

Uloga ekspresije proteina i amplifikacije gena HER-2, EGFR i ciklina D1 u invazivnom duktalnom raku dojke

Hadžisejdić, Ita

Doctoral thesis / Disertacija

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:739833>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

Ita Hadžisejdić

**ULOGA EKSPRESIJE PROTEINA I AMPLIFIKACIJE GENA HER-2, EGFR I
CIKLINA D1 U INVAZIVNOM DUKTALNOM RAKU DOJKE**

Doktorska disertacija

Rijeka, 2009.g.

Mentori: **Prof.dr.sc. Blaženka Grahovac**
Prof.dr.sc. Elvira Mustać

Doktorska disertacija obranjena je dana _____ u/na

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

Rad ima _____ listova.

Tablica _____

Slika _____

UDK klasifikacija: _____

Sve istine je lako razumjeti jednom kad su otkrivene; svrha je otkrivati ih.

Galileo

Galilei

Ovom prilikom zahvaljujem svima koji su na bilo koji način doprinjeli realizaciji ove doktorske disertacije.

Disertacija je izrađena na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Dio rezultata doktorske disertacije prihvaćen je za publiciranje u časopisu Modern Pathology; rad pod nazivom:

Hadžisejdić I, Mustać E, Jonjić N, Petković M, Grahovac B. Nuclear EGFR in ductal invasive breast cancer : correlation with cyclin D1 and prognosis. Mod Pathol. 2009

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Prekomjerna ekspresija proteina iz obitelji epidermalnog faktora rasta (EGFR obitelj) i ciklina D1 čest je nalaz u raku dojke. Međutim, u literaturi nedostaje radova koji sustavno ispituju ekspresiju i amplifikaciju HER-2, EGFR i ciklina D1 kod raka dojke, te njihov utjecaj na preživljenje i prognozu u istoj grupi pacijenata, pa su stoga i rezultati studija nerijetko oprečni. Također sve je više dokaza koji upućuju na postojanje direktnog puta EGFR signaliziranja u kojem aktivirani EGFR bude internaliziran i prebačen unutar jezgre gdje potom sudjeluje u procesu regulacije genske ekspresije. Stoga je cilj ovog istraživanja ispitati proteinsku ekspresiju i gensku amplifikaciju HER-2, membranskog EGFR (mEGFR), nuklearnog EGFR (nEGFR), ciklina D1 i status 17. kromosoma u invazivnom duktalnom raku dojke te podatke korelirati sa patohistološkim parametrima, menopauzalnim statusom i preživljenjem pacijentica.

Materijali i metode: Od ukupno 118 uzoraka invazivnog raka dojke izrađeni su tkivni mikroareji (TMA, tissue microarray) te se potom pristupilo imunohistokemijskom bojanju tkiva na HER-2, mEGFR, nEGFR i ciklin D1. Evaluacija statusa gena HER-2, EGFR, CCND1 i polisomije 17. kromosoma rađena je FISH metodom koristeći Vysis probe (Downers Grove, IL, SAD).

Rezultati: HER-2 prekomjerna proteinska ekspresija nađena je u 23.27% tumora, amplifikacija HER-2 gena u 18.10% slučajeva, dok je 20.68% uzoraka imalo polisomiju 17. kromosoma. Prekomjerna mEGFR ekspresija i amplifikacija EGFR gena zabilježene su u svega 1.8% tumora. nEGFR ekspresija utvrđena je u 40.69% slučajeva od čega je 11.5% uzoraka imalo snažno izraženu nuklearnu ekspresiju EGFR (nEGFR +++). Ciklin D1 je prekomjerno eksprimiran u 63.71% slučajeva dok je CCND1 gen amplificiran u

13.4% slučajeva. Pronađene su statistički značajne korelacije između imunohistokemije i FISH analize za HER-2, EGFR i ciklin D1. Univarijantna analiza je pokazala da HER-2 genska amplifikacija pokazuje granično statistički značajnu povezanost s kraćim preživljenjem u ukupnoj skupini pacijentica ($p=0.052$), a statistički značajnu korelaciju u premenopausalnoj skupini ($p=0.0324$). Povišena ekspresija ciklina D1 povezana je s trendom boljeg preživljenja u sveukupnom broju uzoraka, postmenopausalnoj i premenopausalnoj skupini s tim da posljednja skupina pokazuje statistički značajnu korelaciju s boljim preživljenjem ($p=0.0027$). nEGFR ekspresija je statistički značajno udružena s lošijim preživljenjem u skupini žena u premenopauzi ($p=4.43 \times 10^{-6}$) i u cijeloj grupi ispitivanih pacijentica ($p=0.0002$). Također je utvrđeno da pacijentice sa snažnom/umjerenom ekspresijom ciklina D1 i nEGFR imaju lošije preživljenje u odnosu na pacijentice koje imaju snažnu/umjerenu ekspresiju ciklina D1 i negativnu/slabu ekspresiju nEGFR ($p=0.00078$). Multivarijantna analiza je pokazala da je nEGFR neovisan prognostički faktor i pacijenti sa snažnom nEGFR ekspresijom imaju 3.4 puta veći rizik od smrti u odnosu na nEGFR negativne pacijente.

Zaključak: Univarijantna analiza je pokazala da pacijentice sa snažnom nEGFR ekspresijom imaju statistički značajno lošije preživljenje, dok je multivarijantna analiza pokazala da nEGFR ima neovisni prognostički značaj. Dobiveni rezultati sugeriraju da nEGFR putem ciklina D1 potiče proliferaciju tumorskih stanica i agresivnije ponašanje te posljedično tome lošije preživljenje pacijentica. Ukoliko povećana ekspresija ciklina D1 nije združena s nEGFR snažnom ekspresijom onda takvi tumori imaju manje agresivan tijek, a pacijentice bolje preživljenje.

Ključne riječi: ciklin D1; EGFR; FISH; HER-2; imunohistokemija; rak dojke, invazivni
duktalni rak dojke, tkivni mikroarej

SUMMARY

Objectives: Members of epidermal growth factor receptor (EGFR) family and cyclin D1 are frequently overexpressed in breast cancer. However, studies that systematically examine protein expression and gene amplification of HER-2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer and correlate it with overall survival in the same group of patients are missing; hence results of the different studies are frequently opposite. Emerging evidences suggest the existence of a new mode of EGFR signaling pathway in which activated EGFR undergoes nuclear translocation and subsequently regulates gene expression and potentially mediates other cellular processes. Therefore the aim of this study is to examine protein expression and gene amplification of HER-2, membrane EGFR (mEGFR), nuclear EGFR (nEGFR), cyclin D1 and chromosome 17 status in invasive ductal breast carcinoma and correlate findings with pathohistological parameters, menopausal status and overall survival.

Material and Methods: Tissue microarrays (TMA) were built from the 118 archival, formalin fixed paraffin embedded invasive ductal carcinoma. Immunohistochemistry was performed for HER-2, mEGFR, nEGFR and cyclin D1 according to manufactures instructions. Gene evaluation of HER-2, EGFR, cyclin D1 and chromosome 17 status were performed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using Abbott, Vysis probes (Downers Grove, IL, USA).

Results: HER-2 overexpression was found in 23.27% tumors, corresponding gene amplification was detected in 18.10% samples while 20.68% cases had chromosome 17 polisomy. mEGFR protein overexpression and EGFR gene amplification were found in 1.8% of tumors. nEGFR expression was detected in 40.69% tumors with 11.50% having

high nEGFR staining (nEGFR +++). Strong cyclin D1 expression and CCND1 amplification were found in 63.71% and 13.4% of the cases, respectively. Statistically significant correlation was found between immunohistochemistry and FISH analysis for HER-2, EGFR and cyclin D1. Univariate analysis for HER-2 gene amplification showed borderline statistical significance with shorter overall survival (OS) in whole cohort of patients ($p=0.052$) and statistically significant correlation with shorter OS in premenopausal group of patients ($p= 0.0324$). Strong cyclin D1 expression significantly correlated with better OS in pre-menopausal group of women ($p= 0.0027$) but there was no significant correlation in post-menopausal group or whole patient's cohort although trend toward better survival has been noticed. Importantly, Kaplan-Meier survival analysis and log-rank test revealed a significant inverse correlation between high nEGFR and OS in whole cohort ($p= 0.0002$) as well in premenopausal group of patients ($p= 4.43 \times 10^{-6}$). Also, tumors with moderate/strong expression of cyclin D1 and nEGFR had significantly shorter cumulative survival comparing to tumors with moderate/strong cyclin D1 expression and negative/low nEGFR ($p=0.00078$). Multivariate analysis revealed nEGFR to be independent prognostic factors for OS and showed 3.4 times greater mortality risk for nEGFR+++ patients comparing to nEGFR negative patients (hazard ratio = 3.402; $p=0.0026$).

Conclusion: Univariate analysis showed that patients with high nEGFR staining have statistically significant worse OS while multivariate analysis revealed that nEGFR represents independent prognostic factor. Also, our data indicate that in context of high nEGFR staining, increased expression of cyclin D1, actually contributes to the poor survival rate in invasive ductal breast cancer, but when expressed alone strong cyclin D1

expression represents a good prognostic marker. Our findings together with earlier reports suggest that nEGFR may play potential important role in the aggressive biology of breast cancer and subsequently can lead to worse clinical outcomes.

Key words: breast cancer, invasive ductal carcinoma; cyclin D1; EGFR; FISH; HER-2; immunohistochemistry, tissue microarray

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1. 1. Epidemiologija i etiologija raka dojke	1
1. 2. Obitelj receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR obitelj)	3
1. 3. HER-2	6
1. 4. Polisomija 17. kromosoma	9
1. 5. EGFR	11
1. 6. Ciklin D1	15
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJALI I METODE	21
3. 1. Materijal	21
3. 1. 1. Izjava o poštivanju etičkih principa u istraživanju	22
3. 2. Tkivni mikroarej (TMA, tissue microarray)	24
3. 3. Imunohistokemija	25
3. 3. 1. Opći protokol	25
3. 3. 2. Bojanje specifičnim protutijelima i evaluacija	28
3. 4. Fluorescenta <i>in situ</i> hibridizacija (FISH)	31
3. 4. 1. Evaluacija FISH preparata	33
3. 5. Statistička obrada podataka	34

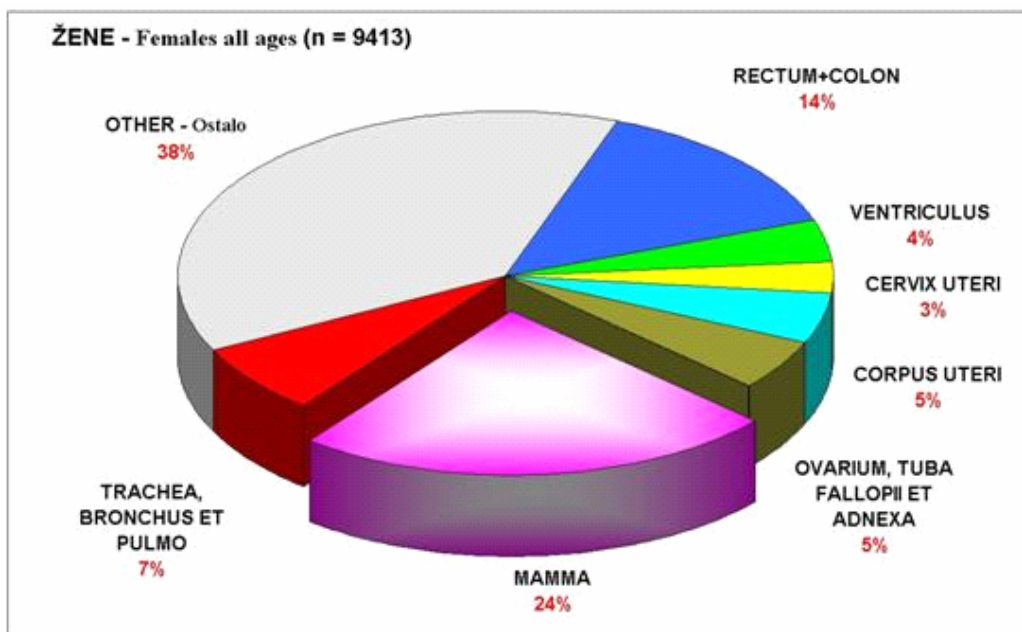
4. REZULTATI.....	36
4. 1. Analiza HER-2 imunohistokemije i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima.....	36
4. 2. Status HER-2 gena u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima.....	40
4. 3. Polisomija kromosoma 17 u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima.....	43
4. 4. Patohistološke karakteristike tumora sa polisomijom 17.....	45
4. 5. Evaluacija mEGFR imunohistokemijske analize i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima.....	49
4. 6. Status EGFR gena i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima.....	52
4. 7. nEGFR u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima.....	55
4. 8. Analiza ciklin D1 ekspresije i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima.....	59
4. 9. Analiza statusa CCND1 gena u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima.....	63
4. 10. Usporedba HER-2, mEGFR i ciklin D1 proteinske ekspresije sa amplifikacijom korespondirajućeg gena.....	65
4. 11. Analiza petogodišnjeg preživljenja obzirom na ispitivane faktore – univarijantna i multivarijantna analiza.....	67

5. RASPRAVA.....	78
6. ZAKLJUČCI.....	90
7. LITERATURA.....	93
POPIS SKRAĆENICA.....	114
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

1. 1. Epidemiologija i etiologija raka dojke

Incidencija raka dojke u kontinuiranom je porastu i glavni je uzrok smrtnosti kod žena u svijetu (1). S oko 1 151 298 novooboljelih i 410 712 umrlih žena (procjene za 2002.), rak dojke je najčešće sijelo raka kod žena u svijetu (2). Opći trend porasta incidencije raka dojke u svijetu bilježi se i u Hrvatskoj, međutim dok se u svijetu bilježi pad mortaliteta kod nas je mortalitet od raka dojke nažalost i dalje u porastu (3). Pad smrtnosti u svijetu od ovog raka pripisuje se većoj proširenosti upotrebe mamografije kao metode probira i boljem liječenju ranijih stadija bolesti (4,5). Prema posljednjim objavljenim podacima Republičkog registra za rak u Hrvatskoj je 2005. godine bilo 2 303 novooboljelih žena (stopa 101.1/100 000) (6). Rak dojke u Hrvatskoj je najčešći uzrok smrti od raka u žena i u 2006. godini umrlo je 830 žena (stopa 36.1/100 000) (Slika 1.) (3).



Slika 1. Pet najčešćih sijela raka u žena u Republici Hrvatskoj. Preuzeto iz HZZJZ, Incidencija raka u Hrvatskoj 2005, Bilten br. 30, Zagreb, 2007.

Od raka dojke najčešće oboljevaju žene iznad 50. godine života ali oboljevaju i žene mlađe životne dobi. Loši rezultati liječenja raka dojke danas se pripisuju prekasno otkrivenoj bolesti. Tumori postaju opipljivi prstima kada dosegnu veličinu od 1-2 cm i najčešće ih bolesnice same napipaju ali su tada regionalni limfni čvorovi već zahvaćeni u oko 50% slučajeva (7). Zloćudni tumori dojke najčešće su epitelnog porijekla i u najvećem broju slučajeva nastaju iz epitela kanalića (duktusa; ~80%) ili epitela režnjića (lobulusa; ~10%) (8). Danas se smatra da je rak dojke (kao i bilo koji drugi tip karcinoma) posljedica utjecaja multiplih faktora okoliša i nasljednih faktora, kao što su genetske mutacije, utjecaj virusnih onkogenih, utjecaj estrogena, poremećaj signaliziranja putem faktora rasta, nemogućnost imunološkog sustava da prepozna tumorske stanice ili nasljedni defekt u genima za popravak DNK. Iako su mnogi epidemiološki rizični faktori poznati, uzrok raka dojke je često nepoznat. Samo se u oko 5% slučajeva novootkriveni rak dojke može pripisati određenim nasljednim faktorima dok je u preostalim 95% slučajeva etiologija raka nepoznata (9).

