozicija 12 (17q12). Gen *HER-2/neu* je otkriven 1984. u tkivu neuroblastoma nadbubrežne žlijezde štakora (4). Povezanost amplifikacije ovog protoonkogenog s posljedičnom prekomjernom ekspresijom receptora HER2 otkrivena je 1987. kao negativni prognostički čimbenik u razvoju tumora s povećanom proliferacijom tumorskih stanica, smanjenom apoptozom, povećanom vaskularizacijom tumora, invazivnošću i sklonošću metastaziranju (7).

Ekspresija receptora HER2 na površini stanice se određuje iz uzorka tumorskog tkiva dvijema metodama: imunohistokemijski (IHC, Hercep Test) i hibridizacijom in situ (ISH). IHC koristi protutijelo za procjenu ekspresije receptora HER2 na membrani tumorske stanice, dok ISH određuje broj kopija gena *HER-2/neu* na kromosomu 17 pomoću DNA konjugata s jednim od sustava detekcije: fluorescentnim (FISH), kromogenim (CISH) ili sustavom detekcije sa srebrom (SISH). Podudarnost ove dvije metode je do 95%. (40). Određivanje se provodi prema revidiranim algoritmima iz 2013. Američkog društva za kliničku onkologiju (ASCO) i Kolegija američkih patologa (CAP) (43).

Budući da je amplifikacija gena *HER-2/neu* povezana s prekomjernom ekspresijom receptora HER2 analizirane su pojedini slijedovi gena te je otkriven polimorfizam gena na kodonu 655 za transmembransku kodirajuću regiju HER2. Ovaj polimorfizam kodira aminokiselinu izoleucin (Ile) u slučaju da nukleotid DNA sadrži triplet dušičnih baza adenin, timin i citozin (ATC) ili valin (Val) u slučaju da su dušične baze gvanin, timin i citozin (GTC) (46).

Meta analiza 27 kliničkih studija pokazala je povezanost polimorfizma [Ile655Val] *HER-2/neu* s povećanim rizikom od raka dojke (51). Rezultati in vitro studija pokazuju da navedeni polimorfizam može mijenjati funkciju gena *HER-2/neu* te kod prisustva Val alela postoji veća aktivnost kinaze proteina HER2 i veći potencijal proliferacije (53). Jedina do sada provedena klinička studija pokazala je da ispitanice s Val genotipom imaju dobit od liječenja trastuzumabom.

HER2 pozitivitet kod raka dojke predstavlja negativan prognostički čimbenik i povezan je s kraćim vremenom do povrata bolesti i kraćim preživljenjem (64).

Signalni putevi HER2 predstavljaju terapijski cilj u liječenju raka dojke primjenom monoklonskih protutijela za receptor HER2 (trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab emtazine ili TDM-1) ili inhibicijom nerekceptorskog dijela tirozinske kinaze malim molekulama kao što je lapatinib (98).

Prva randomizirana klinička istraživanja faze III ispitivala su učinkovitost trastuzumaba u prvoj liniji liječenja metastatskog HER2 pozitivnog raka dojke, objavljeno 2001. godine. U kombinaciji s paklitakselom, trastuzumab smanjuje rizik smrtnosti za 22,4%, a medijan ukupnog preživljenja iznosio je 25,4 mjeseca naspram na 20,3 mjeseca za sam paklitaksel (129). Istraživanje objavljeno 2005. pokazalo je još bolje rezultate za kombinaciju trastuzumaba s docetakselom s medijanom ukupnog preživljenja od 31,2 mjeseca (131).

Već nakon objave prvih pozitivnih rezultata istraživanja Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila je trastuzumab u liječenju metastatskog HER2 pozitivnog raka dojke.

Uslijedile su studije s trastuzumabom u adjuvantnom liječenju ranog raka dojke koje su uključile više od 13 000 ispitanica (134). Europska studija (HERA) pokazala je redukciju rizika povrata bolesti za 46% i rizika smrtnosti za 26% (134). Dvije Kanadsko američke studije pokazale su redukciju rizika povrata bolesti za 52% i rizika smrtnosti za 37% (134-137).

Trastuzumab, monoklonsko protutijelo za receptor HER2, je standard liječenja metastatskog i ranog HER2 pozitivnog raka dojke s izuzetnom kliničkom dobrobiti.

Najčešća nuspojava primjene trastuzumaba je razvoj kardiotsičnosti budući da je HER2 signalizacija važna u embrionalnom srčanom razvoju, dokazano na životinjskim modelima, te u srčanoj fiziologiji nakon završenog razvoja. U srcu receptor HER2 posreduje kao kofaktor u vezanju neuregulina (NRG-1) i receptora HER4 te dolazi do aktivacije unutarstaničnih signalnih puteva MAPK i PI3K te stanične proliferacije i kontraktilnosti. Neuregulin (NRG-1) je mikrovaskularni peptidni glasnik koji se sintetizira u endokardu i mikrovaskulaturi na podražaje mehaničkog naprezanja i endotelina-1 (112).

Mehanizam kardiotsičnosti nije u potpunosti razjašnjen ali je ova kardiotsičnost različita od antraciklinske i ne dovodi do nekroze kardiomiocita, nije ovisna o dozi i u visokom je postotku reverzibilna (59). Kardijalne nuspojave uključuju disfunkcije lijeve srčane klijetke s padom istisne frakcije (EFLV) i asimptomatskim ili simptomatskim srčanim zatajivanjem. Također može dovesti do abnormalnosti u provodnom sustavu s posljedičnim aritmijama kao i do akutnog koronarnog sindroma (59).

Liječenje protokolima koju su sadržavali kombinaciju trastuzumaba i antraciklina u 28% slučajeva izazvalo je kardiotsičnost te navedena kombinacija nije u standardnoj primjeni (136). U kliničkim studijama adjuvantnog liječenja, nakon 5-godišnjeg praćenja, pojavnost teškog srčanog zatajivanja funkcionalnog statusa NYHA III/IV bila je 0,4-3,8% (144). Potpuni ili djelomični oporavak kardijalne funkcije imalo je više od 80% ispitanica (145). Meta analize kardijalne toksičnosti tijekom jednogodišnje primjene trastuzumaba u adjuvantnom liječenju HER2 pozitivnog raka dojke pokazale su da primjena trastuzumaba povećava rizik simptomatskog srčanog zatajivanja za 4,5% naspram 1,8% bez trastuzumaba te da je vjerojatnost kardiotsičnosti 2,45 puta veća primjenom trastuzumaba (151).

Unatoč kardiotsičnosti trastuzumaba, ukupna stopa smrtnosti od HER2 pozitivnog raka dojke je 6% kod bolesnica liječenih trastuzumabom naspram 8,5% kod bolesnica koje nisu primale trastuzumab (152).

Postoji više rizičnih čimbenika u nastanku kardiotsičnosti od kardijalnih ( prisutna srčana bolest) do nekardijalnih kao što su prethodna primjena antraciklina, zračenje prsišta, životna dob, arterijska hipertenzija, šećerna bolest, debljina, dislipidemija (156,157).

Oprečni su rezultati objavljenih istraživanja o utjecaju polimorfizma gena *HER-2/neu* na pojavnost trastuzumabom izazvane kardiotsičnosti, a koji navode mogući utjecaj genotipa Val (GTC) kao čimbenika rizika za razvoj kardiotsičnost. Međutim, obzirom na potencijalno značajan biomarker za otkrivanje kardiotsičnosti, nameće se potreba novih studija.

Svrha ovog istraživanja je razmotriti čimbenike rizika u nastanku kardiotsičnosti uzrokovane trastuzumabom te uvidjeti specifičnosti srčanog zatajivanja kao i moguću reverzibilnost. Poznavanjem rizičnih čimbenika uz usvajanje algoritama praćenja i liječenja bolesnica sa srčanim zatajivanjem moguće je jasnije definirati omjer rizika i dobrobiti primjene ovog lijeka te smanjiti kardijalni morbiditet.

Da bi se procijenili čimbenici rizika za nastanak trastuzumabom uzrokovane kardiotsičnosti kao i značajke same kardiotsičnosti istraživanje je provedeno na ispitanicama s histološki potvrđenim HER2 pozitivnim ranim rakom dojke liječenih trastuzumabom prema standardima jednogodišnjeg adjuvantnog liječenja.

U istraživanje su uključene ispitanice adjuvantno liječene trastuzumabom u Klinici za tumore i Klinici za nuklearnu medicine KBC “Sestre milosrdnice” u period od 2007.-2016. godine.

Dosadašnja tri istraživanja, koja su imala primarni cilj utvrditi utjecaj polimorfizma gena *HER-2/neu* na razvoj kardiotsičnosti tijekom primjene trastuzumaba, imala su u skupini ispitanica s razvijenom kardiotsičnosti najviše 78 ispitanica (55,56), a što je jednako kao i u ovom istraživanju. Bez razvijene kardiotsičnosti, slučajnim odabirom bolesnica koje su liječene trastuzumabom , bilo je 99 ispitanica. Dobiveni su anamnestički i medicinski podaci o prisustvu kardijalnog komorbiditeta, primjenjenim kemoterapijskim protokolima i zračenju kao mogućim čimbenicima rizika.

Prosječna životna dob ispitanica je bila  $59.4 \pm 10.7$  godina, u grupi A  $58.2 \pm 11.4$ , a u grupi B  $60.9 \pm 9.7$  godina ( $p=0.095$ ). Prosječan indeks tjelesne mase (BMI) bio je u grupi A  $27.2 \pm 4.7$ , a u grupi B  $26.4 \pm 4.3$  ( $p=0.340$ ).

Prema rezultatima, naše ispitanice bile su povećane tjelesne mase u obje grupe, što može biti povezano s smanjenom fizičkom aktivnošću i dobivanjem na tjelesnoj masi od 2,5-6 kg tijekom adjuvantnog liječenja raka dojke (157). Niti životna dob kao ni BMI nisu statistički značajno utjecali na pojavnost kardiotoksičnosti u odnosu na podatke nekih od ranijih istraživanja (154,155).