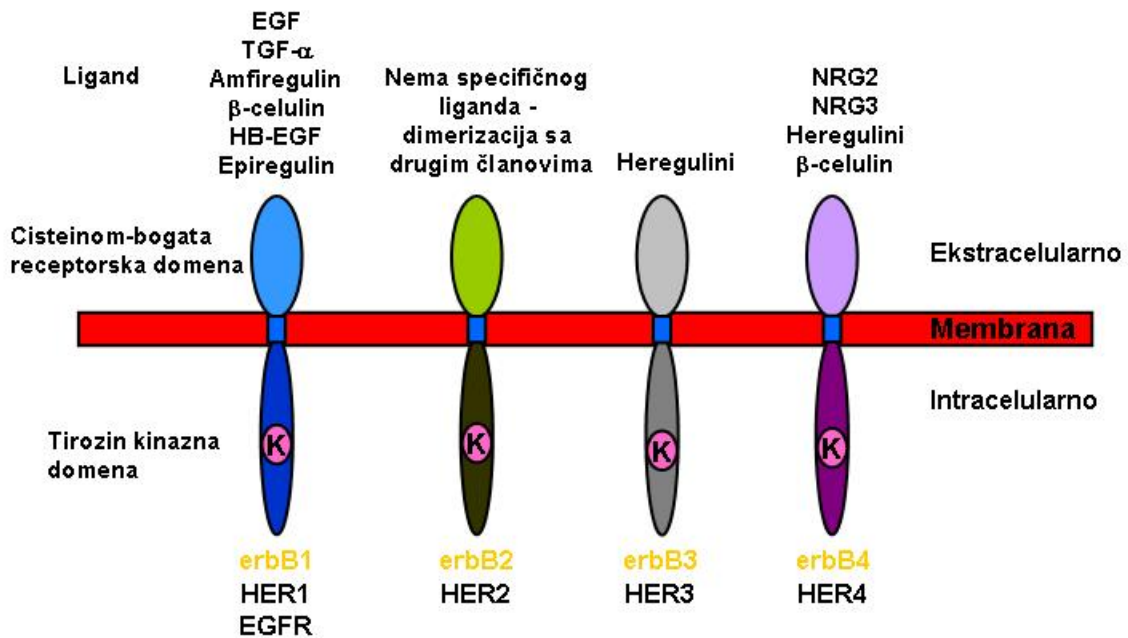
U svijetu je sve više izražena težnja za specifičnim dijagnostičkim metodama koje se temelje na biološkim značajkama samog tumora i individualiziranom pristupu liječenju bilo koje neoplazme, pa tako i raka dojke. Dostignuća u molekularnoj medicini i citogenetici omogućila su upotrebu novih metoda i dijagnostiku tumorskih biomarkera u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Naročita pažnja je usmjerena na one molekularne

biomarkere koji mogu predvidjeti odgovor na terapiju i progresiju bolesti te omogućavaju optimalni odabir terapije za pojedinog pacijenta. HER-2, EGFR (epidermal growth factor receptor) i ciklin D1 su proteini za koje se smatra da sudjeluju u tumorogenezi i povezuju se s prognostičkim faktorima rizika za rast, razvoj i terapijski odgovor niza tumora, uključujući i rak dojke. Razvoj nove generacije lijekova koji su specifično usmjereni ka HER-2 i EGFR-u (monoklonska protutijela, anti-HER-2 trastuzumab i anti-EGFR gefitinib) te isticanje ciklin D1 gena kao buduće ciljne molekule u razvoju novih specifičnih, tzv. «pametnih» lijekova, privuklo je značajan interes znanstveno-medicinske javnosti za istraživanje patobiokemijskih mehanizama posredovanih ovim proteinima/genima. Prognostički, odnosno, prediktivni faktori koji se trenutno koriste ne daju dovoljno informacija koje bi omogućile individualnu procjenu rizika za pacijenta i planiranje liječenja i odabira terapije za svakog pacijenta, ističući potrebu za dodatnim relevantnim prognostičkim faktorima.

1. 2. Obitelj receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR obitelj)

Receptori iz EGFR obitelji važni su medijatori maligne stanične transformacije, nekontrolirane proliferacije, održanja tumorskog fenotipa i preživljenja maligno transformiranih stanica (10). Poremećeno signaliziranje putem članova ove obitelji zabilježeno je u velikom broju humanih karcinoma, a najbolje je ispitano kod raka dojke, karcinoma pluća i glioblastoma (11). Receptori mogu pretrpjeti različite promjene prilikom maligne transformacije stanica uključujući gensku amplifikaciju, prekomjernu ekspresiju receptora na staničnoj membrani, aktivirajuće mutacije, prekomjernu

ekspresija liganda koji se vežu na receptore i/ili gubitak negativne sprege putem regulatornih proteina (12). EGFR obitelj sastoji se od 4 transmembranska receptora koji dijele visok stupanj homologije, EGFR (c-erbB1 ili HER-1), HER-2 (c-erbB2), HER-3 (c-erbB3) i HER-4 (c-erbB4) (Slika 2.).

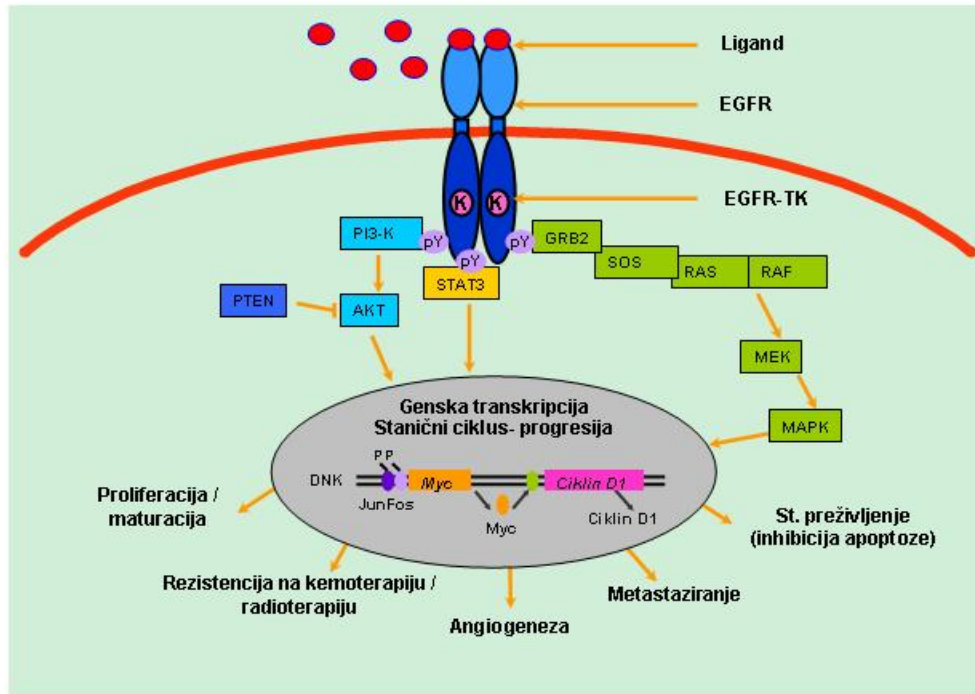


Slika 2. Obitelj receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR-epidermal growth factor receptor family). EGFR-receptor epidermalnog faktora rasta; HER-humani EGF receptor; EGF-epidermalni faktor rasta; TGF- α - transformirajući faktor rasta alfa; HB-EGF-heparin vezujući EGF; NRG-neuregulini 1 i 2 (NRG2 i NRG3)

Adaptirano iz Rubin I, Yarden Y. Ann Oncol 2001;12 Suppl 1:S3-8.

Svi su građeni na sličan način, imaju ekstracelularnu cisteinom bogatu domenu, na koju se veže ligand, intracelularnu domenu sa tirozin kinaznom aktivnosti, a te dvije domene su međusobno povezane hidrofobnim transmembranskim dijelom (13). Postoje stanovite rezlike među receptorima, HER-2 nema specifičnog liganda koji se na njega veže (14), a HER-3 nema tirozin kinazne aktivnosti (15, 16). Receptori iz EGFR obitelji se aktiviraju vezanjem liganda, što dovodi do dimerizacije receptora sa samim sobom (homodimer) ili dimerizacije sa drugim članovima iz EGFR obitelji (heterodimer). Formacija dimera je vođena većom stabilnošću formiranih kompleksa između liganda i dva receptora nego samo jednog receptora i liganda (13). Kako HER-2 receptor nema specifičnog liganda koji se na njega veže već je ko-receptor za mnogo različitih liganda, često je aktiviran pomoću liganada sličnih epidermalnom faktoru rasta što ima za posljedicu formiranje EGFR-HER-2 heterodimera (13). Značaj heterodimera je u tome da stvaraju mnogo potentnije signale nego homodimeri, a naročito oni heterodimeri koji sadrže HER-2 (13, 15, 17). Aktivacija signalnog puta receptorima iz ove obitelji odvija se u tri sekvencijska koraka. Prvo, vezanjem liganda na ekstracelularnu domenu receptora dolazi do konformacijskih promjena u samoj ekstracelularnoj domeni, a potom se, zbog navedenih strukturnih promjena receptori dimeriziraju (homo- ili hetero-dimerizacija). Konačno, dimerizacija dovodi do autofosforilacije intracitoplazmatske domene i aktivacije intracelularne domene receptora, tirozin kinaze, te daljnjeg prijenosa signala. Najčešće fosforilacija aktivira nekoliko signalnih kaskada uključujući, Ras-MAPK, PI3K (fosfoinozitol-3-kinaza)/Akt i STAT put koji zajedno kontroliraju gensku transkripciju,

stanični ciklus, staničnu proliferaciju i preživljenje, adheziju, angiogenezu, migraciju, invaziju i apoptozu (Slika 3.) (18, 19, 20).

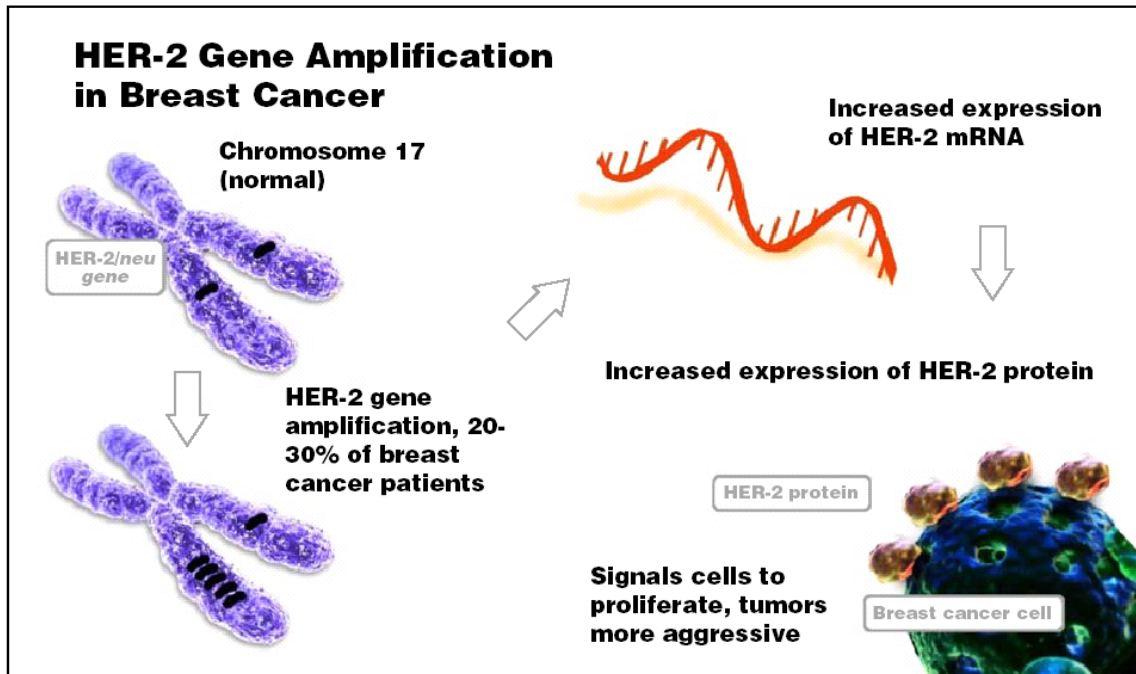


Slika 3. Vežanje liganda za receptor iz EGFR obitelji, njegova aktivacija i prijenos signala. Preuzeto i adaptirano iz Harari PM, Huang SM. Clin Cancer Res 2000;6:323-325 (21).

1. 3. HER-2

HER-2 je proto-onkogen, smješten na 17. kromosomu (17q21), koji kodira 185 kD velik transmembranski protein iz EGFR obitelji i ima važnu ulogu u kontroli staničnog rasta i diferenciranja (22). U stanici koja eksplicira normalnu količinu HER-2

receptora nalazi se oko 50 000 kopija ovog proteina na staničnoj membrani, dok u stanicama raka dojke koje pokazuju prekomjernu ekspresiju HER-2 proteina taj broj može biti i veći od milijun kopija (Slika 4.) (23, 24).



Slika 4. Amplifikacija HER-2 gena vodi do prekomjerne transkripcije HER-2 mRNA i povećane sinteze HER-2 proteina.

Preuzeto iz Hicks DG, Tubbs RR. Hum Pathol 2005;36:250-261.

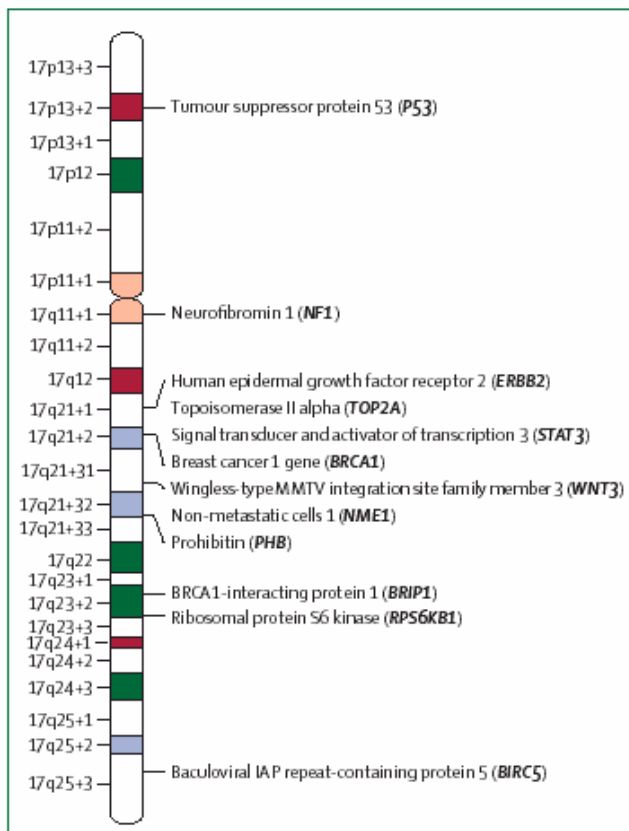
Kao posljedica prekomjerne ekspresije HER-2 proteina dolazi do skraćivanja G1 faze staničnog ciklusa, stanica ulazi u S fazu ciklusa mnogo ranije što ju vodi u nekontroliranu proliferaciju. Povećana ekspresija HER-2 proteina na staničnoj površini i posljedična nekontrolirana stanična proliferacija u većini slučajeva je posljedica

amplifikacije HER-2 gena. Studije pokazuju da 15-30% (25) invazivnog raka dojke ima prekomjernu ekspresiju HER-2 proteina, odnosno gensku amplifikaciju koja je povezana sa lošijom prognozom (veća učestalost ponovnog javljanja bolesti i veća smrtnost) i pozitivnim odgovorom na terapiju monoklonskim protutijelima (trastuzumab) (26). Ovo monoklonsko protutijelo specifično usmjereno na ekstracelularnu domenu HER-2 receptora (27), poboljšava sveukupno preživljenje u metastatskom karcinomu i smanjuje učestalost rekurencije i mortalitet u ranijim stadijima raka dojke (28). Istraživanja pokazuju da HER-2 prekomjerna ekspresija kod raka dojke korelira sa zahvaćenošću limfnih čvorova, visokim nuklearnim gradusom, negativnim hormonskim receptorima i visokom proliferativnom aktivnošću (29, 30, 31). Novije studije također pokazuju da HER-2 status može poslužiti i za predviđanje odgovora na samu kemoterapiju i hormonalnu terapiju (32). HER-2 ekspresija može ukazivati na relativnu smanjenu korist od kemoterapije koja sadrži ciklofosamid, metotreksat i fluorouracil (CMF), a s druge strane ukazivati na bolji odgovor na taxane i antraciklinsku terapiju (28, 33, 34). Bolji odgovor na antraciklinsku terapiju može se tumačiti sekundarnom amplifikacijom gena za enzim topoizomreazu II α (TOP2) koji je direktna meta samih antraciklina (35). Također, HER-2 pozitivitet je povezan sa relativnom rezistencijom na hormonalnu terapiju gdje kliničke studije sugeriraju da bi ovaj efekt bio specifičan za selektivne modulatore estrogenskih receptora, kao što je tamoksifen (36). Iako je HER-2 status važan prediktivni faktor u određivanju odgovora na terapiju trastuzumabom, pojedini tumori dojke nisu osjetljivi na ovu terapiju što sugerira da odgovor na terapiju ovim monoklonskim protutijelom ne mora ovisiti isključivo o HER-2 ekspresiji već može biti i pod utjecajem drugih receptora iz EGFR obitelji ili nekim drugim faktorima (37).