Ispitanice koje su razvile kardiotoksičnost češće su imale tumor u lijevoj dojci (60,3%) dok je tumor u desnoj dojci bio prisutan kod 39,7% ispitanica, a što predstavlja statističku značajnost kao nezavisna varijabla u razvoju kardiotoksičnosti ( $p=0.002$ ). U ranijim multivarijantnim istraživanjima tumor lijeve dojke se pokazao kao značajan čimbenik rizika (59). Navedeno može biti barem djelomično uvjetovano zračenjem (radioterapijom) lijevog prsišta i sredoprsja, a za što su dosadašnja istraživanja u velikom dijelu pokazala povezanost, iako ima i oprečnih rezultata.

U ovom istraživanju od 65 ispitanica koje su razvile kardiotoksičnost i kod kojih je provedeno zračenje prsišta, njih 27 (41,53%) imalo je tumor u desnoj dojci dok je 38 (58,46%) imalo tumor u lijevoj dojci. Međutim, 13 (69,2%) ispitanica s primarnim tumorom lijeve dojke razvilo je kardiotoksičnost, a nije zračeno. Zračenje lijevog prsišta kao nezavisna varijabla nije bila povezana s pojavom kardiotoksičnosti iako su ispitanice s tumorom lijeve dojke češće razvile kardiotoksičnost. Ostaje otvoreno pitanje povećane kardiotoksičnosti kod tumora lijeve dojke i mogućeg utjecaja drugih, za sada nepoznatih čimbenika za ovu povezanost, te multifaktorijalne uvjetovanosti.

Podaci o utjecaju zračenja lijevog prsišta i pojave kardiotoksičnosti su proturiječni (157). Istraživanje provedeno u MD Anderson centru, utjecaja zračenja lijevog prsišta i pojave kardiotoksičnosti, pokazalo je povezanost ove dvije varijable dok je multivarijantna analiza isključila tu povezanost (159). Subanaliza u N9831 studiji adjuvantne primjene trastuzumaba pokazala je čak veću pojavnost kardijalnih događaja u ispitanica kod kojih nije provedeno zračenje lijevog prsišta 2,9% naspram 2,2% kod kojih je provedeno zračenje (161).

Obzirom na karakteristike primarnog tumora, kao što su stupanj diferenciranosti (gradus) i TNM klasifikacija nije nađena korelacija s pojavom kardiotoksičnosti osim za ekstenzivniju zahvaćenost limfnih čvorova.

Distribucija s obzirom na veličinu tumora bila je slijedeća: T1 tumor do 2 cm imalo je 46,32% ispitanica dok je T2 tumor veličine 2-5 cm imalo 46,89% ispitanica. Hormonski senzitivnih tumora bilo je 62,7% . Nije nađena povezanost veličine tumora, hormonske osjetljivosti i pojave kardiotoksičnosti. Navedeni rezultati komparabilni su s ranijim istraživanjima (134-137).

Zahvaćenost pazušnih limfnih čvorova tumorom, N3 status ( zahvaćenost istostranih limfnih čvorova unutar dojke ) bilo je povezano s pojavom kardiotoksičnosti. Ispitanice s N3 statusom u grupi kardiotoksičnosti bile su zastupljene s 1%, dok ih je u grupi bez kardiotoksičnosti bilo 11.5% ( $p=0.018$ ). Navedeni podaci su komparabilni s ranijem istraživanjem na manjem uzorku od 130 ispitanica (59). Mogući utjecaj na ovaj rezultat može imati površina ( polje) i doza zračenja kod ovakve ekstenzivnije zahvaćenosti limfnih čvorova.

Izloženost srca kemoterapijskom liječenju, posebice antraciklinima doksorubicinu i epirubicinu, dovodi do oksidativnog stresa i predstavlja čimbenik rizika za trastuzumabom izazvanu kardiotoksičnost (145,154,155).

U ovom istraživanju ispitanice su najčešće (89,8%), prije primjene trastuzumaba, primale protokole bazirane na antraciklinima (doksorubicin, epirubicin) bilo šest ili četiri ciklusa u trotjednim intervalima.

Šest ciklusa antraciklina, kemoterapijske protokole AC (doksorubicin+ciklofosfamid), EC (epirubicin+ ciklofosfamid), FEC (fluorouracil +epirubicin+ ciklofosfamid ) i FAC (fluorouracil + doksorubicin+ciklofosfamid) primilo je 112 ispitanica (70,44%).

Četiri ciklusa antaciklina primilo je ukupno 29,56% ispitanica, od toga kombinacijske protokole s paklitakselom primilo je 85,10% ispitanica dok je 14,90% ispitanica primilo četiri antraciklinska (ACx4) protokola bez paklitaksela.

Kombinacijske protokole AC i paklitaksel primilo je 40 ispitanica, od toga ACx4 + Px4 (doksorubicin+ciklofosfamid x4 + paklitaksel x4 u trotjednim intervalima) je primilo 12 ispitanica i ACx4 +PH (doksorubicin+ciklofosfamid x4+ 12 tjednih ciklusa paklitaksela konkurentno s trastuzumabom u trotjednim aplikacijama) je primilo 28 ispitanica.

Neantraciklinske protokole: endokrina terapija i trastuzumab, paklitaksel i trastuzumab, CMF (ciklofosfamid+metotreksat+fluorouracil) i TCH (docetaksel+ karboplatin + trastuzumab) primilo je 10,17% ispitanica.

Kardiotoksičnost se razvila u 45,3% (72/159) ispitanica koje su liječene antraciklinima i u 33,3% (6/18) ispitanica koje nisu liječene antraciklinima; navedena razlika nije dosegla statističku značajnost ( $p=0.333$ ) iako je postojao trend veće učestalosti kardiotoksičnosti kod primjene antraciklina što je u skladu s ranijim istraživanjima (59,145,153,154).

Kardiotoksičnost je zabilježena u 55% (22/40) ispitanica koje su dobile 4 ciklusa kemoterapije antraciklinima i u 44,6% (50/112) ispitanica koje su dobile 6 ciklusa antraciklinske kemoterapije, navedena razlika nije dosegla statističku značajnost ( $p = 0.269$ ). Razlog veće učestalosti kardiotoksičnosti kod primjene 4 ciklusa antraciklina naspram 6 ciklusa vjerojatno je u činjenici da se kod 4 ciklusa radilo o kombinacijskim protokolima trastuzumaba s paklitakselom, a takva kombinacija dovodi do kardiotoksičnosti češće (11%) nego sam trastuzumab (7%) ili sam paklitaksel (1%) (153). Mogući razlog je i kraće vrijeme od izlaganja antraciklinima do prve aplikacije trastuzumaba, a što je poznati čimbenik rizika (153).

U kombinacijskim protokolima antraciklina i paklitaksela kardiotoksičnost je zabilježena u 60,7% (17/28) ispitanica u skupini ACx4+PH te u 41,7% (5/12) ispitanica u ACx4+ Px4 skupini. Navedeno je sukladno saznanju da kombinacija paklitaksela i trastuzumaba češće dovodi do kardiotoksičnosti naspram samog trastuzumaba. U kombinacijskim protokolima antraciklina AC (doksorubicin+ciklofosfamid) četiri ciklusa te u nastavku paklitaksel (P) četiri ciklusa u trotjednom intervalu (ACx4+Px4) i AC četiri ciklusa te u nastavku 12 ciklusa paklitaksela u tjednim intervalima konkurentno s trastuzumabom (PH) koji se primjenjivao svaka tri tjedna (ACx4+PH) nije bilo statistički značajne razlike u kardiotoksičnosti iako su ispitanice koje su primile protokol ACx4+PH češće razvile kardiotoksičnost. Zbog malog uzorka navedena razlika nije dosegla statističku značajnost ( $p=0.170$ ).



Navedeno je u skladu s ranijim istraživanjima veće učestalosti kardiotoksičnosti u protokolima gdje je trastuzumab primjenjivan istovremeno s paklitakselom. U Kanadsko- američkim studijama adjuvantnog liječenja istovremene primjene trastuzumaba i paklitaksela, NSABP B-31 i NCCTG N9831, pojavnost teškog srčanog zatajivanja NYHA III/IV , nakon 5-godišnjeg praćenja, iznosila je 3,8% (127,137,138) dok je u HERA studiji koja nije imala istovremenu primjenu trastuzumaba i paklitaksela iznosila 0,4% (137).

Genotip *HER-2/neu* u svih 177 ispitanica bio je zastupljen u slijedećoj distribuciji: A/A (Ile/Ile) u 111 ispitanica (62,7%), A/G (Ile/Val) u 60 ispitanica (33,9%) i G/G (Val/Val) u 6 ispitanica (3,4%). Distribucija genotipa *HER-2/neu* komparabilna je s ranijim izvješćima u velikom broju bijelaca (53). Beauclar i suradnici u svom istraživanju našli su sljedeću distribuciju genotipa: Ile/Ile 59%, Ile/Val 34,4% te Val/Val 6,6% (53), a što značajno ne odstupa od distribucije u ovom istraživanju.

Obzirom na distribuciju genotipa *HER-2/neu* u grupi (A) bez kardiotoksičnosti genotip A/A (Ile/Ile) bio je prisutan kod 63 ispitanice (63,6%), a u grupi (B) sa prisutnom kardiotoksičnošću kod 48 ispitanica (61,5%). Genotip A/G (Ile/Val) u grupi (A) bio je kod 33 ispitanice (33,3%), a u grupi (B) kod 27 ispitanica (34,6%). Genotip G/G ( Val/Val) u grupi A bio je zastupljen kod 3 ispitanice (3,0%) i u grupi (B) kod 3 ispitanice (3,8%). Nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji genotipa *HER-2/neu* pojave kardiotoksičnosti ( $p=0.934$ ).