1. 4. Polisomija 17. kromosma

Dok u otprilike 90% slučajeva raka dojke dolazi do prekomjerne ekspresije HER-2 proteina zbog genske amplifikacije, smatra se da u preostalim slučajevima do prekomjerne ekspresije HER-2 dolazi sekundarno, zbog polisomije 17. kromosoma (38). Pojedine studije ukazuju na povezanost između polisomije 17. kromosoma i veće učestalosti HER-2 proteinske ekspresije 2+ i/ili 3+ pozitiviteta, odnosno jače proteinske ekspresije HER-2 u slučajevima bez amplifikacije istoimenog gena (39, 40). Međutim, studija Downs-Kelly i suradnika (41) dovela je u pitanje ovu hipotezu, jer njihovi rezultati pokazuju da slučajevi sa polisomijom 17. kromosoma nemaju povećanu ekspresiju HER-2 mRNA. U literaturi se prikazuju oprečni rezultati o kliničkom značaju i prevalenciji (10.3% - 48.7%) polisomije 17. kromosoma, ali svi su suglasni da polisomija može otežati intepretaciju HER-2 amplifikacije *in situ* metodama (38, 42). U literaturi se navodi da su oprečni rezultati posljedica upotrebe različitih kriterija za definiranje polisomije, upotrebe različitih graničnih vrijednosti, heterogenosti tumora, proliferativne aktivnosti tumora kao i preanalitičkih postupaka kao npr. narezivanje tkiva za samu *in situ* analizu (40, 41, 43). Problem kliničkog značaja polisomije 17. kromosoma leži u pitanju da li se takvi tumori ponašaju slično kao tumori koji imaju HER-2 gensku amplifikaciju (42). Studija Torrisi i suradnika pokazala je da tumori sa polisomijom 17. kromosoma imaju drugačije kliničko i biološko ponašanje od tumora koji pokazuju HER-2 amplifikaciju, podkrepljujući hipotezu da polisomija 17. kromosoma ne ukazuje na tumore sa lošijom prognozom. Međutim, u studiji Hofmanna i suradnika, 6 pacijenata sa

polisomijom 17 pozitivno je odgovorilo na trastuzumab terapiju stoga pojedini autori sugeriraju da bi se slučajevi polisomije 17 gdje se nađe više od 10 HER-2 signala po stanici trebali smatrati kao FISH pozitivni rezultati neovisno o HER-2/CEP 17 omjeru (38). Iako rezultati nekih studija ukazuju na to da se tumori sa polisomijom 17 značajno razlikuju u biološkim karakteristikama od tumora sa HER-2 genskom amplifikacijom, još uvijek nema studija koje koreliraju polisomiju 17 s dugoročnom prognozom ili kliničkim odgovorom na trastuzumab terapiju (42). Uz HER-2 gen na 17. kromosomu se još nalaze i p53 tumor supresor gen, BRCA1 i TOP2 i česta je delecija ovih gena ili amplifikacija u slučaju TOP2 gena (Slika 5) (44). Stoga je jako važno ispitati posljedice promjena broja kromosoma 17 koje će omogućiti bolje razumijevanje uloge genetske nestabilnosti u karcinomu dojke.



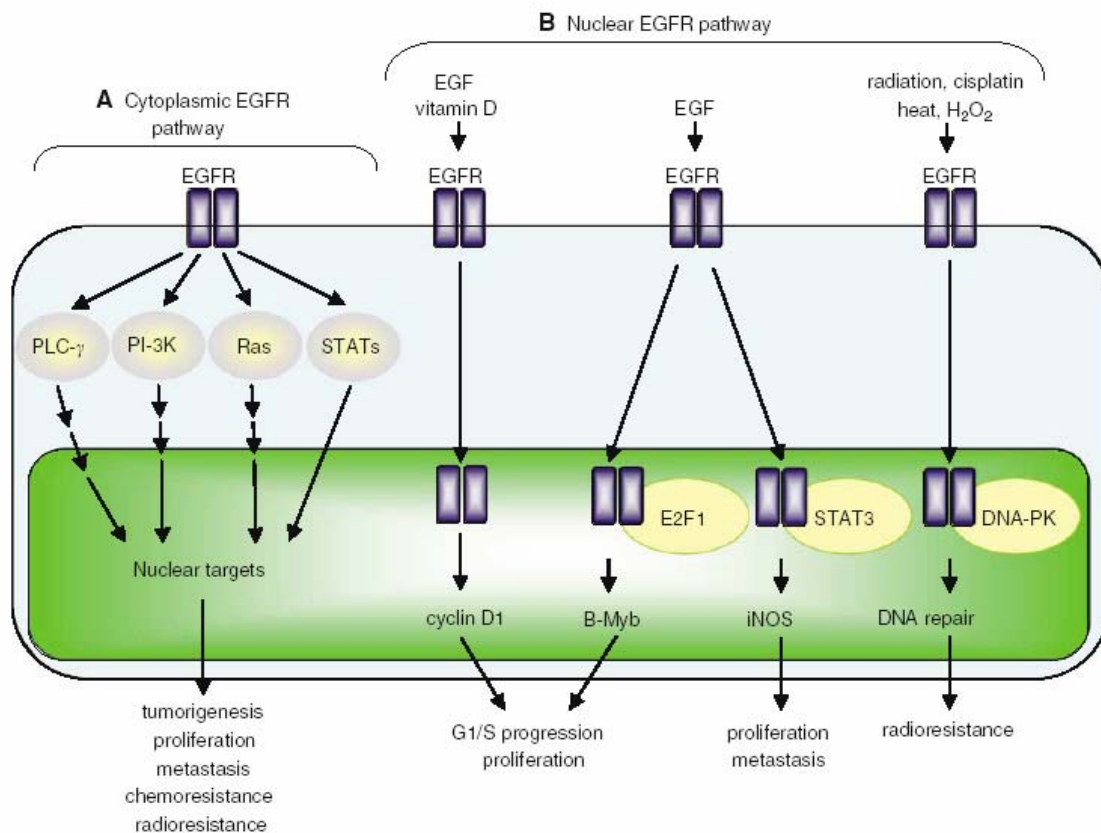
Slika 5. Ideogram kromosoma 17 sa točnom lokalizacijom gena važnih za nastanak i razvoj raka dojke. Uz HER-2 gen na 17. kromosomu se još nalaze između ostalog i tumor supresor gen p53, BRCA1 i TOP2 gen.

Preuzeto iz Reinholz MM i sur. Lancet Oncol 2009; 10: 267-77.

1. 5. EGFR

Gen za EGFR receptor smješten je na 7. kromosomu (7p11.2) i on kodira EGFR protein veličine 170 kD koji također pripada obitelji receptora epidermalog faktora rasta (43). Uloga EGFR-a u malignoj transformaciji i tumorskoj progresiji prepoznata je još 1984. godine (46). Prekomjerna ekspresija ovog proteina može se naći u velikom broju solidnih tumora i najčešće upućuje na agresivnije tumore s posljedično lošijom prognozom (47). Sam receptor najčešće aktiviraju dva liganda, epidermalni faktor rasta (EGF, epidermal growth factor) i transformirajući faktor rasta-alfa (TGF- α , transforming growth factor alpha), koji potom tvori homodimerne komplekse ili heterodimerne komplekse sa drugim članovima EGFR obitelji. Većina istraživanja vezana za EGFR induciranu karcinogenezu fokusirana je na karcinom pluća, gdje otprilike 10% pacijenata pokazuje brzi i izvanredan odgovor na inhibitore tirozin kinaza (TKIs) (48, 49), dok je s druge strane uloga EGFR-a u karcinogenezi raka dojke još uvijek nedovoljno poznata (50). Studije pokazuju znatne razlike u razini prekomjerne ekspresije EGFR proteina u

raku dojke koje se kreću od 5.3% do 91% (19, 51, 52, 53, 54), dok se genska amplifikacija EGFR-a kreće od 0.8% do 6% (45). Mehanizmi u podlozi prekomjerne ekspresije EGFR proteina kod raka dojke su još uvijek nerazjašnjeni, a aktivirajuće mutacije su ekstremno rijetke (45). Trenutno nema konsenzusa oko uloge EGFR-a kao markera prognoze kod raka dojke. EGFR ekspresija je otprilike dva puta češća u estrogen receptor (ER) i progesteron receptor (PR) negativnom raku dojke nego u ER i PR pozitivnim tumorima (54). Većina studija pokazuje oprečne rezultate o povezanosti ekspresije EGFR-a i veličine tumora. Također, pozitivan nalaz EGFR ekspresije u tumorima sa infiltratima u limfnim čvorovima i tumorima s većim histološkim stupnjem nije konstantan (54). Nema jasne povezanosti između EGFR statusa i sveukupnog preživljena iako EGFR pozitivni i ER negativni tumori imaju statistički lošiju prognozu (54). Međutim, studije se slažu da se prekomjerna EGFR ekspresija može naći u 60-70% karcinoma nalik bazalnom raku dojke (basal-like carcinoma) (55, 56) i otprilike 16% filoidnih tumora dojke (57). U ovom trenutku teško je izvući konačni zaključak o EGFR-u kao faktoru progresije bolesti ili prediktivnom faktoru učinka terapije obzirom na suprotna nalazišta različitih studija. Također postoji malo studija koje se bave usporedbom EGFR amplifikacije i prognoze, iako je nekolicina istraživanja pokazala da EGFR ekspresija u estrogen (ER) negativnih pacijentica ima lošiju prognozu (53, 58). Neke od studija upućuju da značajniju prognostičku vrijednost kod raka dojke imaju nuklearni EGFR (nEGFR) i fosforilirani EGFR (pEGFR) čija je povećana ekspresija povezana sa lošijim ishodom odnosno lošijim preživljenjem (18, 59). Iako je prisutnost nEGFR otkrivena još prije više od deset godina u hepatocitima koji se regeneriraju, njegova uloga i funkcija u jezgri tek je nedavno otkrivena (60).



Slika 6. Citoplazmatski (tradicionalni) i nuklearni (direktni) EGFR signalni put.

Citoplazmatski put aktivacije uključuje prijenos signala sa stanične membrane preko kaskade signalnih molekula prema specifičnim ciljnim molekulama i posljedični prijenos signala u jezgu. Kada se ova signalna kaskada naruši onda dolazi do maligne transformacije, povećane proliferacije stanica, rasta tumora i rezistencije na kemoterapeutike. Nuklearni EGFR put uključuje translokaciju samog aktiviranog receptora sa stanične površine u jezgu i posljedičnu transkripcijsku regulaciju ciljnih

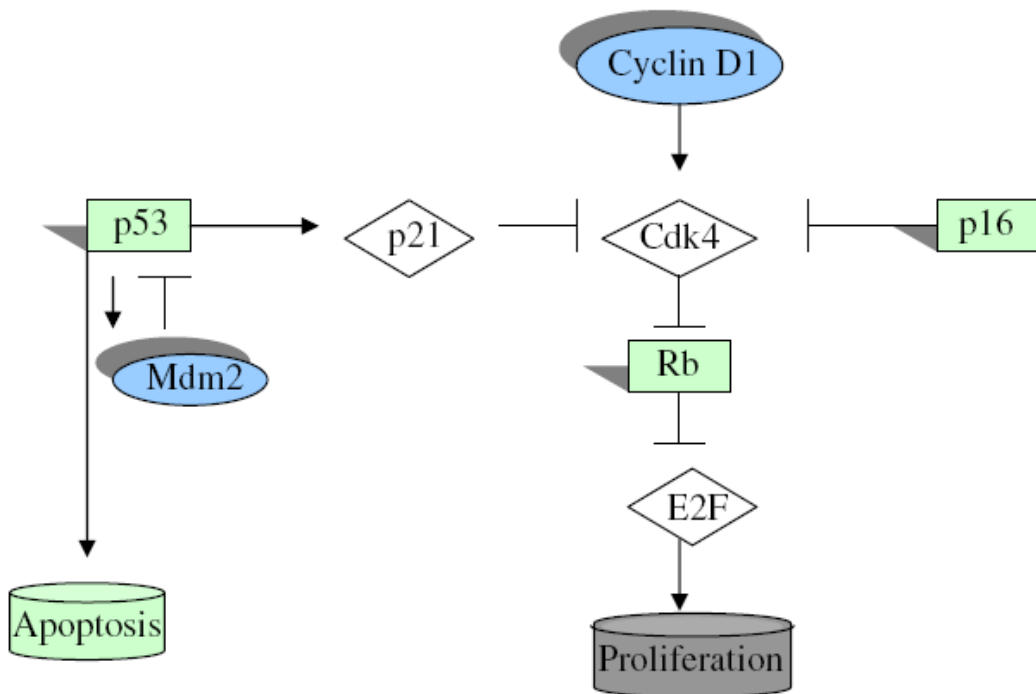
gena. Nuklearna EGFR akumulacija povezuje se sa povećanom tumorskom proliferacijom i lošijim preživljenjem pacijenata.

Preuzeto iz Lo HW, Hung MC. Br J Cancer 2006; 94:184-8.

Ovaj direktni put EGFR signaliziranja uključuje transport EGFR sa stanične površine unutar jezgre, interakciju nuklearnog EGFR sa genskim promotorima i posljedičnu transkripcijsku regulaciju ciljnih gena (Slika 6.) (61, 62). Novije studije ukazuju da nEGFR u jezgri djeluje kao transkripcijski ko-faktor koji aktivira ciklin D1 gen, koji predstavlja ključni regulator stanične proliferacije (63). Također, nedavno provedene studije su pokazale da je druga transkripcijska meta nuklearnog EGFR-a iNOS (inducible nitric oxide synthase) gen (64). Važnost potrebe za što boljim diferenciranjem značaja EGFR-a u raku dojke leži i u činjenici da su posljednjih godina razvijeni lijekovi specifično usmjereni na EGFR, monoklonalna protutijela i inhibitori tirozin kinaze. Ovi lijekovi su se dosada uglavnom upotrebljavali kod oboljelih od raka debelog crijeva i raka pluća, i primjećeno je da sama prekomjerna ekspresija EGFR proteina nema prediktivni značaj na učinak specifično usmjerene terapije, točnije samo EGFR aktivirajuće mutacije ili genska amplifikacija imaju značajnu prediktivnu vrijednost (65, 66).

1. 6. Ciklin D1

Ciklin D1 gen (CCND1) smješten je na kromosomskom lokusu 11q13 i kodira istoimeni protein. Ciklin D1 protein ekspirira se u G1 fazi staničnog ciklusa i djeluje kao senzor za signale rasta te je važan regulator kontrole prelaska iz G1 u S fazu staničnog ciklusa (67). Zajedno s ciklin ovisnim kinazama (Cdk), i to Cdk4 i Cdk6, tvori komplekse koji posreduju fosforilaciju retinoblastomskog proteina (pRB), a to onda dovodi do otpuštanja E2F transkripcijskog čimbenika što omogućuje stanici da prođe restrikcijku točku u G1 fazi i krene u S fazu staničnog ciklusa (Slika 7.).



Slika 7. Ciklin D1 preko ciklin ovisnih kinaza (cdk) dovodi do fosforilacije retinoblastomskog proteina (pRB) i posljedičnog otpuštanja E2F transkripcijskog faktora, što potom dovodi do aktivacije određenih gena koji su odgovorni za prolaz stanice u S fazu staničnog ciklusa.

Preuzeto od Roy PG, Thompson AM. *Breast* 2006;15:718-727.

Nekontroliranu proliferaciju stanica sprječavaju inhibitori ciklin ovisnih kinaza (Cdk) koji vežući se sa specifičnim Cdk sprječavaju da se Cdk veže na ciklin i na taj način blokiraju kaskadu zbivanja koja na kraju vode do stanične proliferacije (68). Ciklin D1 je prekomjerno eksprimiran u 28% - 83% slučajeva primarnog raka dojke dok je CCND1 gen amplificiran tek u 0% - 27% slučajeva (45), što sugerira da su i drugi mehanizmi uključeni u poremećaj ekspresije ciklin D1 proteina kao što su transkripcijska i post-transkripcijska disregulacija (69). U eksperimentalnim, animalnim modelima, i staničnim kulturama ciklin D1 je dokazan kao onkogen koji pridonosi proliferaciji stanica te može inducirati promjene u tkivu dojke i time dovesti do nastanka raka (70, 71). Ciklin D1, osim što je važan regulator staničnog ciklusa, može regulirati rast tkiva osjetljivog na estrogen na način da se veže na ER zajedno sa kofaktorom SRC-1 (ko-aktivator steroidnog receptora) i aktivira ga neovisno o vezanju hormona (72, 73), a također estrogeni mogu aktivirati ciklin D1 putem povećane transkripcije CCND1 gena (74, 75). Ova estrogen neovisna ER-agonistička aktivnost ciklina D1 indicira moguću onkogenu ulogu ovog proteina u ER pozitivnom raku dojke (76). No iako je utvrđen veliki postotak raka dojke koji prekomjerno eksprimira ciklin D1, patofiziološke posljedice prekomjerne

ekspresije proteina i amplifikacije gena ostaju još uvijek nejasne (77). Neke studije pokazuju da prekomjerna ekspresija ciklina D1 mRNA korelira s lošijom prognozom u ER pozitivnom raku dojke (78), dok druge pak studije povezuju prekomjernu ekspresiju ciklin D1 proteina u ER pozitivnim i dobro diferenciranim neoplazmama (neoplazme niskog histološkog stupnja) s povoljnijom prognozom (79, 80, 81). Proturječni su nalazi pojedinih studija koje povezuju proteinsku ekspresiju ciklina D1 u ER pozitivnih pacijenata sa boljom prognozom, te drugih studija koje ukazuju da amplifikacija CCND1 u ER pozitivnim karcinomima ima lošiju prognozu (82). Kontradiktorni rezultati prognostičkog značaja proteina i genske amplifikacije ciklina D1 najvjerojatnije su posljedica nedostatka studija koje testiraju ova dva entiteta na istom skupu pacijenata, pod istim uvjetima. Prekomjerna ekspresija ciklina D1 sa ili bez amplifikacije gena, postala je također značajna posljednjih godina, kada su objavljene kliničke studije koje ukazuju na ulogu ciklina D1 u razvoju rezistencije na tamoxifen (83, 84, 85). Ciklin D1 je također glavna ciljna molekula HER-2 signalnog puta. Lenferink i suradnici (86) su pokazali da aktivirani HER-2 može povećati transkripciju ciklina D1 preko Ras/MAPK puta te da aktivirani HER-2 također može inhibirati ciklin D1 degradaciju preko PI3K/Akt puta. Neke studije pokazuju da kombinirana prekomjerna ekspresija ciklina D1 i HER-2 u oboljelih od raka dojke je povezana sa visokom stopom rekurencije što indicira da ova dva proteina mogu biti združena u stvaranju malignijeg tumora sa lošijom prognozom (85). Međutim ciklin D1 može imati raznolike anti-tumorske efekte i može se također povezati i sa indukcijom apoptoze i inhibicijom staničnog rasta (87). U studijama na staničnim kulturama prekomjerna ekspresija ciklina D1 dovela je do

povećane incidencije apoptoze nakon ionizacijskog zračenja ili nakon tretmana sa hidroksiureom i protein kinazom C (88, 89).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U literaturi nedostaje radova koji sustavno ispituju ekspresiju i amplifikaciju HER-2, EGFR i ciklina D1 kod raka dojke, te njihov utjecaj na preživljenje i prognozu u istoj grupi pacijenata, pa su stoga rezultati studija nerijetko oprečni. U ovom istraživanju ispitat ćemo ekspresiju proteina i gensku amplifikaciju HER-2, EGFR, ciklina D1 te status 17. kromosoma na tkivnim mikroarejima (TMA; tissue microarrays) sastavljenim od uzoraka invazivnog dukalnog raka dojke što omogućava jednako kontrolirane uvjete za imunohistokemijske i *in situ* (FISH, fluorescentna *in situ* hibridizacija) analize za sve uzorke.

Cilj ove studije je ispitati ulogu i značaj biomarkera HER-2, EGFR, ciklina D1 i statusa 17. kromosoma u invazivnom duktalnom raku dojke i te rezultate korelirati sa patohistološkim parametrima (veličina tumora, status limfnih čvorova, status hormonskih receptora, histološki stupanj, LVI, NPI, Ki-67), menopauzalnim statusom i preživljenjem pacijentica.

Pojedinačni ciljevi studije su sljedeći:

1. Ispitati i usporediti HER-2 proteinsku ekspresiju sa genskom amplifikacijom određenu FISH-om,
2. Analizirati dobivene rezultate HER-2 u kontekstu patohistoloških parametara, pre- i post- menopauzalnog statusa i preživljenja pacijentica,
3. Odrediti prevalenciju polisomije kromosoma 17 i korelirati je sa HER-2 proteinskom ekspresijom i genskom amplifikacijom i analizirati dobivene rezultate polisomije u

kontekstu patohistoloških parametara, pre- i post- menopauzalnog statusa i preživljenja pacijentica,

4. Ispitati značaj EGFR proteina eksprimiranog na staničnoj membrani i/ili translociranog u staničnu jezgru tumorske stanice te amplifikacijski status EGFR gena

5. Analizirati dobivene rezultate EGFR genske amplifikacije, membranske i nuklearne ekspresije EGFR proteina u kontekstu patohistoloških parametara, pre- i post-menopauzalnog statusa i preživljenja pacijentica,

6. Ispitati i korelirati ciklin D1 proteinsku ekspresiju sa genskom amplifikacijom određenu FISH-om,

7. Analizirati dobivene rezultate za ciklin D1 u kontekstu patohistoloških parametara, pre- i post- menopauzalnog statusa i preživljenja pacijentica,

8. Analizirati odnos ko-ekspresije i/ili ko-amplifikacije HER-2, EGFR, ciklina D1 i korelirati ga s patohistološkim parametrima, pre- i post- menopauzalnim statusom i preživljenjem pacijentica.

3. MATERIJALI I METODE

3. 1. Materijal

Iz arhive Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci prikupljeno je ukupno 118 uzoraka tkiva raka dojke (invazivni duktalni tipa NOS), pacijentica operiranih na Klinici za kirurgiju KBC-a Rijeka u vremenskom razdoblju od 2000. do 2002. godine. Tkivo je obrađeno na Zavodu za patologiju, po standardnom protokolu. Svi uzorci su fiksirani u 10% puferiranom formalinu (Kemika, Zagreb, Hrvatska), uklopljeni u parafin i obojani hemalaun eozinom (HE) radi patohistološke analize preparata. Uzeti su oni uzorci kod kojih je bilo dovoljno tkiva za istraživanje i za koje su bili dostupni ostali podaci potrebni za studiju. Neoplazme su klasificirane prema SZO (Svjetska zdravstvena organizacija) klasifikacijskoj skali. Kliničkopatološki podaci dobiveni su iz medicinske dokumentacije pacijentica sa Klinike za onkologiju, KBC-a Rijeka i Zavoda za patologiju i uključuju dob pacijentica, veličinu neoplazme, status limfnih čvorova, histološki stupanj, NPI (Nottingham prognostic index), estrogenske (ER) i progesteronske (PR) receptore, limfovaskularnu invaziju (LVI), menopauzalni status i stadij bolesti. Histološki stupanj određen je prema modificiranom Bloom-Richardson bodovnom sustavu (90), a stadij bolesti prema TNM kriterijima (91). NPI je prognostički indeks koji sadrži različite prognostičke faktore (veličina tumora, status limfnih čvorova i histološki stupanj) za koje je utvrđeno da najznačajnije koreliraju s prognozom i koristi se za optimalni odabir terapije (92). Izračunava se na sljedeći način:

NPI = veličina neoplazme (u cm) x 0.2 + histološki stupanj (I-III) + limfni čvorovi/stadij (stadij A-negativni limfni čvorovi -1; stadij B-pozitivna ≤ 3 donja aksilarna limfna čvora-2; stadij C- pozitivni ≥ 4 limfna čvora i/ili apikalni limfni čvorovi-3) (93, 94, 95). Ukoliko je NPI < 3.4 prognoza je dobra; ako je NPI 3.4 – 5.4 prognoza je umjereno dobra i ako je NPI > 5.4 prognoza je loša (93, 94, 95).

Žene su po datumu posljednje menstruacije podijeljene u pre- i postmenopauzalnu skupinu (po 59 žena u obje skupine). Podaci vezani za 5-ogodišnje preživljenje prikupljeni su iz Hrvatskog registra za rak, Klinike za onkologiju, KBC-a Rijeka i Matičnog ureda Rijeka. Vrijeme preživljenja je računato kao vrijeme proteklo od operativnog zahvata do trenutka kada je pacijentica preminula od posljedica raka dojke ili do prestanka praćenja. Sve pacijentice su primarno liječene operativno (mastektomija ili široka lokalna ekscizija), adjuvantnom kemoterapijom i hormonalnom terapijom u slučaju hormonski ovisnih neoplazmi. Tablica 1 sumarno prikazuje kliničko-patohistološke podatke vezane za ispitivanu skupinu pacijentica.

3. 1. 1. Izjava o poštivanju etičkih principa u istraživanju

Sva istraživanja provedena na arhivskom materijalu izvršena su u skladu s etičkim i bioetičkim principima te se u svakom trenutku osigurala privatnost ispitanika uključenih u istraživanje kao i zaštita tajnosti podataka.

Tablica 1. Patohistološke karakteristike ispitivane skupine

Karakteristike uzorka	Broj pacijenata*
Dob	
Srednja vrijednost (mean)	58
Raspon (range)	31-88
Premenopauza	
Srednja vrijednost (mean)	45
Raspon (range)	31-52
Postmenopauza	
Srednja vrijednost (mean)	72
Raspon (range)	61-88
Veličina tumora	
T1 (\leq 2cm)	63
T2 (2-5 cm)	47
T3 ($>$ 5 cm)	8
Histološki stupanj	
I	31
II	62
III	25
Zahvaćenost limfnih čvorova (metastaze)	
0	64
1-3	22
\geq 4	32
ER	
-	48
+	70
PR	
-	44
+	74
NPI	
Dobar ($<$ 3.4)	60
Umjereno dobar (3.4 – 5.4)	32
Loš ($>$ 5.4)	26
LVI	
-	22
+	61
Ki-67	
$<$ 10%	49
10-30%	42
$>$ 30%	22

ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI- Nottingham prognostički index, LVI-limfovaskularna invazija.

* Ne odnosi se na dob, pre- i post- menopauzu.

3. 2. Tkivni mikroarej (TMA, tissue microarray)

Tkivni mikroarej (TMA) je tehnički postupak prijenosa i objedinjavanja do nekoliko stotina uzoraka tkiva uklopljenog u parafinu na jedan parafinski blok, tako da omogućava istovremenu analizu različitih patohistoloških entiteta na jednom preparatu istovremeno. Vrlo je isplativa tehnika, jer omogućava pregled velikog broja uzoraka na jednom preparatu pod istim eksperimentalnim uvjetima, uz istovremenu uštedu protutijela i/ili probe, i maksimalnu iskoristivost, te minimalni gubitak inače ograničenog arhivskog bioptičkog materijala. Od prethodno odabranih parafinskih blokova sa uklopljenim tumorskim tkivom, prvo su se napravili novi rezovi i obojili HE da bi patolog mogao odrediti reprezentativno područje tumora na preparatu koje je potom bilo uzeto za istraživanje. Odabrana zona tumorskog tkiva se označila na staklu vodootpornim flomasterom i potom se to isto područje prenijelo na prateći parafinski blok davatelj. Pomoću aparata, MTA Booster OI (Alphelys, Plaisir, Francuska) (Slika 8.) sa označenog mjesta na bloku davatelju, uzela su se po 3 cilindra tumorskog tkiva promjera 1 mm i premjestila u novi parafinski blok primatelj (mikroarej blok primatelj). Cilindri su se umetali u smjeru x i y koordinatnih osi, s međusobnim razmacima od 0.5 mm, a normalno jetreno tkivo je korišteno kao orijentacijski cilindar u TMA bloku. Parafinski blok primatelj se potom ostavio preko noći u termostatu na 45°C da bi se cilindri sa bloka davatelja povezali i uklopili u blok primatelj te potom narezali za daljnje imunohistokemijske i *in situ* analize (FISH).



Slika 8. Tkivni mikroarej (TMA-tissue microarray) uređaj Zavoda za patologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Naziv uređaja i proizvođač: MTA Booster OI, Alphelys, Plaisir, Francuska.

3. 3. Imunohistokemija

3. 3. 1. Opći protokol

Sa TMA parafinskog bloka narežu se rezovi debljine 3-4 μ m i prebace na stakla sa pozitivno nabijenom površinom za bolju adheziju tkiva (DakoREALTM, Glostrup,

Danska). Da bi se dodatno poboljšala adhezija tkiva za staklo, stakalca su ostavljena u termostatu preko noći na 37°C. Nakon sušenja preparati su se deparafinizirali u ksilenu (Tissue clear, Sakura, UK), 3 puta po 7 minuta, te su se 2 puta isprala u 100% (Kemig d.o.o., Sesvete, Hrvatska) etanolu da bi se uklonio ostatak ksilena. Potom su se preparati rehidrirali u 96% i 70% etanolu (4 minute ispiranja u svakom gradijentu etanola). Nakon toga je slijedilo razotkrivanje antigena (demaskiranje), a koji se postupak primijenio (proteinaza K ili prokuhavanje u natrij citratu) ovisilo je o samom protutijelu (vidi Tablicu 2).

Tablica 2. Karakteristike korištenih protutijela

Protutijelo, klon	Proizvođač	Razrjeđenje protutijela	Demaskiranje
HER-2, zečje poliklonsko	Dako, Danska	Originalno razrjeđenje ^a	10mM natrij citrat, pH 6.0
EGFR, E30, mišje monoklonsko	Dako, Danska	Originalno razrjeđenje ^a	Proteinaza K
RTU-EGFR 384, EGFR.25, mišje monoklonsko	Novocastra, UK	Dodatno razrjeđeno, 1:25 ^b	10mM natrij citrat, pH 6.0 i tripsin u PBS-u, pH 7.4
Ciklin D1, SP4, zečje monoklonsko	NeoMarkers, SAD	1:20	10mM natrij citrat, pH 6.0
Ki-67, MIB-1, mišje monoklonsko	Dako, Danska	1:75	10mM natrij citrat, pH 6.0

^aPripremljeno za upotrebu od strane proizvođača (eng. "ready to use").

^bDodatno razrijeđeno "ready to use" protutijelo.

Demaskiranje proteinazom K - Otopina proteinaze K pripremljena je na sljedeći način (prema preporuci proizvođača): 40 μ L Proteinaze K (DakoCytomation, Glostrup, Danska) otopi se u 1.6mL Proteinase K Diluent-a (DakoREAL™, Glostrup, Danska). Proteinase K Diluent je ustvari 0.05mol/L Tris pufer, pH 7.6 koji sadrži 15mmol/L NaN₃. Stakla se potom inkubiraju 5 minuta na sobnoj temperaturi u otopini proteinaze K, a nakon digestije se isperu 3 puta po 5 minuta u otopini 1x PBS-a (PBS-274mM NaCl, 0.6mM KCl, 1.6mM Na₂HPO₄, 0.2mM KH₂PO₄).

Demaskiranje u 10mM natrij citratu - Stakalca se stave na stalak i potom urone u 250mL 10mM natrij citrata, pH 6.0 u DakoREAL™ Incubation Container-u (DakoREAL™, Glostrup, Danska), te se stave u mikrovalnu pećnicu. Stakalca se kuhaju 9 i pol minuta na 800W, te 15 minuta na 450W i potom se izvade iz mikrovalne pećnice da se ohlade u samoj posudi 20-ak minuta i nakon čega se isperu 3 puta po 5 minuta u destiliranoj vodi i 1 puta po 5 minuta u 1x PBS-u.

Demaskiranje tripsinom i 10mM natrij citratom - Za nEGFR imunohistokemiju da bi se povećala osjetljivost i specifičnost radio se dvostruki pre-tretman. Stakalca su se prvo kuhala u 10mM natrij citratu, pH 6.0, 9 i pol minuta na 800W, te potom 15 minuta na 450W nakon čega je slijedila digestija sa 0.025% tripsinom u PBS-u, pH 7.4, 8 minuta na sobnoj temperaturi.

Nakon deparafinizacije i razotkrivanja antigena postupak imunohistokemijskog bojanja načini se u automatskom imunobojaču (Dako Autostainer Plus, DakoCytomation Colorado Inc, Fort Collins, CO, SAD). Dalji postupak u uređaju odvija se na slijedeći način: dodaju se primarna protutijela u odgovarajućem razrjeđenju i stakalca se

inkubiraju sat vremena na sobnoj temperaturi (izuzev nEGFR imunohistokemije gdje su se primarna protutijela dodala na stakalca i inkubirala preko noći na 4°C). Potom se stakla nakapaju sa 3% H₂O₂ (Peroxidase-Blocking Solution, DakoREAL™, Glostrup, Danska) i inkubiraju 6 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se blokirala endogena peroksidaza te se potom isperu 2 puta u puferu za ispiranje (Dako Wash Buffer 10x, Glostrup, Danska; 0.5 M Tris-HCl, 1.5M NaCl, 0.5% Tween 20, pH 7.6 (± 0.1)) koji se prethodno razrijedi sa destiliranom vodom u omjeru 1:10. Nakon toga slijedi primjena vizualizacijskog sistema DakoREAL™ EnVision™ Detection System, Rabbit/Mouse (30 minuta), a potom DakoREAL™ DAB+ Chromogen (sadržan u EnVision™ kitu), koji je korišten kao kromogen. Kada se diaminobenzidin (DAB) doda na stakla čeka se otprilike 10 minuta da dođe do promjene boje. Stakalca se potom isperu u ddH₂O. Nakon primjene vizualizacijskog sistema slijedilo je bojanje kroz 1 minutu, sa DakoREAL™ Hematoxylin (DakoREAL™, Glostrup, Danska) HE-om, ispiranje u vodi iz slavine, dehidracija u etanolu, ispiranje u ksilenu i pokrivanje GLC Mounting Medium (Sakura, UK). Kao negativne kontrole u svim imunohistokemijskim bojanjima korišteni su histološki rezovi na koje je umjesto primarnih protutijela nanescena puferaska otopina.