Do sada su publicirana tri istraživanja utjecaja genotipa *HER-2/neu* i kardiotoksičnosti. Beauclair i suradnici u istraživanju 5 bolesnica s razvijenom kardiotoksičnošću našli su dominaciju genotipa Val kod kardiotoksičnosti, naime sve bolesnice su bile genotipa Ile/Val (53). U istraživanju objavljenom 2013. godine, u 40 ispitanica s kardiotoksičnošću uzrokovanom trastuzumabom, nije nađena razlika u distribuciji genotipa obzirom na razvoj kardiotoksičnosti ( $p=0.91$ ) (54). Treće, posljednje istraživanje objavljeno 2015. godine na 78 ispitanica liječenih trastuzumabom navodi signifikantnu povezanost Ile655Val genotipa s pojavom kardiotoksičnosti, AG (Ile/Val) prema AA (Ile/Ile)  $p= 0.012$  (55, 56). Kao što je razvidno, rezultati navedenih istraživanja o utjecaju genotipa *HER-2/neu* na pojavnost kardiotoksičnosti bili su dvojbeni, a najveća grupa ispitanica s kardiotoksičnošću bila je jednaka grupi u ovom istraživanju.

Ovim istraživanjem su praćeni parametri srčane sistoličke (pumpne) i dijastoličke (usisne) funkcije, biljeg srčanog oštećenja NT-proBNP kao i kardiovaskularni čimbenici rizika za nastanak kardiotoxičnosti.

Početna istisna frakcija lijevog ventrikla (EFLV) u grupi A iznosila je  $64.1 \pm 4.3$ , a u grupi B  $63.3 \pm 4.4$ . Tijekom liječenja trastuzumabom došlo je do smanjenja istisne frakcije na najnižu vrijednost u grupi A  $60.9 \pm 3.7\%$  dok je u grupi B najniža vrijednost bila  $44.0 \pm 9.2\%$  ( $p < 0.001$ ). Završna vrijednost EFLV, nakon završene terapije trastuzumabom u grupi A bila je  $62.1 \pm 3.7\%$ , a u grupi B nakon srčanog oporavka  $53.7 \pm 7.6\%$  ( $p < 0.001$ ). Ispitanice koje su razvile kardiotoxičnosti imale su značajno veći pad EFLV. Navedeni rezultati dinamike EFLV komparabilni su s rezultatima kliničkih studija (126,127).

Prije liječenja trastuzumabom nije bilo statističke značajne razlike u dijastoličkoj disfunkciji između grupa A i B ( $p = 0.646$ ). Postojala je statistički značajna promjena dijastoličke funkcije lijevog ventrikla tijekom terapije trastuzumabom ( $p < 0.001$ ). U grupi A disfunkcija 1. stupnja bila je prisutna kod 5,1%, a u grupi B kod 43,6% ispitanica. Disfunkciju 2. stupnja u grupi A bila je kod 2,0%, a u grupi B kod 14,1% ispitanica. Navedeni rezultati komparabilni su s literaturnim podacima (126,127). Nije nađena razlika u promjeni dijastoličke funkcije obzirom na *HER-2/neu* genotip. Takva istraživanja do sada nisu objavljena.

Za ranu stratifikaciju bolesnika s rizikom od srčane disfunkcije nakon primjene kemoterapije u više studija korišteno je mjerenje natrijuretskog peptida. Najčešće korišteni i najosjetljivi biljeg je N-terminalni dio moždanog natrijuretskog peptida, NT-proBNP, rani je biljeg srčane disfunkcije, otpuštaju ga srčane stanice, a vrijednost je viša kod težih oblika srčane disfunkcije (59).

Vrijednost srčanog biomarkera NT-proBNP-a u grupi A nakon završenog liječenja trastuzumabom bila je  $45.6 \pm 44.4$  pg/ml, dok je u grupi B nakon postizanja srčanog oporavka bila  $155.7 \pm 180.5$  pg/ml ( $p < 0.001$ ). Korištenje NT-proBNP-a kao biljega u otkrivanju srčane disfunkcije nije usvojeno u rutinskom nadzoru trastuzumabom izazvane kardiotoxičnosti (185). Navedeni rezultat istraživanja ukazuje da ovaj biomarker može pomoći u otkrivanju i praćenju oporavka srčane funkcije.

Od kardiovaskularnih čimbenika rizika arterijska hipertenzija bila je prisutna kod 94 ispitanice (53,11%), od toga u grupi A kod 48 ispitanica (48,5%) i u grupi B kod 46 ispitanica (59,0%). Inače se arterijska hipertenzija smatra čimbenikom rizika za kardiotoksičnost (181,182), u ovom istraživanju ispitanice s kardiotoksičnošću imale su češće arterijsku hipertenziju ali bez statističke značajnosti ( $p=0.165$ ).

Prevalencija šećerne bolesti (dijabetesa) u grupi A bila je 5,1% naspram grupe B 10,3% ali nije dosegla statističku značajnost ( $p=0.187$ ). Isto se odnosi na dislipidemiju koja je u grupi A bila zastupljena sa 20,2% dok u grupi B sa 29,5% ( $p=0.153$ ). U ranijim istraživanjima ovi čimbenici predstavljaju rizik za razvoj kardiotoksičnosti (181).

Pozitivnu obiteljsku anamnezu kardiovaskularne bolesti imalo je 51 ispitanica (28,81%), u grupi A bilo ih je 20 (20,2%) dok je u grupi B 31 ispitanica (39,7%) imala pozitivnu obiteljsku anamnezu ( $p=0.004$ ). Obiteljska anamneza kardiovaskularne bolesti i nagle smrti od ranije je poznati čimbenik rizika za razvoj kardiotoksičnosti trastuzumaba, a to je potvrdilo i ovo istraživanje (59,182).

Distribucija genotipa *HER-2/neu* A/A (Ile/Ile), A/G (Ile/Val) i G/G (Val/Val) nije imala statističku značajnost obzirom na dob ispitanica ( $p=0.590$ ). Ispitanice s genotipom G/G (Val/Val) su imale statistički značajno veći indeks tjelesne mase (BMI) ( $p=0.049$ ) te je nađen trend veće prevalencije arterijske hipertenzije i pozitivne obiteljske anamneze kardiovaskularne bolesti, iako navedene razlike nisu dosegle statističku značajnost.

Obzirom na genotip *HER-2/neu* nisu nađene statistički značajnije razlike u ispitivanim varijablama: gradus tumora, veličina tumora, zahvaćenosti limfnih čvorova i hormonalnom status. Istraživanja u ovom smislu do sada nisu objavljena.

Ekspresija receptora HER2 je ovisna o amplifikaciji gena *HER-2/neu* te je postojala pretpostavka o mogućoj ovisnosti intenziteta ekspresije receptora HER2 (HER2 3+ naspram HER2 2+). Istraživanjem je utvrđeno da je ekspresija receptora HER2 na membrani tumorske stanice izražena imunohistokemijski (IHC) kao 3+ bila zastupljena kod 94 ispitanice (84,7%) s genotipom A/A, 52 ispitanice (86,7%) imalo je genotip A/G, a 5 ispitanica (83,3%) imalo je genotip G/G.

Ekspresiju 2+ potvrđenu hibridizacijom in situ (ISH) kao pozitivnom imalo je 17 (15,3%) ispitanica genotipa A/A, 8 (13,3%) ispitanica genotipa A/G te 1 (16,7%) ispitanica genotipa G/G. Nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji receptora HER2 na tumorskoj stanici u odnosu na genotip *HER-2/neu* što indirektno znači da na osnovu intenziteta ekspresije samog receptora HER2 (HER2 3+ ili HER2 2+) nije moguće predvidjeti genski profil *HER-2/neu*. Istraživanja intenziteta ekspresije receptora HER2 obzirom na genotip *HER-2/neu* do sada nisu objavljena.

Ispitanice s genotipom G/G imale su nešto veći pad EFLV tijekom terapije trastuzumabom ( $47.5 \pm 13.7$ ) ali bez statističke značajnosti ( $p=0.323$ ). Nije nađeno značajnije razlike u dijastoličkoj disfunkciji, vrijednosti NT-pro BNP-a, hipertenziji, dijabetesu, dislipidemiji, funkcionalnom NYHA status srčanog zatajivanja, vremenu do pojave kardiotoksičnosti, reverzibilnosti i vremenu oporavka obzirom na genotip *HER-2/neu*.

U grupi B bilo je 78 ispitanica u kojih je došlo do kardiotoksičnosti tijekom terapije trastuzumabom. Kod 48 ispitanica (61,5%) kardiotoksičnost je bila simptomatska s kongestivnim srčanim zatajivanjem (KSZ) i najzastupljenijim simptomima palpitacija (59,0%) i zaduhe (42,3%). Teški oblik srčanog zatajivanja NYHA III/IV imalo je 12 (15,4%) ispitanica, što je više u odnosu na ranija klinička istraživanja kada je teški oblik zatajivanja bio zastupljen do najviše 4,1% (138). Navedeno odstupanje moguće je objasniti kasnim uočavanjem simptoma zatajivanja, nepoštivanjem vremenskih smjernica ehokardiografskog praćenja ili kasnijim odazivom liječniku.

Za razliku od antraciklinske kardiotoksičnosti ova kardiotoksičnost je u visokom postotku (oko 80%) reverzibilna (145). U ovom istraživanju reverzibilnu kardiotoksičnost imalo je 65 (83,3%) ispitanica, a nakon što je postignut adekvatan oporavak srčane funkcije, terapija trastuzumabom je ponovno nastavljena kod 48 (73,8%) ispitanica. Navedeni rezultati u skladu su s ranijim istraživanjima (145,146).

Poštujući algoritme praćenja srčane funkcije i uz kardijalnu terapiju, ispitanice koje su ponovno nastavile liječenje trastuzumabom u 83,3% slučajeva su predviđeno liječenje u potpunosti završile, bez pogoršanja kardijalne funkcije i potrebe za trajnim prekidom terapije trastuzumabom. Od ispitanica koje su ponovljeno liječene trastuzumabom njih 8 (16,7%) nije završilo planirano liječenje zbog ponovnog razvoja srčane disfunkcije te je, sljedeći preporuke, kod njih trajno prekinuto liječenje trastuzumabom.

Ovako visok postotak ponovljenog liječenja trastuzumabom, odnosno nastavka liječenja nakon kardiotsičnosti, rezultat je adekvatnog probira ispitanica za nastavak liječenja, pomnog nadzora te primjenjene terapije za srčano zatajivanje.

Liječenje trastuzumabom izazvane kardiotsičnosti ne razlikuje se od općeg terapijskog pristupa bolesnicima sa zatajivanjem srca, što je i navedeno u smjernicama za zatajivanje srca Američkog kardiološkog društva (59). Potrebna je polifarmacija za optimalno poboljšanje funkcije srca u bolesnika sa sistoličkom disfunkcijom lijeve klijetke. U pravilu, ako se ehokardiografski utvrdi smanjenje sistoličke funkcije, a bolesnik nije hipotenzivan, liječenje treba započeti inhibitorima angiotenzinskog pretvorbenog enzima (ACEi) i  $\beta$ -adrenergičkim blokatorima. Terapiju diureticima treba započeti ukoliko postoje znakovi kongestije da bi se ponovno uspostavio i održavao normalni volumni status. Preporučeno je nakon inhibitora angiotenzinskog pretvorbenog enzima u simptomatskih bolesnika uvesti i blokatore angiotenzinskih receptora (ATII) što će pružiti dodatnu blokadu renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava. Postojane ili rekurentne srčane aritmije treba tretirati s odgovarajućim antiaritmicima te liječiti moguće predisponirajuće čimbenike, uključujući sepsu i elektrolitske poremećaje. (59)

U ovom istraživanju, u liječenju srčanog zatajivanja, kod 61 ispitanice (81,3%) primjenjen je blokator  $\beta$ -adrenergičkih receptora, zatim diuretik 58 (77,3%) i inhibitor angiotenzin pretvorbenog enzima (ACEi) kod 58 (77,3%) ispitanica.

Navedena terapija je u skladu s preporukama liječenja srčanog zatajivanja. Relativno visoki postotak primjene diuretika (77,3%) objašnjava se visokim postotkom fiksnih kombinacija ACE inhibitora i diuretika prvenstveno hidroklorotiazida, koji predstavlja više od 50% svih diuretika.

Relativno je mali postotak ispitanica liječen blokatorima angiotenzinskih receptora ATII (9,3%) što je prvenstveno uzrokovano legislativom jer se ograničenjima Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje blokatori angiotenzinskih receptora mogu uvoditi isključivo kod nepodnošenja ACEi. Postotak bolesnika liječenih glikozidom digitalisa (12%), spirinolaktonom (6.7%) i antiaritmikima (2.7%) je u skladu sa smjernicama.

Teški oblik srčane disfunkcije NYHA III/IV imalo je 12 (15,9%) ispitanica, a hospitalizirano je 9 (11,5%) s obzirom na težinu srčanog zatajivanja.

Vrijeme do razvoja kardiotoksičnosti bilo je prosječno  $4.9 \pm 2.6$  mjeseca, dok je vrijeme oporavka srčane funkcije bilo prosječno  $46.0 \pm 36.1$  dana. Nakon medijana od 4.0 (3.5 - 4.5) mjeseca, 50% ispitanica razvilo je kardiotoksičnost.

Potpuno je razumljivo da se EFLV značajno promijenila u svih ispitanica koje su razvile kardiotoksičnost ( $F = 14.95$ ,  $p < 0.001$ ), no ispitanice u kojih je došlo do oporavka srčane funkcije su imale značajno veću najnižu vrijednost EFLV, odnosno značajno manji pad EFLV ( $F = 24.34$ ,  $p < 0.001$ ). Dodatno, što je najniža EFLV bila veća, odnosno, što je pad EFLV bio manji, to je i oporavak srčane funkcije bio kraći ( $\rho = -0.761$ ,  $p < 0.001$ ). Ispitanice kod kojih je ranije prepoznata srčana disfunkcija imale su manji pad EFLV, kraći oporavak, najčešće su imale reverzibilnu disfunkciju te su ponovno nastavile liječenje trastuzumabom. Navedeno potvrđuje potrebu i opravdanost u potpunosti slijediti zadane algoritme praćenja kardijalne funkcije. Dobiti BMI nisu utjecali na oporavak srčane funkcije.

Budući da se najčešće radi o reverzibilnoj kardiotoksičnosti, nakon nekoliko tjedana ili mjeseci postupno dolazi do oporavka srčane funkcije (146). Prosječno vrijeme oporavka, u ranijim istraživanjima, najčešće je iznosilo oko 30 dana (59). U ovom istraživanju nakon medijana od 35.0 (29.2 - 40.8) dana, u 50% ispitanica došlo je do oporavka kardiotoksičnosti. U 16,3% ispitanica nije došlo do oporavka srčane funkcije niti nakon 100 dana, a što se odnosilo na ispitanice s teškim oblicima srčanog zatajivanja NYHA III/IV i potrebom za hospitalizacijom.

Najsnažniji prognostički čimbenici oporavka srčane funkcije bili su NYHA funkcionalni kardijalni status, prisustvo aritmije, činjenica da li je ispitanica bila hospitalizirana zbog kardiotoksičnosti te liječenje digitalisom.

NYHA status je bio snažno povezan s oporavkom srčane funkcije. U svih ispitanica s NYHA I statusom došlo je do oporavka srčane funkcije (100%), što nam ukazuje na važnost anamnestičkog i kliničkog ranog prepoznavanja disfunkcije te važnost adekvatnog kardijalnog praćenja EFLV. U NYHA II skupini 84,6% (22/26) ispitanica postiglo je oporavak kardijalne funkcije, no u samo 25% (3/12) ispitanica u NYHA III /IV skupini ( $p < 0.001$ ).

Prisustvo aritmija je također bilo negativno povezano s oporavkom srčane funkcije. Terapija glikozidom digitalisa kao i hospitalizacija povezani su s lošijim oporavkom srčane funkcije. Navedeno proizlazi iz činjenice da su hospitalizirane i liječene digitalisom ispitanice s najtežim stadijem srčanog zatajivanja (NYHA III/IV) te da je provedeno liječenje u skladu s usvojenim preporukama.

Postojala je značajna razlika u oboravku i brzini oporavka ovisno o činjenici da li je nastavljena terapija trastuzumabom. Ispitanice u kojih je došlo do oporavka srčane funkcije, češće su nastavile terapiju trastuzumabom, a što je u potpunosti razumljivo.

Veličina smanjenja EFLV tijekom terapije trastuzumabom, odnosno najniža vrijednost EFLV bila je povezana s oporavkom srčane funkcije (AUC 0.912, 95% CI 0.833 - 0.992,  $p < 0.001$ ). Što je bila teža srčana disfunkcija, odnosno veći pad EFLV to je oporavak srčane funkcije bio duži i nije bio u potpunosti reverzibilan. U slučaju da je najniža EFLV tijekom terapije trastuzumabom bila  $> 35.5\%$  imala je osjetljivost od 93,8% i specifičnost 84,6% u predikciji oporavka srčane funkcije. U dosadašnjim istraživanjima nije zabilježena prediktivna vrijednosti EFLV za oporavak srčane funkcije.

## 6. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem kardiotoksičnosti u adjuvantnom liječenju trastuzumabom došli smo do slijedećih zaključaka:

- 1) Rizični čimbenici za razvoj kardiotoksičnosti kao što su dob, indeks tjelesne mase i zračenje lijevog prsišta nisu statistički značajno utjecali na pojavnost kardiotoksičnosti.
- 2) Lokalizacija tumora u lijevoj dojci, kao nezavisna varijabila, čimbenik je rizika za razvoj kardiotoksičnosti, a isto se odnosi i na zahvaćenost limfnih čvorova s N3 statusom.
- 3) Kardiovaskularni čimbenici rizika (arterijska hipertenzija, šećerna bolest i dislipidemija) češće su zastupljeni kod kardiotoksičnosti ali bez statističke značajnosti.
- 4) Pozitivna obiteljska anamneza kardiovaskularne bolesti čimbenik je rizika za razvoj kardiotoksičnosti.
- 5) Kod primjene antraciklinskih kemoterapijskih protokola, prije terapije trastuzumabom, postoji trend veće učestalosti kardiotoksičnosti naspram neantraciklinskih protokola, a jednako tako kombinacijski protokol s paklitakselom u tjednoj aplikaciji konkurentno s trastuzumabom u trodnevnoj aplikaciji ima trend veće pojavnosti kardiotoksičnosti naspram primjene paklitaksela u trodnevnom interval bez istovremene primjene trastuzumaba.
- 6) Distribucija genotipa *HER-2/neu* u ispitivanoj populaciji u potpunosti je komparabilna s ranijim izvješćima u velikom broju bijelaca: A/A (Ile/Ile) 62,7%, A/G (Ile/Val) 33,9% i G/G (Val/Val) 3,4%.
- 7) Polimorfizam gena *HER-2/neu* nema utjecaja na pojavnost kardiotoksičnosti. Isto tako, distribucija genotipa *HER-2/neu* nije se razlikovala obzirom na dob ispitanica, karakteristike tumora, kardiovaskularne čimbenike rizika (arterijska hipertenzija, šećerna bolest i dislipidemija), dijastoličku disfunkciju lijevog ventrikla, NYHA funkcionalni status srčanog zatajivanja te reverzibilnost i vrijeme oporavka srčane funkcije.