3. 3. 2. Bojanje specifičnim protutijelima i evaluacija

Imunohistokemijsko bojanje specifičnim protutijelima na HER-2 (Dako, Glostrup, Danska), membranski EGFR (mEGFR) (Dako, Glostrup, Danska), nuklearni EGFR (nEGFR) (RTU-EGFR-384, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), ciklin D1 (NeoMarkers, Fremont, SAD) i Ki-67 (Dako, Glostrup, Danska) napravljeno je prema

gore opisanom protokolu na uređaju za automatizirano bojanje, Dako Autostainer Plus. U Tablici 2 zbirno su prikazane karakteristike i specifikacije za pojedina protutijela. Korišteno protutijelo za mEGFR (Dako, Glostrup, Danska) je specifično usmjereno na NH₂ kraj EGFR proteina i detektira samo membranski EGFR u tkivu uklopljenom u parafin, dok je nEGFR (Novocastra, Newcastel upon Tyne, UK) protutijelo specifično usmjereno na COOH kraj proteina i detektira istovremeno membranski i nuklearni EGFR (59).

Evaluacija imunohistokemije za HER-2 napravljena je prema preporukama Američkog društva za kliničku onkologiju (American Society of Clinical Oncology 2007, ASCO) (32) (vidi Tablicu 3), a za membranski EGFR prema radu Cho i suradnika (51) (vidi Tablicu 4).

Tablica 3. ASCO* 2007 smjernice za HER-2 imunohistokemijsku evaluaciju

Kategorija rezultata	Imunohistokemijska validacija	Kriteriji za interpretaciju
Pozitivno	3+	Snažno, kompletno, homogeno membransko bojanje u >30% stanica
Granično	2+	Snažno, kompletno, homogeno membransko bojanje u ≤30% stanica; slabo ili umjereno heterogeno kompletno membransko bojanje u najmanje 10% stanica
Negativno	0, 1+	Nema bojanja (0) ili slabo inkompletno membransko bojanje (1+) u bilo kojem postotku stanica

* Američko društvo za kliničku onkologiju (American Society of Clinical Oncology, ASCO)

Tablica 4. Imunohistokemijska evaluacija za membranski EGFR*

Rezultat	Kriteriji za interpretaciju
0/negativno	Nema membranskog bojanja ili bojanje <10% stanica
1+	Inkompletno membransko bojanje u >10% stanica
2+	Slabo do umjereno kompletno membransko bojanje u >10% stanica
3+	Snažno i kompletno membransko bojanje u >10% stanica

* Prema radu Cho EY i sur. Pathol Int 2008; 58: 17-25.

Evaluacija imunoreaktivnosti za EGFR nuklearnu ekspresiju (nEGFR) napravljena je na sljedeći način, prema radu Lo i suradnika: visoka imunoreaktivnost (+++), ako je >35% tumorskih stanica pozitivno; umjereno (++), ako je od 18% do 35% tumorskih stanica pozitivno; slabo (+), ako je od 1% - 17% tumorskih stanica pozitivno i negativno, 0, ako nema nuklearnog bojanja (59).

Za ciklin D1 imunohistokemiju koristio se bodovni sustav opisan u radu Reis-Filho i suradnika (77). Samo bojanje jezgre se smatralo specifičnom reakcijom, a bodovao se intenzitet imunohistokemijske reakcije i udio jezgara tumorskih stanica koje se boje na ciklin D1. Intenzitet reakcije se bodovao kao 0, negativan, ako nije bilo bojanja niti jedne jezgre pod velikim povećanjem; 1, slab, bojanje vidljivo samo pod velikim povećanjem; 2, umjereni, lako vidljivo bojanje i pod malim povećanjem; 3, snažno, jasno vidljivo bojanje pod malim povećanjem. Zabilježio se i bodovao udio pozitivnih tumorskih jezgri kao 0, ako nema bojanja niti jedne jezgre; 1, <1/100; 2, 1/100 do 1/10; 3, 1/10 do 1/3; 4, 1/3 do 2/3 i 5, >2/3. Ukupan rezultat se dobio zbrajanjem vrijednosti

dobivenih za intenzitet i udjela jezgara koje se boje na ciklin D1, te su tako tumori svrstani u sljedeće kategorije: negativni ili sa slabom ekspresijom (ukupan zbroj 0-2), umjerena ekspresija (ukupan zbroj 3-5) i snažna ekspresija (ukupan zbroj 6-8).

Ki-67 antigen je nuklearni protein koji se koristi kao marker stanične proliferacije. Evaluacija Ki-67 imunohistokemijske reakcije napravljena je prema radu Reis-Filho i suradnika (77). Ako je <10% tumorskih jezgri bilo pozitivno onda se tumor svrstao u skupinu nisko proliferativnih karcinoma. Srednje proliferirajući tumori su oni koji su imali od 10-30% jezgri pozitivnih na Ki-67, a visoko proliferirajuće neoplazme oni tumori koji imaju >30% tumorskih jezgri pozitivnih na Ki-67.

3. 4. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

FISH analiza za HER-2 (ujedno i status 17. kromosoma), EGFR i ciklin D1 napravljena je prema preporuci proizvođača proba, Abbott (Vysis, Downers Grove, IL, SAD). Korištene probe proizvođača, Abbott Vysis, uz gen koji se ispituje hibridiziraju i na odgovarajuću kontrolnu regiju kromosoma (HER-2/Centromere 17 (PathVysion); EGFR (LSI EGFR SpectrumOrange)/centromere 7 (CEP 7 SpectrumGreen); CCND1 (LSI Cyclin D1 SpectrumOrange)/centromere 11 (CEP11 SpectrumGreen). Ukratko, 3-4µm debeli TMA rezovi se prebace na stakla sa pozitivno nabijenom površinom (DakoREAL™, Glostrup, Danska) i ostave se preko noći u termostatu na 56°C, zatim se deparafiniziraju u zamjeni za ksilen (Xylene substitute, Shandon, UK), 3 puta po 10 minuta i dehidriraju u 100% etanolu (Kemig d.o.o., Sesvete, Hrvatska) (2 puta po 5 minuta). Nakon sušenja radi se pre-tretman, odnosno stakla se ostave 20 minuta u 0.2M

HCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska) na sobnoj temperaturi, potom se isperu u ddH₂O 3 minute zatim u 2xSSC, pH 7.0 (Vysis, Abbott Molecular Inc, IL, USA) 3 minute, te se nakon ispiranja urone u otopinu za pre-tretman (1M NaSCN, Vysis, Abbott Molecular Inc, IL, SAD) zagrijanu na 80°C na 30 minuta i potom ponovno isperu u ddH₂O 1 minutu i zatim u 2xSSC, pH 7.0, 2 puta po 5 minuta. Sa stakla se potom uklonio suvišak 2xSSC pufera i stakla su se uronila u proteaznu otopinu (0.5 mg/mL proteinaze u 0.9% NaCl, pH 2.0 puferu; Vysis, Abbott Molecular Inc, IL, SAD) zagrijanu na 37°C na točno 10 minuta te su se nakon digestije isprala u 2xSSC puferu, 2 puta po 5 minuta na sobnoj temperaturi i nakon ispiranja proteinaze stakla su se ostavila sušiti 15-ak minuta. Nakon sušenja stakla su se dehidrirala po 1 minutu u 70%, 85% i 100% etanolu i potom su se ostavila da ostatak etanola evaporira. Zatim se na staklo nanijelo 10µL odgovarajuće probe, proba i tkivo se prekrilo pokrovnicom i potom su se stakla ostavila u hibridizatoru (HYBrite™, Vysis, IL, SAD) preko noći na 37°C (otprilike 14-18 sati). Prethodno se hibridizator programira na sljedeći način: denaturacija 95°C na 5 minuta i hibridizacija 37°C preko noći. Sutradan se uklonila pokrovnica, proba se isprala u post-hibridizacijskom puferu, pH 7.0-7.5 (2XSSC / 0.3% NP-40), zagrijanom na 72°C na 2 minute i nakon sušenja nanijela se boja za jezgre, DAPI (Vysis, Downers Grove, IL, SAD) te su se potom preparati analizirali pod fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX50, Tokyo, Japan) sa odgovarajućim filterima (Spectrum Orange, Spectrum Green i za DAPI). Odabrana područja na pojedinim preparatima su se i slikovno dokumentirala pomoću programa CytoVision (Applied Imaging, San Jose, CA, SAD).

3. 4. 1. Evaluacija FISH preparata

Za analizu statusa HER-2 gena određen je omjer zbroja HER-2 signala i kontrolnih CEP17 (kontrolna proba na centromeri 17. kromosoma) signala na ukupno 20 jezgara tumorskih stanica (po uputi proizvođača PathVysion kit-a; Vysis, Downers Grove, IL, SAD). Amplifikacija se definira kao omjer >2.2 , a amplifikacije HER-2 gena nema ako je omjer <1.8 . Ukoliko je omjer između $1.8 - 2.2$ onda se radi o graničnom omjeru.

Referentne vrijednosti broja kopija kromosoma 17 (dobiven određivanjem broja signala vezanih za centromeru 17. kromosoma iz HER-2 kita, CEP17 kontrolna proba) usvojene su iz rada Hyun i suradnika (38), tako da se uzorci sa brojem signala od 1.25 do 2.25 definiraju kao disomija 17. kromosoma, a aneusomija 17. kromosoma se definira ili kao monosomija 17. (<1.25 signala po stanici) ili polisomija 17. (>2.25 signala po stanici).

Analiza statusa EGFR i CCND1 gena napravljena je na sljedeći način: brojali su se signali vezani uz ispitivani gen i kontrolni centromerni signali (CEP) te se računao omjer između onkogeno/centromere (na ukupno 20 tumorskih jezgri). Ukoliko je taj rezultat bio ≥ 2.2 onda se smatralo da taj tumor ima amplifikaciju ispitivanog gena (96), a ako je taj rezultat bio <2.2 onda se smatralo da taj tumor nema amplifikaciju ispitivanog gena.

3. 5. Statistička obrada podataka

Statistička analiza je provedena u PowerMarker i R statističkim alatima, a pripreme, prilagodbe i finalno kreiranje tablica izvršeno je u MS Excel softveru.

Prvi dio provedene analize podataka sastojao se u određivanju frekvencija kategorički definiranih patofizioloških parametara prema kategoriji imunohistokemije i amplifikacije promatranih gena. Uparivanje parametara izvršeno je koristeći softverski paket PowerMarker 3.0 (97). Obzirom da su podaci kategoričkog tipa nisu se određivale srednje vrijednosti niti standardne devijacije već se direktno pristupilo sastavljanju kontingencijskih tablica. Statistička značajnost je mjerena korištenjem Chi-kvadrat testa. Međutim, za pojedine parametre kod kojih je ukupan broj observacija ili mjerenja bio manji od 30, ili ako su jedna ili više očekivanih vrijednosti u kontingencijskoj tablici ispod 5 (Cochranovo pravilo), korišten je Fisher-ov točni test. Korišten je 95%-tni interval pouzdanosti dok je kod uparenih parametara primjenjena Bonferronijeva korekcija praga statističke značajnosti. Svi testovi su bili dvosmjerni.

U drugom dijelu provedena je analiza preživljavanja korištenjem Kaplan-Meierove metode. Sveukupno preživljenje je izraženo kao broj mjeseci koji je protekao od dijagnoze bolesti do smrti uzrokovane tom bolešću ili prestankom praćenja grupe pacijenata. Testiranje značajnosti između krivulja sveukupnog preživljavanja provedeno je koristeći log-rank test značajnosti. Povrh utjecaja pojedinih kategoričkih čimbenika na preživljavanje izvršena je korelacija svih čimbenika prema sveobuhvatnom preživljavanju te podrgrnuta jednosmjernom Fisherovom točnom testu kako bi se utvrdilo da li korelacija smanjuje ili povećava preživljavanje. Na kraju je izvršena multivarijantna regresijska analiza u svrhu izrade modela preživljavanja. Za regresijsku

analizu je korišten Coxov proporcionalni rizični model regresije kao najučestaliji oblik modeliranja preživljavanja. Jednovarijantnom Coxovom analizom izvršen je test nezavisnosti prognostičkih faktora te njihove linearnosti tj. proporcionalnosti koristeći se analizom statističke značajnosti i Schoenfeldovih ostataka. Na taj način je utvrđena potreba za faktorizacijom pojedinih kategorija parametara te njihovo uključivanje kao nove individualne varijable u viševarijabilni model. Usporedba različitih jednovarijabilnih i viševarijabilnih modela izvršena je koristeći Akaike informacijski kriterij (AIC). AIC omogućuje odabir modela prema objektivnim kriterijima i u slučajevima kada je riječ o vrlo zamršenim i složenim pojavama, koje obuhvaćaju velik broj informacija, parametara. Odabir najprilagođenijeg modela sveobuhvatnog preživljavanja praćenih pacijenata izvršen je koristeći funkciju za izračun AIC kriterija u koracima MASS biblioteke R statističkog paketa koja je omogućila automatizirani postupak odabira najprilagođenijeg modela.

4. REZULTATI

4. 1. Analiza HER-2 imunohistokemije i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima

Tijekom imunohistokemijskih i FISH analiza dio TMA tumorskih cilindara je ili otpao, ili se raskomadao, ili nije bilo optimalno nabodeno područje invazivnog tumora ili je FISH analiza pokazivala suboptimalnu hibridizaciju zbog nedovoljno duge proteinske digestije te je stoga ukupan broj evaluiranih uzoraka kod pojedinih analiza bio različit.

Ukupno je 116 uzoraka bilo adekvatno za evaluaciju HER-2 imunohistokemijske analize. HER-2 imunohistokemija je pokazala sljedeće rezultate: 71 (61.20%) uzorak je bio HER-2 negativan, 18 (15.51%) uzoraka je bilo 1+ HER-2, 11 (9.48%) ih je bilo 2+ HER-2, a 16 (13.79%) je bilo 3+ HER-2 (Tablica 5).

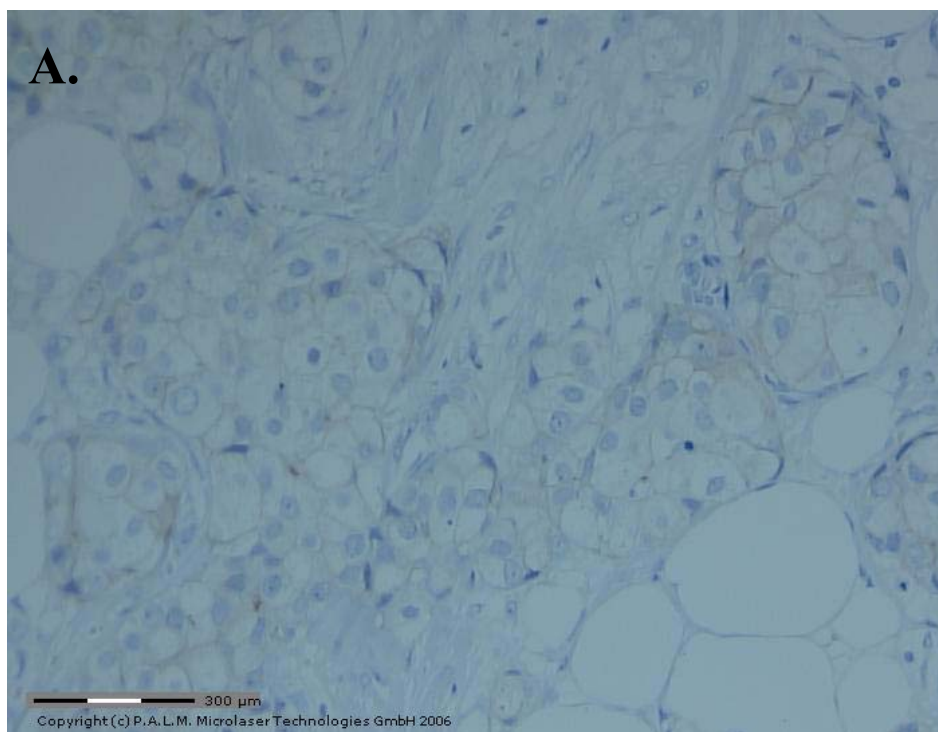
Kada je HER-2 proteinska ekspresija uspoređena sa patohistološkim i preostalim parametrima ispitivanim u ovoj studiji pronađene su sljedeće statistički značajne korelacije: HER-2 imunohistokemija je pokazala obrnuto proporcionalnu korelaciju sa ER ($p=0.0192$), PR ($p=0.0496$), direktnu korelaciju sa polisomijom 17. kromosoma ($p=0.0081$), a Ki-67 je bio na granici statističke značajnosti ($p=0.0551$) (Tablica 5). Ostale korelacije nisu bile statistički značajne (Tablica 5) (Slika 9.).

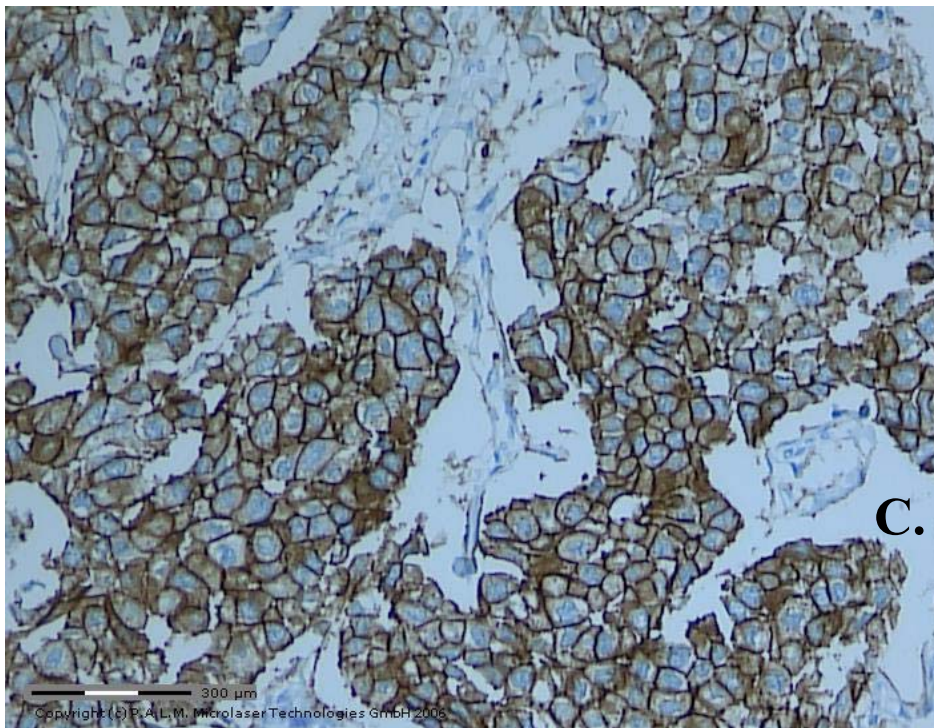
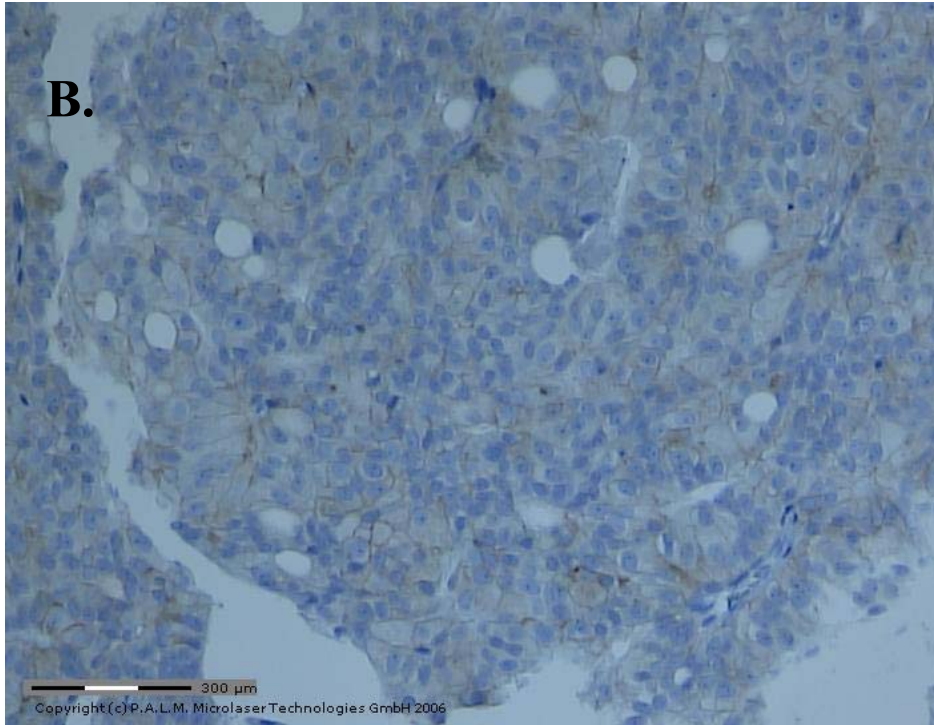
Tablica 5. HER-2 proteinska ekspresija u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa patohistološkim parametrima, EGFR-om i ciklinom D1

Parametri	N	NA	HER-2 0	HER-2 1+	HER-2 2+	HER-2 3+	Fisherov točni test (p)
Ukupno	116	2	71	18	11	16	
Veličina tumora	116	2					0.9592
T1 (≤ 2 cm)			38	10	6	8	
T2 (2 - 5 cm)			29	6	4	7	
T3 (> 5 cm)			4	2	1	1	
Histološki stupanj	116	2					0.3173
I			20	6	3	1	
II			38	9	6	8	
III			13	3	2	7	
Limfni čvorovi (metastaze)	116	2					0.4458
0			39	10	5	9	
1-3			11	3	5	2	
≥ 4			21	5	1	5	
ER	116	2					0.0192
-			24	8	3	12	
+			47	10	8	4	
PR	116	2					0.0496
-			22	6	4	11	
+			49	12	7	5	
NPI	114	4					0.9796
Dobar (< 3.4)			37	10	5	6	
Umjereno dobar (3.4-5.4)			19	4	3	5	
Loš (> 5.4)			15	4	2	4	
LVI	83	35					0.4531
-			12	3	4	3	
+			34	13	4	10	
Ki-67	112	6					0.0551
$< 10\%$			32	6	7	3	
10-30%			26	8	0	8	
$> 30\%$			12	3	3	4	
Kromosom 17	115	3					0.0081
Monosomija			2	0	0	0	
Disomija			61	12	4	12	
Polisomija			8	6	6	4	
nEGFR	112	6					0.6488
0 negativno			41	11	6	9	
+ slabo pozitivno			16	4	3	2	
++ umjereno pozitivno			6	0	1	0	
+++ jako pozitivno			7	2	0	4	

mEGFR	112	6					0.9446
0			62	16	9	13	
1+			6	1	1	2	
2+			1	0	0	0	
3+			1	0	0	0	
EGFR gen	110	8					0.2404
Nema amplifikacije			68	17	8	15	
Amplifikacija			1	0	1	0	
Ciklin D1	112	6					0.5691
Negativno/slabo pozitivno			7	0	2	1	
Umjereno pozitivno			19	4	2	6	
Snažno pozitivno			44	13	6	8	
CCND1 gen	112	6					0.9062
Nema amplifikacije			61	15	8	13	
Amplifikacija			9	2	2	2	

N- broj ispitivanih uzoraka, NA- nema podataka, ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI- Nottingham prognostički index, LVI-limfovaskularna invazija, nEGFR- nuklearni EGFR, mEGFR-membranski EGFR, CCND1-ciklin D1 gen.





Slika 9. Invazivni duktalni karcinom dojke, HER-2 imunohistokemijsko bojanje A.) tumorsko tkivo sa slabim inkompletnim membranskim bojanjem, 1+ HER-2; B.) uzorak sa snažnim, kompletnim, homogenim membranskim bojanjem u $\leq 30\%$ stanica, 2+ HER-2; C.) tumorsko tkivo sa snažnim i kompletnim membranskim bojanjem $>30\%$ stanica, 3+ HER-2. Povećanje 200x.

4. 2. Status HER-2 gena u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima

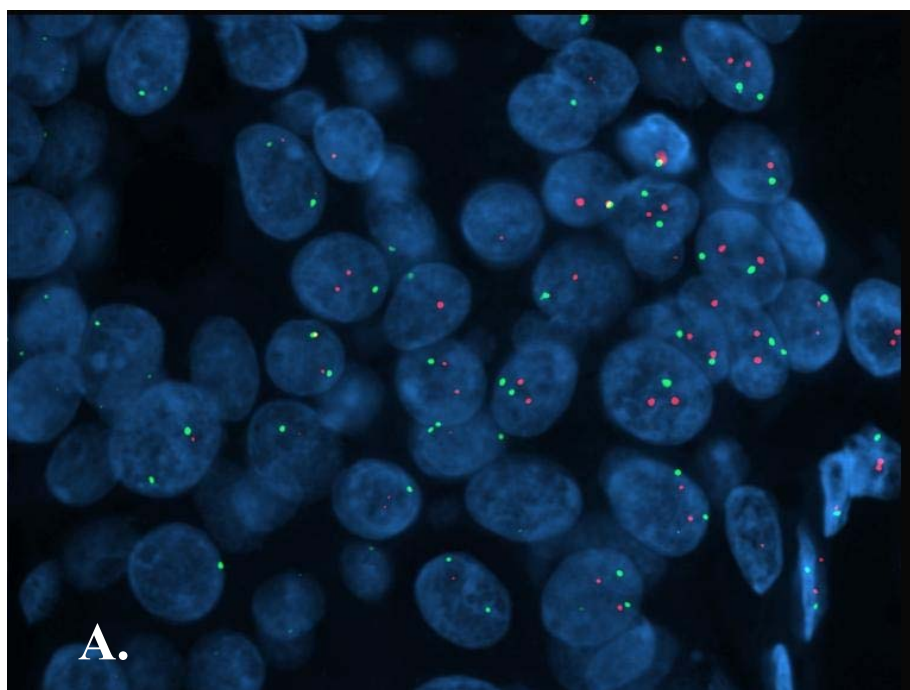
Od ukupno 116 tumora HER-2 FISH analiza je pokazala da je HER-2 gen amplificiran kod ukupno 21 (18.10%) uzorka dok preostalih 95 (81.89%) nije imalo amplifikaciju HER-2 gena (Tablica 6) (Slika 10.). HER-2 amplifikacija gena je pokazala obrnuto proporcionalnu korelaciju sa histološkim stupnjem ($p=0.0214$), ER ($p=0.0013$), PR ($p=0.0263$) i proporcionalnu korelaciju sa Ki-67 ($p=0.0360$) (Tablica 6). Ostale korelacije između statusa HER-2 gena i ispitivanih patohistoloških parametara nisu bile statistički značajne (Tablica 6).

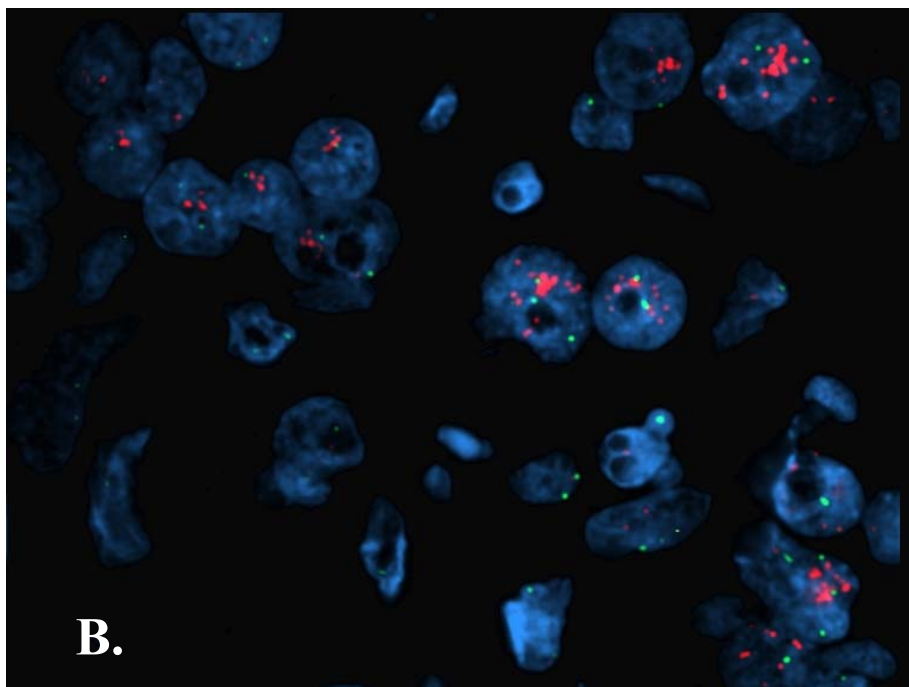
Tablica 6. Status HER-2 gena u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa patohistološkim parametrima, EGFR-om i ciklinom D1

Parametri	N	NA	HER-2 Nema amplifikacije	HER-2 Amplifikacija	Fisherov točni test (p)
Ukupno	116	2	95	21	
Veličina tumora	116	2			0.857
T1 (≤ 2 cm)			52	11	
T2 (2 - 5 cm)			36	10	
T3 (> 5 cm)			6	1	
Histološki stupanj	116	2			0.0214
I			29	2	
II			49	11	
III			16	9	
Limfni čvorovi (metastaze)	116	2			0.7693
0			52	11	
1-3			16	5	
≥ 4			26	6	
ER	116	2			0.0013
-			31	16	
+			63	6	
PR	116	2			0.0263
-			30	13	
+			64	9	
NPI	115	3			0.5975
Dobar (< 3.4)			50	9	
Umjereno dobar (3.4-5.4)			25	6	
Loš (> 5.4)			19	6	
LVI	82	36			0.5506
-			16	6	
+			48	12	
Ki-67	113	5			0.0360
$< 10\%$			44	5	
10-30%			34	8	
$> 30\%$			14	8	
Kromosom 17	116	2			0.1299
Monosomija			2	0	
Disomija			76	14	
Polisomija			16	8	
nEGFR	113	5			0.3128
0 negativno			53	14	
+ slabo pozitivno			23	3	
++ umjereno pozitivno			7	0	
+++ jako pozitivno			9	4	

mEGFR	112	6			0.6042
0			82	18	
1+			7	3	
2+			1	0	
3+			1	0	
EGFR gen	110	8			0.3468
Nema amplifikacije			88	20	
Amplifikacija			1	1	
Ciklin D1	113	5			0.1826
Negativno/slabo pozitivno			7	3	
Umjereno pozitivno			23	8	
Snažno pozitivno			62	10	
CCND1 gen	112	6			0.7327
Nema amplifikacije			78	19	
Amplifikacija			13	2	

N- broj ispitivanih uzoraka, NA- nema podataka, ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI-Nottingham prognostički index, LVI – limfovaskularna invazija, nEGFR- nuklearni EGFR, mEGFR-membranski EGFR, CCND1-ciklin D1 gen.





Slika 10. HER-2 FISH analiza, A.) uzorak koji nema amplifikaciju HER-2 gena (omjer HER-2/CEP17 < 1.8) i B.) uzorak sa HER-2 amplifikacijom (omjer HER-2/CEP17 > 2.2), povećanje 1000x. U oba uzorka prisutna je disomija 17 kromosoma.

4. 3. Polisomija kromosoma 17 u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima

FISH HER-2 analiza je također omogućila istovremenu evaluaciju statusa kromosoma 17. U istoj ispitivanoj skupini tumora, od ukupno 116 uzoraka, 24 (20.68%) su imala polisomiju kromosoma 17, 2 (1.72%) tumora su imala monosomiju, a preostalih 90 (77.58%) uzoraka je imalo normalan broj kromosoma 17 (disomiju) (Tablica 7). Od

ukupnog broja tumora sa polisomijom 17 njih 7 (29.17%) je imalo amplifikaciju HER-2 gena, 17 (70.83%) ih je bilo bez amplifikacije HER-2 gena (Tablica 7).

Gledajući imunohistokemijske rezultate 8 uzoraka sa polisomijom 17 je bilo HER-2 negativno (0), dok je 16 uzoraka sa HER-2 ekspresijom (zajedno 1+, 2+, 3+ HER-2) imalo polisomiju kromosoma 17 (Tablica 7).

Polisomija kromosoma 17 nije pokazala statistički značajnu korelaciju sa patohistološkim parametrima osim što se uočila granična korelacija sa Ki-67 ($p=0.0631$) i statistički značajna korelacija sa HER-2 proteinskom ekspresijom ($p=0.081$) (Tablica 7).