- 8) Genotip *HER-2/neu* nije bio u korelaciji s ekspresijom receptora HER2 na površini tumorske stanice potvrđeno imunohistokemijski kao HER2 3+ ili HER2 2+.
- 9) Tijekom terapije trastuzumabom došlo je do pogoršanja dijastoličke funkcije lijeve klijetke s dominacijom tipa I i II disfunkcije, neovisno o genotipu *HER-2/neu*.
- 10) Vrijednost srčanog biomarkera NT-proBNP-a bila je značajno viša kod ispitanica s razvijenom kardiotsičnošću te može biti biljeg otkrivanja kardijalne disfunkcije i praćenja oporavka.
- 11) Kardiotsičnost trastuzumaba bila je simptomatska kod 61,5% ispitanica s najčešćim simptomima palpitacije i zaduhe, a teški oblik srčane disfunkcije (NYHA III/IV) imalo je 15,4% ispitanica te su one najčešće i hospitalno liječene.
- 12) Kardiotsičnost je u visokom postotku reverzibilna (83,3%) i moguć je ponovni nastavak terapije trastuzumabom nakon oporavka srčane funkcije.
- 13) Liječenje trastuzumabom uzrokovane kardiotsičnosti ne razlikuje se od standardnog liječenja srčanog zatajivanja, inhibitorima angiotenzin pretvorbenog enzima (ACEi), blokatorima  $\beta$ -adrenergičkih receptora, diureticima.
- 14) Prosječno vrijeme do razvoja kardiotsičnosti iznosilo je  $4.9 \pm 2.6$  mjeseci. U 50% ispitanica koje su razvile kardiotsičnost, bilo je to nakon medijana od 4 mjeseca.
- 15) Veličina smanjenja EFLV povezana je s vremenom oporavka, reverzibilnošću i mogućim nastavkom liječenja trastuzumabom. U slučaju manjeg smanjenja EFLV kraće je vrijeme oporavka, kardiotsičnost je najčešće reverzibilna i velika je mogućnost nastavka liječenja trastuzumabom nakon privremenog prekida.
- 16) Nakon medijana od 35 dana 50% ispitanica imalo je oporavak srčane funkcije, a najvažniji prognostički čimbenik oporavka je težina srčanog zatajivanja, odnosno funkcionalni NYHA status te potreba za hospitalizacijom i prisustvo aritmija.

17) U predilekciji oporavka srčane funkcije smanjenje EFLV tijekom terapije trastuzumabom na vrijednost  $EFLV > 35,5\%$  ima visoku senzitivnost i specifičnost. Ako je došlo do većeg smanjenja EFLV, odnosno vrijednosti nižih od 35,5%, vjerojatnost oporavka je značajno manja.

Zaključno, polimorfizam gena *HER-2/neu* nema utjecaja na kardiotsičnost uzrokovanu trastuzumabom, što znači da nije potrebno određivati status gena *HER-2/neu* kao prognostičkog čimbenika za kardiotsičnost nego treba pratiti druge potencijalne čimbenike rizika, slijediti već usvojene smjernice praćenja tijekom liječenja trastuzumabom kako bi se smanjila, na vrijeme prepoznala i liječila kardiotsičnost.

## 7. LITERATURA

1. Schechter AL, Hung ML, Vaidyanathan L i sur. (1985) The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. Science. Vol. 229, Issue 4717, pp. 976-978.
2. Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Carney WP (1994) The c-erb B-2 protein in oncogenesis: molecular structure to molecular epidemiology. Crit Rev Oncog. 5: 313–329.
3. Ross JS, Fletcher JA( 1999) HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. Am J Clin Pathol 112: S53–S67.
4. ERBB2-erb-b2 receptor tyrosine kinase 2-Genetics  
Home References. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ERBB2>
5. Gene - GeneCards | ERBB2 Protein | ERBB2 Antibody. [www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERBB2](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERBB2)
6. Jeffrey S. Ross, Elzbeta A, Sladkowska i sur. (2002) The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Target Anti HER-2 Therapy and Personalized Medicine. The Oncologist 14:320-368 Mod Pathol 2002;15(2):116–124.
7. Ruliang Xu, Perle M A( 2002) Amplification of Her-2/neu Gene in Her-2/neu-Overexpressing and -Nonexpressing Breast Carcinomas and Their Synchronous Benign, Premalignant, and Metastatic Lesions Detected by FISH in Archival Material. Mod Pathol 15(2):116–124.
8. Slamon DJ i sur. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science. 244: 707-712.
9. Slamon DJ i sur. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 235: 177-182.
10. Van de Vijver M, Peterse JL, Mooi WJ i sur. ( 1988) Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. N Engl J Med. 319: 1239-1245.

11. Atsuka Matsui, Tatsuya I, Hiraku Suda, Hirofumi Mikami and Kentaro Semba (2013) Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer. *BioMol Concepts* 4(6): 567–582.
12. Alt FW, Kellems RE, Bertino JR, Schimke RT. (1978) Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J Biol Chem* 253: 1357–70.
13. Michael Marotta (2012) A common copy-number breakpoint of ERBB2 amplification in breast cancer colocalizes with a complex block of segmental duplications. *Breast cancer research: BCR* 14(6):R150.
14. Klein G, Klein E. (1986) Conditioned tumorigenicity of activated oncogenes. *Cancer Res* 46: 3211–24.
15. Pall ML (1981) Gene-amplification model of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2465–8.
16. Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW (2003) Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34: 369–76.
17. Schwab M, Amler LC (1990) Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1: 181–93.
18. Heiskanen MA, Bittner ML, Chen Y, Khan J, Adler KE, Trent JM, Meltzer PS (2000) Detection of gene amplification by genomic hybridization to cDNA microarrays. *Cancer Res* 60: 799–802.
19. Inazawa J, Inoue J, Imoto I (2004) Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci* 95: 559–63.
20. Mano MS, Rosa DD, De Azambuja E, Ismael GFV, Durbecq V (2007) The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-II $\alpha$  and their importance to the biology of solid tumours. *Cancer Treat Rev* 33: 64–77.

21. Paroni G, Fratelli M i sur. (2012) Synergistic antitumor activity of lapatinib and retinoids on a novel subtype of breast cancer with coamplification of ERBB2 and RARA. *Oncogene* 31: 3431–43.
22. Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS (2010) A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 10: 59–64.
23. A. Matsui i sur. (2005) Gene amplification and cancer lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436: 117–22.
24. Levy C, Khaled M, Fisher DE (2006) MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12: 406–14.
25. Granter SR, Weilbaecher KN, Quigley C, Fletcher CD, Fisher DE (2001) Microphthalmia transcription factor: not a sensitive or specific marker for the diagnosis of desmoplastic melanoma and spindle cell (non-desmoplastic) melanoma. *Am J Dermatopathol* 23: 185.
26. Aline Appert-Collin, Pierre Hubert, Gérard Crémel and Amar Bennisroune (2015) Role of erbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Front. Pharmacol.* | <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2015.00283>
27. Malorye Allison (2008) Is personalized medicine finally arriving? *Nature Biotechnology* 26, 509 – 517.
28. Scaltriti M, Baselga J (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12: 5268–72.
29. Waltering KK, Urbanucci A, Visakorpi T (2012) Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 360: 38–43.
30. Davies H, Bignell GR i sur. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949–54.
31. Solit DB, Garraway LA i sur. (2006) BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 439: 358–62.

32. Atsuka Matsui, Tatsuya Ihar, Hiraku Suda, Hirofumi Mikam (2013) Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer. *Biomolecular Concepts*. Volume 4, Issue 6: 37-49.
33. Latta EK, Tjan S i sur. (2002) The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 15(12):1318-25.
34. Park K, Han S, Kim HJ, Kim J, Shin E (2006) HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* 48(6):702-7.
35. Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA i sur. (2001) Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. *J Pathol* 195: 422-428.
36. Luoh SW (2002) Amplification and expression of genes from the 17q11–q12 amplicon in breast cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 136: 43-4.
37. Ramsey B, Bai T, Hanlon Newell A i sur. (2011) GRB7 protein over-expression and clinical outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 127: 659-669.
38. Stein D, Wu J, Fuqua SA i sur. (1994) The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *Embo J* 13: 1331-1340.
39. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG i sur. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182.
40. Wedad M Hanna, Rüschoff J, Bilous M, Coudry R A (2014) HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Modern Pathology* 27, 4–18.
41. Nancy U, Lin i Eric P, Winer (2007) Brain Metastases: The HER2 Paradigm. *Clin Cancer Res* 2007; 13(6).
42. Sophia K Apple, Alarice C Lowe, Nagesh Rao P, Shintaku P I (2009) Comparison of fluorescent in situ hybridization HER-2/neu results on core needle biopsy and excisional biopsy in primary breast cancer. *Modern Pathology* 22, 1151–1159.

43. Antonio C. Wolff, M. Elizabeth H i sur. (2013) 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. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY. Vol 31 No 31.
44. Sapino A, Goia M, Daniele Recupero and Caterina Marchiò (2013) Current Challenges for HER2 Testing in Diagnostic Pathology: State of the Art and Controversial Issues Front Oncol 3: 129.
45. Karki R, Deep Pandya, Robert C , Elston and Cristiano Ferlini. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. BMC Medical Genomics20158:37 DOI: 10.1186/s12920-015-0115-z
46. Dawen Xie, Xiao-Ou Shu i sur. (2000) Population-Based, Case-Control Study of HER2 Genetic Polymorphism and Breast Cancer Risk. JNCI J Natl Cancer Inst 92 (5): 412-417.
47. Cox DG1, Hankinson SE, Hunter DJ (2005) The erbB2/HER2/neu receptor polymorphism Ile655Val and breast cancer risk. Pharmacogenet Genomics. 15(7):447-50.
48. Siddig A, Mohamed AO, Kamal H, Awad S, Hassan AH, Zilahi E (2008) HER-2/neu Ile655Val polymorphism and the risk of breast cancer. Ann N Y Acad Sci. 1138:84-94.
49. Zúbor P, Vojvodová A, Danko J, Kajo K i sur. (2006) HER-2 [Ile655Val] polymorphism in association with breast cancer risk: a population-based case-control study in Slovakia. Neoplasma 53(1): 49-55.
50. Stephanie E Nelson, Michael N Gould, Hampton J M (2005) A case-control study of the HER2 Ile655Val polymorphism in relation to risk of invasive breast cancer. Breast Cancer Res 7(3): R357–R364.
51. Su LuZhanwe i WangHong Liu (2010) HER2 Ile655Val polymorphism contributes to breast cancer risk: evidence from 27 case–control studies. Breast Cancer Research and Treatment Volume 124, Issue 3, pp 771–778.