Tablica 7. Polisomija kromosoma 17 u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa patohistološkim parametrima

Parametri	N	NA	Kromosom 17			Fisherov točni test (p)
			Monosomija	Disomija	Polisomija	
Ukupno	116	2	2	90	24	
Veličina tumora	116	2				0.3024
T1 (≤ 2 cm)			1	53	9	
T2 (2 – 5 cm)			1	32	13	
T3 (> 5 cm)			0	5	2	
Histološki stupanj	116	2				0.1963
I			0	28	3	
II			1	45	14	
III			1	17	7	
Limfni čvorovi (metastaze)	116	2				0.7685
0			1	50	12	
1-3			0	15	6	
≥ 4			1	25	6	
ER	116	2				0.3657
-			0	35	12	
+			2	55	12	
PR	116	2				0.1111
-			0	30	13	
+			2	60	11	

NPI	115	3				0.5194
Dobar (< 3.4)			1	48	10	
Umjereno dobar (3.4-5.4)			0	24	7	
Loš (>5.4)			1	17	7	
LVI	82	36				0.6689
-			1	16	5	
+			1	45	14	
Ki-67	113	5				0.0631
<10%			1	39	9	
10-30%			1	36	5	
>30%			0	13	9	
HER-2	116	2				0.0081
0			2	62	8	
1+			0	12	6	
2+			0	4	6	
3+			0	12	4	
HER-2 gen	116	2				0.1299
Nema amplifikacije			2	76	17	
Amplifikacija			0	14	7	

N- broj ispitivanih uzoraka, NA- nema podataka, ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI- Nottingham prognostički index, LVI-limfovaskularna invazija.

4. 4. Patohistološke karakteristike tumora sa polisomijom 17

Da bi utvrdili da li se kliničko-patohistološke karakteristike tumora sa polisomijom 17 u odsutnosti HER-2 amplifikacije razlikuju od tumora sa HER-2 amplifikacijom i da li su sličniji po tome tumorima koji imaju normalan status HER-2 gena tumore smo razvrstali u 3 skupine: HER-2 negativni tumori (normalan HER-2 gen i broj kromosoma 17), tumori sa polisomijom 17 (polisomija 17 u odsutnosti HER-2 amplifikacije) i HER-2 pozitivni tumori (HER-2 amplifikacija bez polisomije 17).

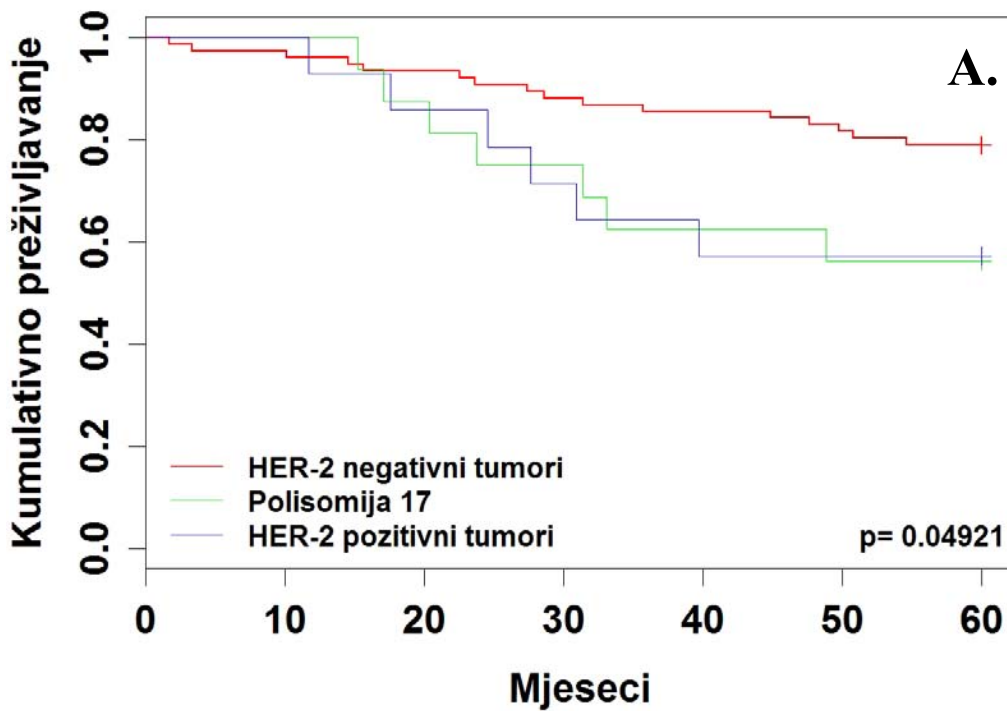
HER-2 pozitivni tumori u usporedbi sa HER-2 negativnim tumorima su bili u pravilu češće višeg histološkog stupnja ($p=0.0478$) i negativnih ER ($p=0.0144$) (Tablica 8).

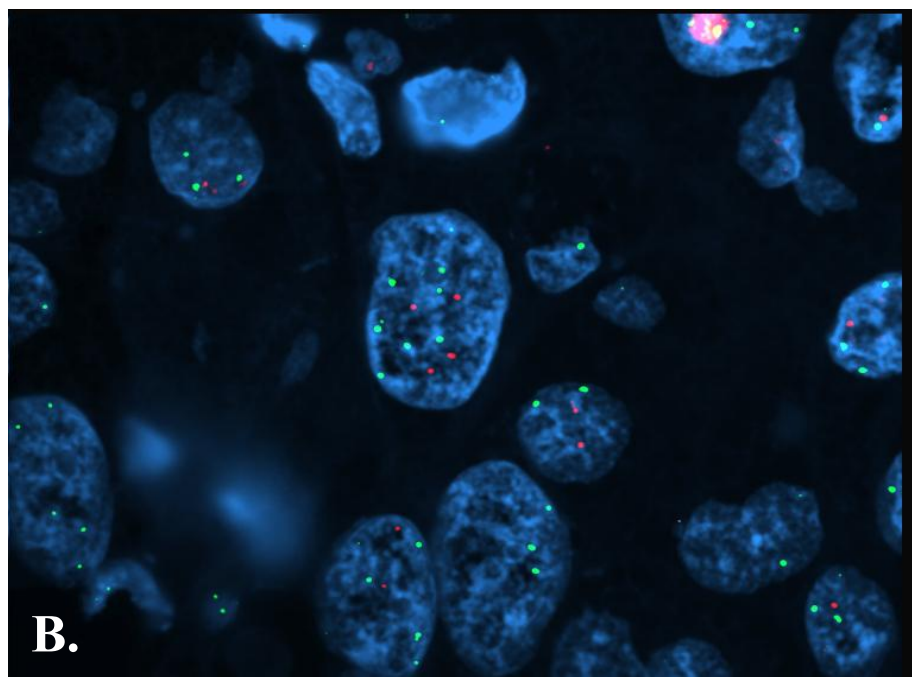
Tablica 8. Distribucija patohistoloških karakteristika u tumorima sa polisomijom 17 u usporedbi sa HER-2 negativnim i HER-2 pozitivnim tumorima

Parametri	HER-2 negativni tumori		Kromosom 17 polisomija		HER-2 pozitivni tumori	
	N	p*	N	p*	N	p*
Veličina tumora		0.2018		0.4642		0.8025
T1 (≤ 2 cm)	45		6		8	
T2 (2 - 5 cm)	26		9		6	
T3 (> 5 cm)	5		1		0	
Histološki stupanj		0.3422		0.6159		0.0478
I	26		3		2	
II	39		9		6	
III	11		4		6	
Limfni čvorovi (metastaze)		1		1		1
0	42		9		8	
1-3	13		3		2	
≥ 4	21		4		4	
ER		0.7747		0.0813		0.0143
-	25		6		10	
+	51		10		4	
PR		0.3800		1		0.2163
-	23		7		7	
+	53		9		7	
NPI		0.6172		1		0.7784
Dobar (< 3.4)	42		7		6	
Umjereno dobar (3.4-5.4)	20		5		4	
Loš (> 5.4)	14		4		3	
LVI		0.4926		0.6447		1
-	13		2		3	
+	36		11		9	
Ki-67		0.3384		0.4153		0.4078
$< 10\%$	35		8		4	
10-30%	29		4		7	
$> 30\%$	10		4		3	

* Fisherov točni test; N- broj ispitivanih uzoraka, ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI- Nottingham prognostički index, LVI-limfovaskularna invazija, HER-2 negativni tumori (normalan HER-2 gena i broj kromosoma 17), Kromosm 17 polisomija (polisomija 17 u odsutnosti HER-2 amplifikacije), HER-2 pozitivni tumori (HER-2 amplifikacija bez polisomije 17).

Uspoređujući tumore sa polisomijom 17 i HER-2 pozitivnim tumorima nismo pronašli statistički značajne razlike za nijedan patohistološki parametar, a isti rezultat je bio i kada smo ih usporedili sa HER-2 negativnim tumorima (Tablica 8). Međutim Kaplan-Meier krivulje preživljenja su pokazale da HER-2 pozitivni tumori imaju statistički značajno kraće kumulativno preživljenje u usporedbi sa HER-2 negativnim tumorima ($p=0.0492$), a tumori sa polisomijom 17 su imali sličnu krivulju preživljenja kao HER-2 pozitivni tumori (Slika 11.).

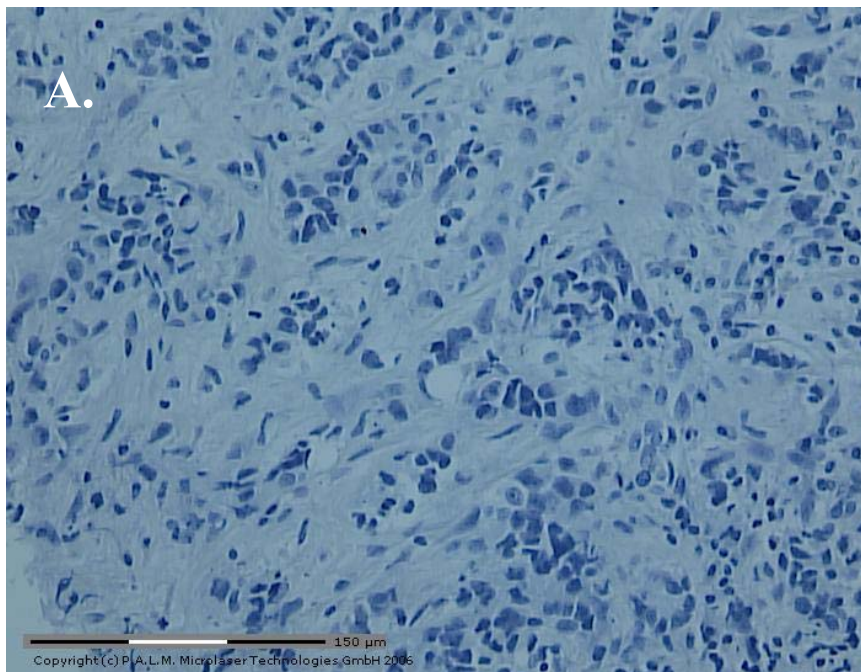


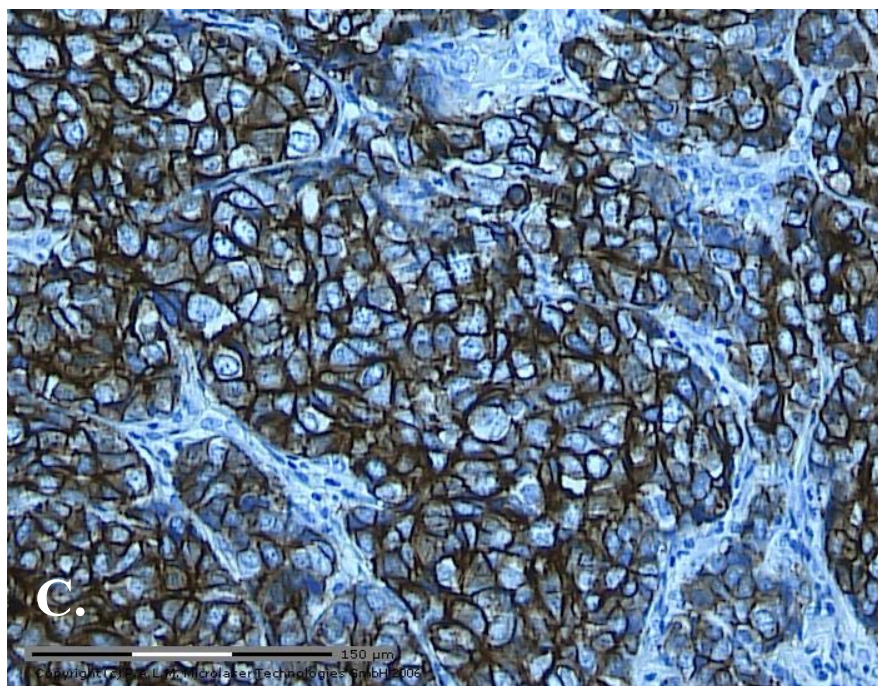
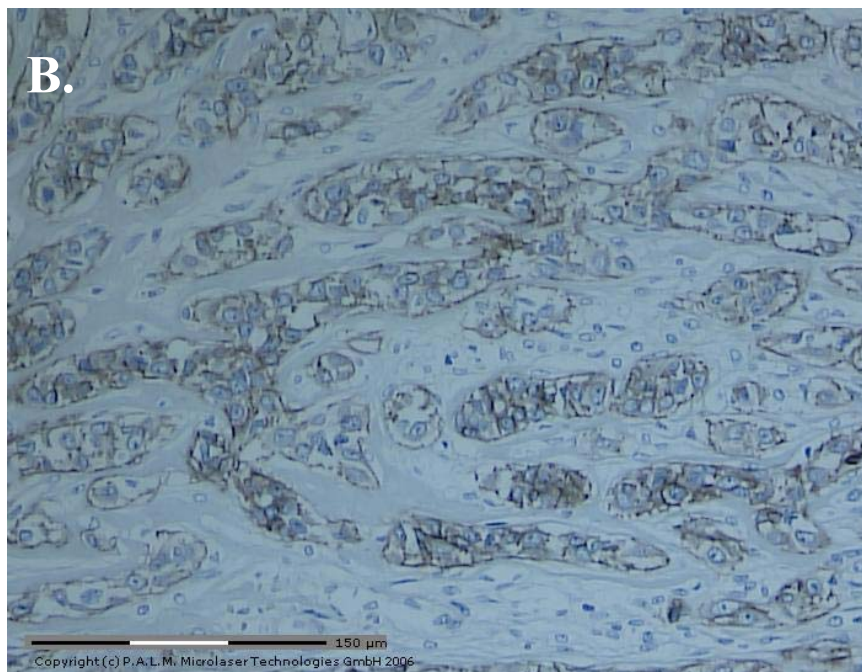


Slika 11. A.) Kaplan-Meier krivulje preživljenja prikazuju kraće sveukupno preživljenje pacijenata sa HER-2 tumorima i polisomijom 17 u usporedbi sa HER-2 negativnim tumorima B.) FISH HER-2 analiza također omogućuje evaluaciju broja 17 kromosoma (vidi Materijale i metode pod 3. 4. 1. Evaluacija FISH preparata), primjer uzorka tumora sa polisomijom 17 kromosoma (centralno postavljena tumorska stanica sa 8 zelenih signala koji predstavljaju CEP17 kontrolnu probu), povećanje 1000x.

4. 5. Evaluacija mEGFR imunohistokemijske analize i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima

Ukupno 112 uzoraka je bilo adekvatno za evaluaciju mEGFR imunohistokemijske analize (razlozi navedeni pod 4.1.). Od ukupno 112 uzoraka evaluiranih na bojanje protutijelima specifičnim za mEGFR, 100 (89.28%) ih je bilo mEGFR negativno, 10 (8.92%) je bilo klasificirano kao 1+ mEGFR, 1 (0.89%) uzorak je bio 2+ mEGFR i također 1 (0.89%) je bio klasificiran kao 3+ mEGFR (Tablica 9) (Slika 12.).





Slika 12. Invazivni duktalni karcinom dojke, mEGFR imunohistokemijsko bojanje A.) tumorsko tkivo bez membranskog EGFR bojanja; 0 mEGFR, B.) uzorak sa slabim do umjerenim potpunim membranskim bojanjem na EGFR; 2+ mEGFR, C.) tumorsko

tkivo sa snažnim i kompletnim membranskim bojanjem na EGFR; 3+ mEGFR.
Povećanje 200x.

Koreliranjem mEGFR sa patohistološkim i parametrima ispitivanim u ovoj studiji utvrđene su sljedeće statistički značajne korelacije: sa histološkim stupnjem ($p=0.00001$), inverzna korelacija sa ER ($p=0.00001$), PR ($p=0.00008$), Ki-67 ($p=0.00168$) i ciklinom D1 ($p=0.0201$) (Tablica 9). Preostale korelacije nisu bile statistički značajne (Tablica 9).