52. X Han, L Diao, Y Xu, W Xue, T Ouyang, J Li, T Wang, Z Fan, T Fan (2014) Association between the HER2 Ile655Val polymorphism and response to trastuzumab in women with operable primary breast cancer. *Ann Oncol* 25 (6): 1158-1164.
53. Beauclair S, Formento P, Fischel JL i sur. ( 2007) Role of the HER2 [Ile655Val] genetic polymorphism in tumorigenesis and in the risk of trastuzumab-related cardiotoxicity. *Ann Oncol* 18:1335-1341.
54. Maillie A, Dumont and J Bonnetterre (2013) Trastuzumab cardiac toxicity and HER2 polymorphism: A case-control study. *Cancer Res* 73 (24 Suppl): Abstract nr P4-12-21
55. Gómez Peña, Celiaa, Dávila-Fajardo, Cristina L, Martínez-González (2015) Influence of the HER2 Ile655Val polymorphism on trastuzumab-induced cardiotoxicity in HER2-positive breast cancer patients: a meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics* 25(8):388-93.
56. Alison Palumbo (2016) HER2 Receptor Antagonist–Associated Cardiotoxicity. *JHOP* Vol 6, No 3 .
57. Lemieux J, Diorio C, Marc-Andre Cote (2013) Alcohol and HER2 Polymorphisms as Risk Factor for Cardiotoxicity in Breast Cancer Treated with Trastuzumab. *Anticancer Research* June vol. 33 no. 6 2569-2576.
58. Roskoski R (2004) The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 18;319(1):1-11.
59. Gabrić I D (2014) Utjecaj polimorfizma gena za angiotenzin pretvorbeni enzim (ACE) na kardiotsičnost uzrokovanu imunoterapijom monoklonskim protutijelom trastuzumabom. Doktorski rad, Biološki odjel Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
60. Cho i sur. (2003) Report a crystal structure of the extracellular portion of human HER2, an epidermal growth factor receptor. *Nature Biotechnology* 21, 377.
61. Ward CW, Lawrence MC i sur. (2007). The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation. *Trends Biochem. Sci.* 32 (3): 129–137
62. Ferguson KM, Berger MB i sur. (2003). EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell.* 11 (2): 507–517
63. Garrett TP, McKern NM i sur. (2002). Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor  $\alpha$ .. *Cell* , 110: 763-773.



64. Patrizia Casalini, Marilena V. ERBB2

(v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian).Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ERBB2ID162ch17q11.html>)

65. Linggi B, Carpenter G (2006). ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. Trends Cell Biol 16 (12): 649–656.

66. Hynes NE, Stern DF (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. Biochim Biophys Acta 1198: 165–184.

67. Dent P, Yacoub A i sur. (2003). Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. Radiat Res 159(3): 283-300.

68. Alroy I, Yarden Y (1997) The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. FEBS Lett 23; 410(1): 83-6.

69. Sudol M (1998) From Src homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. Oncogene 17: 1469–1474.

70. Levkowitz GL, Klapper LN, Tzahar E, Freywald A, Sela M (1996) Coupling of the c-Cbl proto-oncogene to ErbB-1/EGF-receptor but not to other ErbB proteins. Oncogene 12: 1117–1125.

71. Prigent S A, Gullick WJ (1994) Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. EMBO J.13: 2831–2841.

72. Fiorentino L, Pertica C, Fiorini M, Talora C, Crescenzi M, Castellani L, Alema S, Benedetti P, Segatto S (2000). Inhibition of ErbB-2 mitogenic and transforming activity by RALT, a mitogen-induced signal transducer which binds to the ErbB-2 kinase domain. Mol Cell Biol 20: 7735–7750.

73. Monilola A (1998) ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. Mol. Cell Biol 18(9): 5042-51.

74. Lim SJ, Lopez-Berestein G, Hung MC, Lupu R, Tari AM (2000) Grb2 downregulation leads to Akt inactivation in heregulin-stimulated and ErbB2-overexpressing breast cancer cells. Oncogene 19(54): 6271-6.

75. Dankort DL, Maslikowski B, Warner N, Kanno N, Kim H, Wang Z, Moran MF, Oshima RG, Cardiff RD, Muller WJ (2001) Grb2 and Shc adapter proteins play distinct roles in Neu (ErbB-2)-induced mammary tumorigenesis: Implications for human breast cancer. *Mol Cell Biol* 21: 1540–1551.
76. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM (2000) Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Phys* 182: 150-162.
77. Herbst RS, Bunn PA Jr. (2003) Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 9: 5813-5824.
78. Bargmann CI, Weinberg RA (1988). Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion. *EMBO J* 7: 2043-2052.
79. Olayioye MA (2001) Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members, *Breast Cancer Res* 3: 385-389.
80. Cho HS, Leahy DJ (2002) Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 297: 1330-1333
81. Sliwkowski MX, Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (2004) Diseases of the Breast. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins: 415-426.
82. Vibeke Bertelsen i Espen Stang (2014) The Mysterious Ways of ErbB2/HER2 Trafficking. *Membranes* 4(3), 424-446.
83. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16: 1647-1655.
84. Slamon DJ, Godolphin W i sur. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244 (4905): 707-12.
85. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*; 235: 177-18.
86. van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ i sur. (1988) Neu-protein overexpression in breast cancer: association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J Med* 319: 1239-1245.

87. Vogt U, Bielawski K, Schlotter C i sur. (1998) Amplification of erbB-4 oncogene occurs less frequently than that of erbB-2 in primary human breast cancer. *Gene* 223: 375-380.
88. Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, Sliwkowski MX, Stern HM (2008). A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res* 68(14): 5878-87.
89. Dickson C, Spencer-Dene B, Dilon C, Fantl V (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer: Fibroblast growth factors and their receptors. *Breast Cancer Res* 2: 191-196.
90. Wiesen J, Young P, Werb Z, Cunha G (1999) Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development* 126: 335-344.
91. Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ (1992) Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10578-10582.
92. Knowlden JM, Gee JM, Seery LT, Farrow L, Gullick WJ, Ellis IO, Blamey RW, Robertson JF, Nicholson RI (1998).c-erbB3 and c-erbB4 expression is a feature of the endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer. *Oncogene* 17(15): 1949-57.
93. Mothaffar F. Rimawi, Priya B. Shetty, Heidi L Weiss, Rachel Schiff (2010) EGFR Expression in Breast Cancer Association with biologic phenotype and clinical outcomes. *Cancer* 116(5): 1234–1242.
94. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-18.
95. Konecny GE, Meng YG, Untch M i sur. (2004) Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 10(5): 1706-16.
96. Mendelsohn J, Baselga J (2000) The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19:6550-6565.
97. Arpino G, Gutierrez C, Weiss H, Rimawi M, Massarweh S, Bharwani L, De Placido S, Osborne CK, Schiff R (2007) Treatment of human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer xenografts with multiagent HER-targeted therapy. *J Natl Cancer Inst* 99(9): 694-705.

98. Lamond NW, Younis T (2014) REVIEW: Pertuzumab in human epidermal growth-factor receptor 2-positive breast cancer: clinical and economic considerations. *Int J Womens Health* 16;6:509-21.
99. Meyer D, Birchmeier C (1995) Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378 (6555): 386-90.
100. Hynes NE, Lane HA (2005) ERBB Receptors and Cancer: The Complexity of Targeted Inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5(5): 341-354.
101. Fuchs IB, Landt S, Bueler H (2003) Analysis of HER2 and HER4 in human myocardium to clarify the cardiotoxicity of trastuzumab (Herceptin). *Breast Cancer Res. Treat* 82: 23-28
102. Katrien Lemmens, Kris Doggen and Gilles W, De Keulenaer (2007) Role of Neuregulin-1/ErbB Signaling in Cardiovascular Physiology and Disease. Implications for Therapy of Heart Failure. *Circulation* 116:954-960.
103. Lee KF i sur. (1995) Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378, 394-398.
104. Keating MT, Sanguinetti MC (2001). Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 104(4): 569-80.
105. Friddle CJ , Koga T , Rubin EM , Bristow J (2000). Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6745–50.
106. Negro A, Brar BK, Lee KF (2004) Essential Roles of Her2/erbB2 in Cardiac Development and Function Recent Progress in Hormone Research 59:1-12.
107. Crone SA, Zhao YY i sur. (2002) ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nature Med* 8, 459-465.
108. Camenisch TD, Schroeder JA, Bradley J, Klewer SE, McDonald JA (2002) Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors. *Nature Med* 8 (8): 850–5.
109. Le Douarin NM, Smith J (1988) Development of the peripheral nervous system from the neural crest. *Annu Rev Cell Biol* 4: 375 –404.
110. Falls DL (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284: 14–30.

111. Lemmens K, Segers VF, De Keulenaer GW (2005) Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity: muscarinic modulation of  $\beta$ -adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion." *Circulation* 111: e175.
112. Belge C, Massion PB, Pelat M, Balligand JL (2005) Nitric oxide and the heart: update on new paradigms. *Ann N Y Acad Sci* 1047: 173–182.
113. Lemmens K, Fransen P, Sys SU, Brutsaert DL, De Keulenaer GW (2004) Neuregulin-1 induces a negative inotropic effect in cardiac muscle: role of nitric oxide synthase. *Circulation* 109: 324–326.
114. Montero JC, Yuste L, Diaz-Rodriguez E, Esparis-Ogando A, Pandiella A (2000) Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme. *Mol Cell Neurosci* 16: 631–648.
115. Liu X, Chang J i sur. (2006) Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 48: 1438–1447.
116. Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, Murphy M, Stewart SJ, Keefe D (2002) Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 20(5): 1215-1221.
117. Ming Hui Chen, Kerkelä R, Force T(2008) Mechanisms of Cardiac Dysfunction Associated With Tyrosine Kinase Inhibitor Cancer Therapeutics. *Circulation* 118:84-95.
118. Thomas M. Suter, Michael S. Ewer (2013) Cancer drugs and the heart: importance and management. *European Heart Journal* 34, 1102–1111.
- 119 . Beverly Moy, Goss E P (2007) Lapatinib-Associated Toxicity and Practical Management Recommendations. *The Oncologist* vol. 12 no. 7 756-765.
120. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Med* 6, 443-446.
121. Zhang H, Wang Q, Montone KT, Peavey JE, Drebin JA, Greene MI, Murali R (1999) Shared antigenic epitopes and pathobiological functions of anti-p185(her2/neu) monoclonal antibodies. *Exp Mol Pathol* 67(1): 15-25.

122. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4285-9
123. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D i sur. (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol* 20, 719-726.
124. Breast Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. GLOBOCAN 2012 (IARC) , Section of Cancer Surveillance (31/10/2016)
125. Incidencija raka u hrvatskoj - Hrvatski zavod za javno zdravstvo. [hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2012\\_final.pdf](http://hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2012_final.pdf)
126. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, Brown A (2000) HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol B-15. *J Natl Cancer Inst* 92:1991–8.
127. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC (1998) ErbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:1346–60.
128. Pai VB, Nahata MC (2000) Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf* 22: 263–302.
129. Slamon DJ, Leyland-Jones B i sur. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344: 783–92.
130. W. Eiermann (2001) Trastuzumab combined with chemotherapy for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: Pivotal trial data. *Annals of Oncology* 12 (Suppl. I): S57-S62.
131. Cook-Bruns N (2001) Retrospective analysis of the safety of Herceptins in metastatic breast cancer. *Oncology* 61: 56–8.
132. Baselga J, Cortés J, Sung-Bae Kim (2012) Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 366:109-119.
133. Swain SM i sur. Improved Survival in HER2+ Metastatic Breast Cancer. ESMO 2014 Abstract 350O\_PR: Final overall survival (OS) analysis from the CLEOPATRA study of first-line (1L) pertuzumab (Ptz), trastuzumab (T), and docetaxel (D) in patients (pts) with HER2-positive metastatic breast cancer (MBC)
134. Piccart-Gebhart MJ i sur. (2005) Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer *N Engl J Med* 353:1659–1672.

135. Smith I, Procter M (2007) 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *The Lancet* Volume 369, No. 9555, p29–36, 6.
136. Goldhirsch A i sur. (2013) 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 382:1021–1028.
137. Slamon D i sur. (2011) Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer *N Engl J Med* 365:1273–1283.
138. Perez EA i sur. (2011) Four-Year Follow-Up of Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy for Operable Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer: Joint Analysis of Data From NCCTG N9831 and NSABP B-31 *J Clin Oncol* 29:3366–3373.
139. Thompson A M, Moulder-Thompson S L (2012) Neoadjuvant treatment of breast cancer. *Ann Oncol* 23 (suppl 10): 231-236.
140. Untch M i sur. (2010) Three year median follow-up data of the TECHNO trial. *San Antonio Breast Cancer Symposium Abstract* P1-11-03.
141. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V i sur. (2010) Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOaH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet* 375:377-384.
142. Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H i sur. (2012) Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet* 13:25-32.
143. Force T, Krause DS, Van Etten RA (2007) Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer* 7: 332–344.
144. Yeh ET (2006) Cardiotoxicity induced by chemotherapy and antibody therapy. *Annu Rev* 57: 485–498.
145. Ewer SM, Ewer MS (2008) Cardiotoxicity profile of trastuzumab. *Drug Saf* 31(6):459-67.
146. McArthur HL, Chia S (2007) Cardiotoxicity of trastuzumab in clinical practice. *N Engl J Med* 357: 94–95.

147. Adedayo A Onitilo, Jessica M Engel, and Rachel V. Stankowski (2014) Cardiovascular toxicity associated with adjuvant trastuzumab therapy: prevalence, patient characteristics, and risk factors. *Ther Adv Drug Saf* 5(4): 154–166.
148. Romond E H, Jeong J H, Rastogi P, Swain S M (2012) Seven-Year Follow-Up Assessment of Cardiac Function in NSABP B-31, a Randomized Trial Comparing Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel (ACP) With ACP Plus Trastuzumab As Adjuvant Therapy for Patients With Node-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 30, no. 31 3792-3799.
149. Perez E A, Suman V J, Davidson E N, Sledge W G (2008) Cardiac Safety Analysis of Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel With or Without Trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 Adjuvant Breast Cancer Trial. *Journal of Clinical Oncology* 26, no. 8 1231-1238.
150. Pooja P Advani, Karla V Ballman, Travis J i sur. (2016) Long-Term Cardiac Safety Analysis of NCCTG N9831 (Alliance) Adjuvant Trastuzumab Trial. *Journal of Clinical Oncology* 34, 581-587.
151. Theodoulou M, Campos SM, Batist G (2002) TLC D99 (D, Myocet) and Herceptin (H) is safe in advanced breast cancer (ABC): final cardiac safety and efficacy analysis. *Proc Am Soc Clin Oncol* 21: 55a.
152. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV (2007) Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 7: 153.
153. Vazdar Lj, Mršić- Krmpotić Z, Tomek R (2010) Utjecaj vremena aplikacije trastuzumaba na razvoj srčane disfunkcije kod bolesnica s ranim rakom dojke // 5.Hrvatski onkološki kongres, Knjiga sažetaka
154. Sawaki M, Mukai H, Tokudome N, Nakayama T, Taira N, Mizuno T( 2012) Safety of adjuvant trastuzumab for HER-2-overexpressing elderly breast cancer patients: a multicenter cohort study. *Breast Cancer* 19(3):253-8.
155. Serrano C, Cortés J, De Mattos-Arruda L, Bellet M (2012) Trastuzumab-related cardiotoxicity in the elderly: a role for cardiovascular risk factors. *Ann Oncol* 23(4):897-902.
156. Irwin ML, Crumley D, McTiernan A, Bernstein L, Baumgartner R, Gilliland FD, Kriska A, Ballard-Barbash R (2003) Physical activity levels before and after a diagnosis of breast carcinoma: the Health, Eating, Activity, and Lifestyle (HEAL) study. *Cancer* 1;97(7):1746-57.



157. Rock CL, Flatt SW, Newman V, Caan BJ, Haan MN, Stefanick ML, Faerber S, Pierce JP (1999) Factors associated with weight gain in women after diagnosis of breast cancer. Women's Healthy Eating and Living Study Group. *J Am Diet Assoc* 99(10):1212-21.
158. Moy B, Goss P E (2007) Lapatinib-Associated Toxicity and Practical Management Recommendations. *The Oncologist* vol. 12 no. 7 756-765.
159. Smith I, Procter M, Gelber RD i sur. (2007) HERA study team 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 369 (9555):29.
160. Tripathy D, Seidman A, Keefe D, Hudis C, Paton V, Lieberman G (2004) Effect of cardiac dysfunction on treatment outcomes in women receiving trastuzumab for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 5(4): 293.
161. Guarneri V, Lenihan DJ, Valero V i sur. (2006) Long-Term Cardiac Tolerability of Trastuzumab in Metastatic Breast Cancer: The M.D. Anderson Cancer Center Experience *Journal of Clinical Oncology* 24 (25): 4107-4115.
162. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA (2010) The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 9(4):325-38.
163. Özcelik C, Erdmann B, Pilz B, Wettschureck N, Britsch S, Hübner N, Chien KR, Birchmeier C, Garratt AN (2002) Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *PNAS* 99 (13): 8880-8885.
164. Soeller C, Cannell MB (1999) Examination of the Transverse Tubular System in Living Cardiac Rat Myocytes by 2-Photon Microscopy and Digital Image-Processing Techniques *Circulation Research* 84: 266-275.
165. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N (1991) Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 83(2): 504-14.
166. Ewer MS, Vooletich MT, Durand JB, Woods ML, Davis JR, Valero V, Lenihan DJ (2005) Reversibility of trastuzumab-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and response to medical treatment. *J Clin Oncol* 23: 7820–7826.

167. Kuramochi Y, Guo X, Sawyer DB (2006) Neuregulin activates erbB2-dependent src/FAK signaling and cytoskeletal remodeling in isolated adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 41: 228–235.
168. Anderson CD, Heydarkhan-Hagvall S i sur. (2008) The role of cytoprotective cytokines in cardiac ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 148(2): 164-71.
169. Keefe DL (2002) Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer* 95: 1592–1600.
170. Perez EA, Rodeheffer R (2004) Clinical cardiac tolerability of trastuzumab. *J Clin Oncol* 22:322.
171. Ewer MS, Lippman S (2005) Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. *J Clin Oncol* 23: 2900.
172. Mackey JR, Kaufman B, Clemens M i sur. (2006) Trastuzumab prolongs progression-free survival in hormone-dependent and HER2-positive metastatic breast cancer (abstract). Data presented at the 29th annual San Antonio Breast Cancer Symposium.
173. MK, Shak S, Paton V, Ashby M, Murphy M, Stewart SJ, Keefe D (2002) Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 20(5): 1215-1221.
174. Sengupta PP, Northfelt DW, Gentile F, Zamorano JL, Khandheria BK (2008) Trastuzumab-Induced Cardiotoxicity: Heart Failure at the Crossroads. *Mayo Clinic* 83 (2): 197-203.
175. Panjra GS, Jain D (2007) Trastuzumab-induced cardiac dysfunction [editorial]. *Nucl Med Commun* 28(2): 69-73.
176. Bria E, Cuppone F, Fornier M, Nisticò C, Carlini P, Milella M, Sperduti I, Terzoli E, Cognetti F, Giannarelli D (2008) Cardiotoxicity and incidence of brain metastases after adjuvant trastuzumab for early breast cancer: the dark side of the moon? A meta-analysis of the randomized trials. *Breast Cancer Res Treat* 109(2): 231-9.
177. Piccart-Gebhart MJ, Procter M i sur. (2005) Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *Engl J Med* 353(16): 1659-72.

178. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE. et al. (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J* 353(16): 1673-84.
179. Guarneri V, Lenihan DJ, Valero V et al. (2006) Long-Term Cardiac Tolerability of Trastuzumab in Metastatic Breast Cancer: The M.D. Anderson Cancer Center Experience *Journal of Clinical Oncology* 24 (25): 4107-4115.
180. Fox KF (2006) The evaluation of left ventricular function for patients being considered for, or receiving Trastuzumab (Herceptin) therapy [letter]. *Br J Cancer* 95(10): 1454.
181. Chow EJ, Chen Y, Kremer LC et al. (2015) Individual prediction of heart failure among childhood cancer survivors. *J Clin Oncol* 33:394 –402.
182. Ezaz G, Long JB, Gross CP, Chen J (2014) Risk prediction model for heart failure and cardiomyopathy after adjuvant trastuzumab therapy for breast cancer. *J Am Heart Assoc* 2014;3:e000472.
183. The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines. *European Heart Journal*.doi:10.1093/eurheartj/ehw211
184. Cardinale D, Colombo A, Torrisi R et al. (2010) Trastuzumab-induced cardiotoxicity: clinical and prognostic implications of troponin I evaluation. *J Clin Oncol* 28:3910 –3916.
185. Ky B, Putt M, Sawaya H, French B et al. (2014) Early increases in multiple biomarkers predict subsequent cardiotoxicity in patients with breast cancer treated with doxorubicin, taxanes, and trastuzumab. *J Am Coll Cardiol* 63:809 –816.
186. Thavendiranathan P, Poulin F, Lim KD, Plana JC, Woo A, Marwick TH (2014) Use of myocardial strain imaging by echocardiography for the early detection of cardiotoxicity in patients during and after cancer chemotherapy: a systematic review. *J Am Coll Cardiol* 63:2751 – 2768.

187. Curigliano G, Cardinale D, Suter T (2012) Cardiovascular toxicity induced by chemotherapy, targeted agents and radiotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology* 23(suppl 7):vii155-vii166
188. Genetech, Inc. Package Insert, herceptin (Trastuzumab) (2013) Food and Drug administration. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2000/trasgen020900lb.htm](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2000/trasgen020900lb.htm)
189. Fox KF (2006) The evaluation of left ventricular function for patients being considered for, or receiving Trastuzumab (Herceptin) therapy. *Br J Cancer* 95:1454.
190. Heikki Joensuu, Pirkko-Liisa Kellokumpu-Lehtinen, Petri Bono, Tuomo Alanko i sur. (2006) Adjuvant Docetaxel or Vinorelbine with or without Trastuzumab for Breast Cancer. *N Engl J Med* 354:809-20.
191. Herceptin. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-product\\_Information/human/000278/WC500074922.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-product_Information/human/000278/WC500074922.pdf)
192. Cardinale D, Sandri MT (2010) Role of Biomarkers in Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity. *Progress in Cardiovascular Diseases* 53: 121–129.
193. Ewer MS, Vooletich MT, Durand JB, Woods ML, Davis JR, Valero V, Lenihan DJ (2005) Reversibility of trastuzumab-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and response to medical treatment. *J Clin Oncol* 23: 7820–7826.
194. Kalam K, Marwick TH (2013) Role of cardioprotective therapy for prevention of cardiotoxicity with chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 49(13):2900-9.
195. Seicean S, Seicean A, Alan N, Plana JC, Budd GT, Marwick TH (2013) Cardioprotective effect of  $\beta$ -adrenoceptor blockade in patients with breast cancer undergoing chemotherapy: follow-up study of heart failure. *Circ Heart Fail* 6(3):420-6.
196. Heck SL, Gulati G, Ree AH i sur. (2012) Rationale and design of the prevention of cardiac dysfunction during an Adjuvant Breast Cancer Therapy (PRADA) Trial. *Cardiology* 123(4):240-247.

197. Brauser D (2015) Adding Candesartan to Cancer Therapy May Decrease Cardiotoxicity in Breast Cancer Patients. American Heart Association (AHA) Scientific Sessions. [www.mdedge.com/.../aha-candesartan-protects-against-cardiotoxi...](http://www.mdedge.com/.../aha-candesartan-protects-against-cardiotoxi...)
198. van der Meer P, Jourik A, Gietema, Suter T M, Dirk J. van Veldhuisen. Cardiotoxicity of breast cancer treatment: no easy solution for an important long-term problem. European Heart Journal. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehw133>
199. Gulati G, Heck SL, Ree AH, Hoffmann P (2016) Prevention of cardiac dysfunction during adjuvant breast cancer therapy (PRADA): a 2 × 2 factorial, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of candesartan and metoprolol. Eur Heart J 1;37(21):1671-80.
200. Boekhout AH, Gietema JA, Milojkovic Kerklaan B, van Werkhoven ED (2016) Angiotensin II-Receptor Inhibition With Candesartan to Prevent Trastuzumab-Related Cardiotoxic Effects in Patients With Early Breast Cancer: A Randomized Clinical Trial. JAMA Oncol 1;2(8):1030-7.
201. Chau T. Dang, Anthony F. Yu, Lee W. Jones, Jennifer Liu (2016) Cardiac Surveillance Guidelines for Trastuzumab-Containing Therapy in Early-Stage Breast Cancer: Getting to the Heart of the Matter. Journal of Clinical Oncology 34,No 10, 1030-1033.
202. Pituskin E, Mackey JR, Koshman S i sur. (2015) Prophylactic beta blockade preserves left ventricular ejection fraction in HER2-overexpressing breast cancer patients receiving trastuzumab: Primary results of the MANTICORE randomized, controlled trial. 2015 San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstract S1-05.

## 8. ŽIVOTOPIS

Ljubica Vazdar rođena je 05.08.1964. u Delkovcu (Hrvatsko zagorje), gdje je završila osnovnu školu te srednjoškolsko obrazovanje u Građevinskom centru Bedekovčina. Godine 1983. završila je obrazovanje za zdravstvenog radnika sanitarno laboratorijskog smjera u Zagrebu. Diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1993.

Obvezni liječnički staž u trajanju od godinu dana je obavila u KBC Zagreb, a 1995. položila državni stručni ispit i nakon toga je radila od 1995.-2006. u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti i tuberkulozu, Klenovnik.

Specijalizaciju iz interne medicine je provela u KBC „Sestre milosrdnice“ Zagreb, a specijalistički ispit položila 2003.godine. Educirana iz područja ehokardiografije 2006. godine na Kardiologiji KB Dubrava, Zagreb i nakon toga započinje s radom 12/2006. u Klinici za tumore, Zagreb.

Od 2007. uz onkološku problematiku, bavi se ehokardiografijom i kardiotsičnošću antitumorske terapije. Ispit iz uže specijalizacije, internističke onkologije, položila je 2013., a 2014. godine odlukom Ministarstva zdravlja RH priznat joj je naziv primarijus.

Poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2009. godine. Kao istraživač i suistraživač sudjelovala u 3 internacionalne kliničke studije.

Autor je niza stručnih i znanstvenih radova objavljenih u zemlji i inozemstvu. Predavač na stručnim skupovima, seminarima i radionicama u RH s temama onkološkog liječenja, kardiotsičnosti i drugih nuspojava onkološke terapije te palijativne skrbi.

Član je više društava Hrvatskog liječničkog zbora. Od 2016. Predsjednica je Hrvatskog centra za palijativnu skrb.

Ljubica Vazdar radi na Odjelu za internističku onkologiju Zavoda za radioterapiju i internističku onkologiju KBC „Sestre milosrdnice“ Zagreb od 2006. do sada. Posebna područja interesa su joj rak dojke, kardiotsičnost antitumorske terapije, neuroendokrini tumori te palijativna skrb.

Udata je i majka dva sina, od devetnaest i sedam godina.

## **PRILOG - POPIS KRATICA**

ASCO = Američko društvo za kliničku onkologiju, eng. American Society of Clinical Oncology

ACE = angiotenzin pretvorbeni enzima, eng. Angiotensin Converting Enzyme

BRAF = gen koji kodira unutarstanični B-Raf protein, serin/treonin kinaze u signalnim putevima MAPK

CAP = Kolegij Američkih patologa, eng. College of American Pathologists

CGH = komparativna genomska hibridizacija, eng. Comparative genomic hybridization

CISH = kromogena in situ hibridizacija, eng. Chromogenic in situ hybridization

CRPC = kastracijski rezistentan rak prostate, eng. Castration-resistant Prostate Cancer

DFS = preživljenje bez napredovanja bolesti, eng. Disease free survival

EFLV = istisna frakcija lijeve klijetke, eng. Ejection fraction left ventricular

EGFR = receptor epidermalnog čimbenika rasta, eng. Epidermal Growth Factor Receptor

FISH = florescentna in situ hibridizacija, eng. Fluorescence in situ Hybridization

FDA = Američka agencija za hranu i lijekove, eng. Food and Drug Administration

GRB7 = protein prilagodbe SH2 domene receptora epidermalnog čimbenika rasta koji osigurava unutarstaničnu direktnu vezu na Ras onkogen, eng. Growth factor receptor-bound protein-7

HER2 = humani receptor epidermalnog čimbenika rasta, eng. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

IHC = imunohistokemijska metoda, eng. Immunohistochemistry

ISH = in situ hibridizacija, eng. In situ hybridization

MAPK = mitogen aktivirajuća protein kinaza, eng. Mitogen -Activated Protein Kinase

Myc = onkogen myc protein, eng. myelocytomatosis viral oncogene

MYCN = gen koji kodira myc onkogen protein

NSCLC = rak pluća ne-malih stanica, eng. Non small cell lung cancer

NYHA = funkcionalna klasifikacija zatajivanja srca, eng. New York Heart Association

NT-proBNP = N terminalni dio moždanog natrijuretskog peptida, eng. N-terminal proBrain Natriuremic Peptide

OS = ukupno preživljenje, eng. Overall survival

PCR = lančana reakcija polimeraze , eng. Polymerase chain reaction

PI3K = fosfatidil inozitol 3- kinaza, eng. Phosphatidylinositide 3-kinases

SNP = polimorfizam jednog nukleotida , eng. Single Nucleotide Polymorphisms