Tablica 9. mEGFR proteinska ekspresija u invazivnom raku dojke i korelacije sa patohistološkim parametrima, HER-2 i ciklinom D1

Parametri	N	NA	mEGFR 0	mEGFR 1+	mEGFR 2+	mEGFR 3+	Fisherov točni test (p)
Ukupno	112	6	100	10	1	1	
Veličina tumora	112	6					0.2391
T1 (≤ 2 cm)			57	3	0	1	
T2 (2 - 5 cm)			37	7	1	0	
T3 (> 5 cm)			6	0	0	0	
Histološki stupanj	112	6					<0.00001
I			29	1	0	0	
II			57	1	0	0	
III			14	8	1	1	
Limfni čvorovi (metastaze)	112	6					0.4176
0			53	5	1	1	
1-3			21	0	0	0	
≥ 4			26	5	0	0	
ER	112	6					<0.00001
-			34	10	1	1	
+			66	0	0	0	
PR	112	6					<0.00001
-			31	9	1	1	
+			69	1	0	0	

NPI	111	7					0.1208
Dobar (< 3.4)			53	2	0	1	
Umjereno dobar (3.4-5.4)			26	4	1	0	
Loš (>5.4)			20	4	0	0	
LVI	79	39					0.2223
-			20	0	0	1	
+			51	6	1	0	
Ki-67	112	6					0.0016
<10%			47	1	0	0	
10-30%			38	3	1	0	
>30%			15	6	0	1	
HER-2	112	6					0.9446
0			62	6	1	1	
1+			16	1	0	0	
2+			9	1	0	0	
3+			13	2	0	0	
HER-2 gen	112	6					0.6042
Nema amplifikacije			82	7	1	1	
Amplifikacija			18	3	0	0	
Ciklin D1	112	6					0.0201
Negativno/slabo pozitivno			6	4	0	0	
Umjereno pozitivno			28	3	0	0	
Snažno pozitivno			66	3	1	1	
CCND1 gen	112	6					0.1221
Nema amplifikacije			86	10	1	0	
Amplifikacija			14	0	0	1	
nEGFR	112	6					0.9158
0 negativno			57	8	1	1	
+ slabo pozitivno			24	1	0	0	
++ umjereno pozitivno			7	0	0	0	
+++ jako pozitivno			12	1	0	0	

N- broj ispitivanih uzoraka, NA- nema podataka, ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI-Nottingham prognostički index, LVI – limfovaskularna invazija, nEGFR- nuklearni EGFR, mEGFR-membranski EGFR, CCND1-ciklin D1 gen.

4. 6. Status EGFR gena i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima

Na ukupno 110 uzoraka bilo je moguće učiniti evaluaciju statusa EGFR gena (razlozi navedeni pod 4.1.). Analiza statusa EGFR gena FISH analizom pokazala je

amplifikaciju u samo 2 (1.8%) tumora dok u preostalih 108 (98.18%) nije bilo amplifikacije EGFR gena (Tablica 10) (Slika 13).

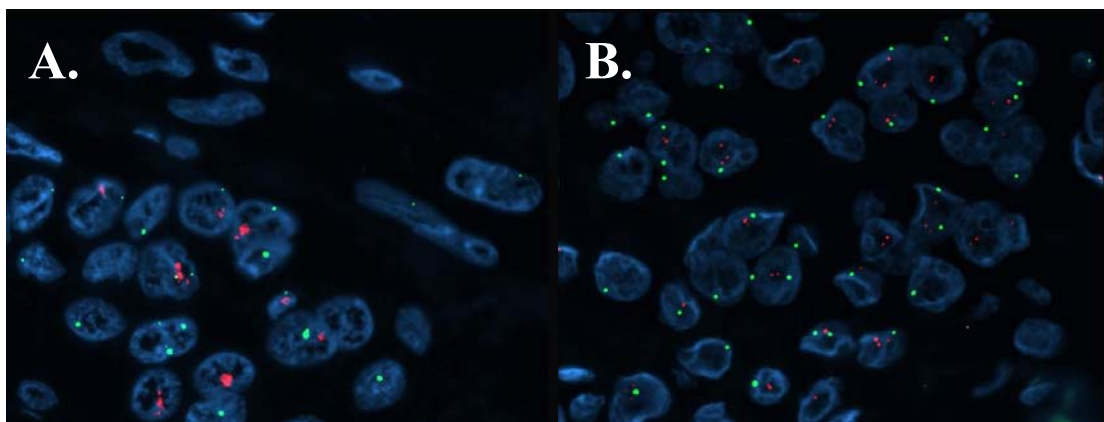
Koreliranjem statusa EGFR gena sa patohistološkim i parametrima ispitivanim u ovoj studiji utvrđena je korelacija sa histološkim stupnjem ($p=0.0460$) i sa Ki-67 ($p=0.0350$), dok preostale korelacije nisu bile statistički značajne (Tablica 10).

Tablica 10. Status EGFR gena u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa patohistološkim parametrima, HER-2 i ciklinom D1

Parametri	N	NA	EGFR Nema amplifikacije	EGFR Amplifikacija	Fisherov točni test (p)
Ukupno	110	8	108	2	
Veličina tumora	110	8			1
T1 (≤ 2 cm)			58	1	
T2 (2 - 5 cm)			44	1	
T3 (> 5 cm)			6	0	
Histološki stupanj	110	8			0.0460
I			30	0	
II			56	0	
III			22	2	
Limfni čvorovi (metastaze)	110	8			1
0			57	1	
1-3			21	0	
≥ 4			30	1	
ER	110	8			0.1726
-			44	2	
+			64	0	
PR	110	8			0.1436
-			40	2	
+			68	0	
NPI	109	9			0.4725
Dobar (< 3.4)			53	1	
Umjereno dobar (3.4-5.4)			31	0	
Loš (> 5.4)			23	1	
LVI	78	40			0.4685
-			20	1	
+			56	1	

Ki-67	110	8			0.0350
<10%			47	0	
10-30%			42	0	
>30%			19	2	
HER-2	110	8			0.2404
0			68	1	
1+			17	0	
2+			8	1	
3+			15	0	
HER-2 gen	110	8			0.3468
Nema amplifikacije			88	1	
Amplifikacija			20	1	
Ciklin D1	110	8			0.2302
Negativno/slabo pozitivno			8	1	
Umjereno pozitivno			30	0	
Snažno pozitivno			70	1	
CCND1 gen	110	8			0.2552
Nema amplifikacije			94	1	
Amplifikacija			14	1	
nEGFR	110	8			1
0 negativno			65	2	
+ slabo pozitivno			23	0	
++ umjereno pozitivno			7	0	
+++ jako pozitivno			13	0	

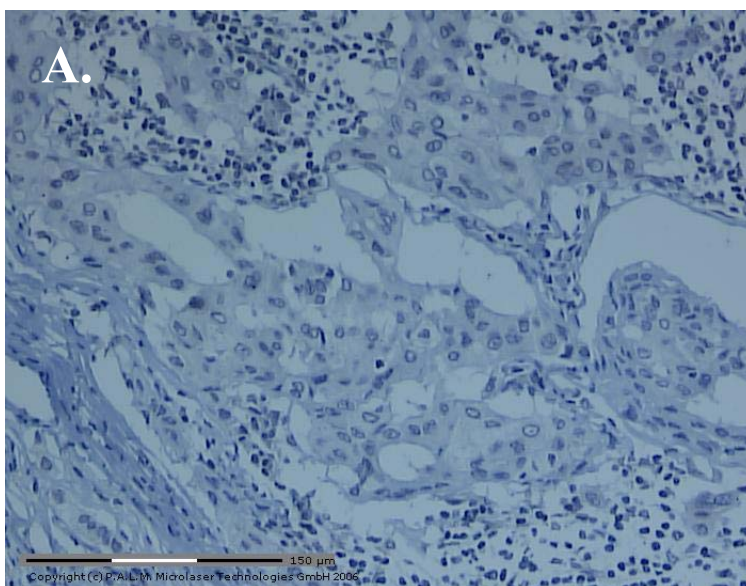
N- broj ispitivanih uzoraka, NA- nema podataka, ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI-Nottingham prognostički index, LVI – limfovaskularna invazija, nEGFR- nuklearni EGFR, CCND1-ciklin D1 gen.

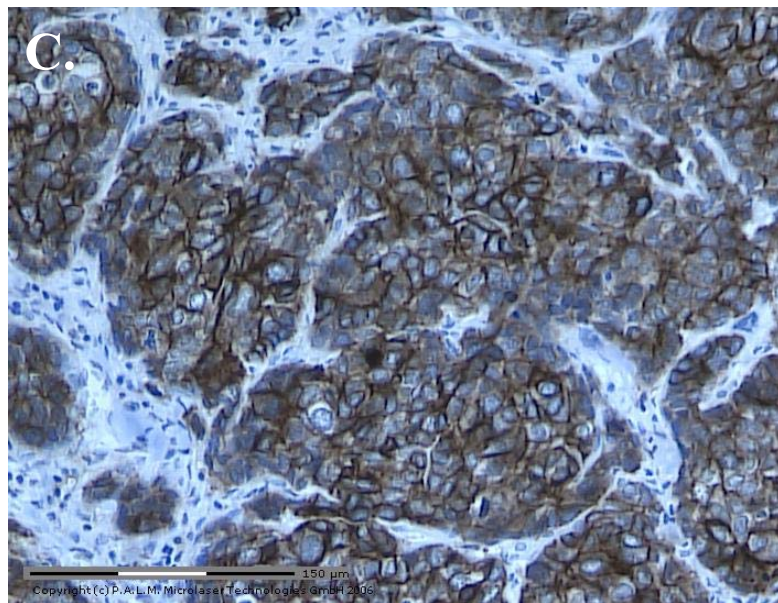
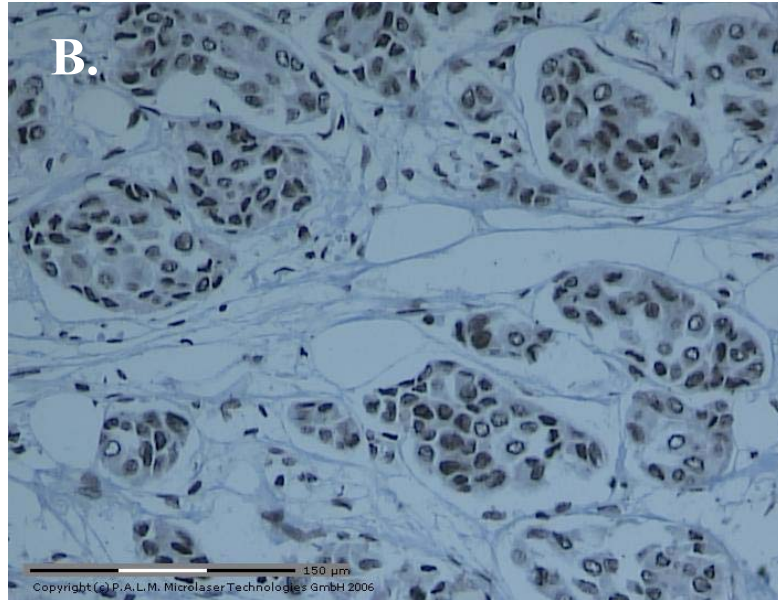


Slika 13. FISH analiza statusa EGFR gena u tumorskim stanicama, A.) uzorak pokazuje amplifikaciju EGFR gena, gen je jako amplificiran pa se vide nakupine probe specifične za EGFR tvoreći tvorbe koje se nazivaju «nakupine» (eng. clusters) B.) uzorak bez EGFR amplifikacije, povećanje 1000x.

4. 7. nEGFR u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima

Ukupno je bilo moguće evaluirati 113 tumora na nEGFR, ponovno zbog istih razloga navedenih pod 4.1. nEGFR je detektiran drugim tipom protutijela (Novocastra) koji prepoznaje COOH terminalni dio EGFR proteina za razliku od Dako protutijela korištenog za mEGFR evaluaciju koji detektira NH₂ kraj EGFR proteina. Od ukupno 113 tumora evaluiranih za nEGFR bojanje 67 (59.29%) ih je bilo negativno, 26 (23.00%) je bilo + nEGFR, 7 (6.19%) ih je bilo ++ nEGFR i 13 (11.50%) ih je bilo +++ nEGFR (Tablica 11) (Slika 14.).





Slika 14. nEGFR imunohistokemijsko bojanje, A.) Invazivni duktalni rak dojke koji nema nuklearne ekspresije nEGFR (0), B.) uzorak invazivnog duktalnog raka dojke koji pokazuje visoku imunoreaktivnost na nEGFR (+++), C.) tumor sa negativnom nEGFR ekspresijom (0) ali sa snažnim mEGFR bojanjem (3+) koji je u FISH analizi također pokazao i amplifikaciju EGFR gena. Povećanje 200x.

Dok je usporedba nEGFR sa ostalim patohistološkim parametrima pokazala korelaciju sa veličinom tumora ($p=0.0005$), metastazama u limfnim čvorovima ($p=0.0288$) i NPI ($p=0.0010$), ostale korelacije nisu imale statističku značajnost (Tablica 11). Međutim kada se ispitivana skupina tumora podijelila na premenopauzalnu i postmenopauzalnu grupu osim navedenih korelacija pronašla se i statistički značajna obrnutoproporcionalna korelacija nEGFR sa ER ($p=0.0258$) u premenopauzalnoj skupini (Tablica 11).

Tablica 11. nEGFR u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa patohistološkim parametrima, HER-2, mEGFR i ciklinom D1

Parametri	N	NA	nEGFR 0	nEGFR +	nEGFR ++	nEGFR +++	Fisherov točni test (p)
Ukupno	113	5	67	26	7	13	
Veličina tumora	113	5					0.0005
T1 (≤ 2 cm)			34	21	2	5	
T2 (2 - 5 cm)			32	5	3	5	
T3 (> 5 cm)			1	0	2	3	
Histološki stupanj	113	5					0.9409
I			18	8	2	3	
II			35	14	3	6	
III			14	4	2	4	

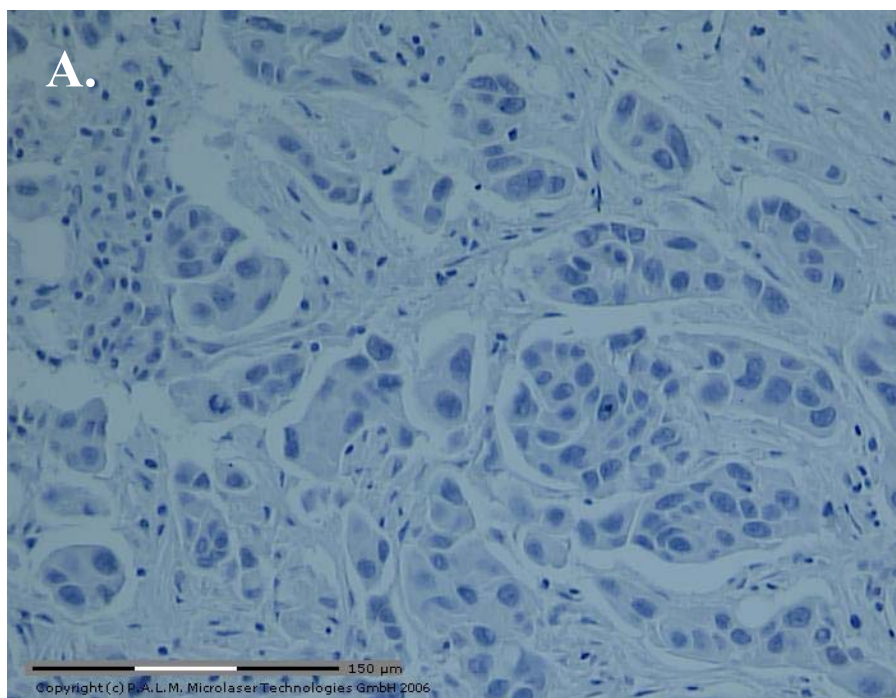
Limfni čvorovi (metastaze)	113	5					0.0288
0			37	19	3	2	
1-3			13	3	1	4	
≥4			17	4	3	7	
ER	113	5					0.4418
-			26	10	2	8	
+			41	16	5	5	
PR	113	5					0.2088
-			25	7	5	5	
+			42	19	2	8	
NPI	112	6					0.0010
Dobar (< 3.4)			34	17	3	3	
Umjereno dobar (3.4-5.4)			18	9	0	4	
Loš (>5.4)			14	0	4	6	
LVI	79	39					0.9653
-			13	5	1	2	
+			38	12	2	6	
Ki-67	113	5					0.3491
<10%			27	13	2	7	
10-30%			24	11	2	5	
>30%			16	2	3	1	
HER-2	112	6					0.6488
0			41	16	6	7	
1+			11	4	0	2	
2+			6	3	1	0	
3+			9	2	0	4	
HER-2 gen	113	5					0.3128
Nema amplifikacije			53	23	7	9	
Amplifikacija			14	3	0	4	
mEGFR	112	6					0.9158
0			57	24	7	12	
1+			8	1	0	1	
2+			1	0	0	0	
3+			1	0	0	0	
EGFR gen	110	8					1
Nema amplifikacije			65	23	7	13	
Amplifikacija			2	0	0	0	
Ciklin D1	113	5					0.5132
Negativno/slabo pozitivno			8	2	0	0	
Umjereno pozitivno			17	5	3	6	
Snažno pozitivno			42	19	4	7	
CCND1 gen	112	6					0.5569
Nema amplifikacije			59	22	5	11	
Amplifikacija			8	3	2	2	

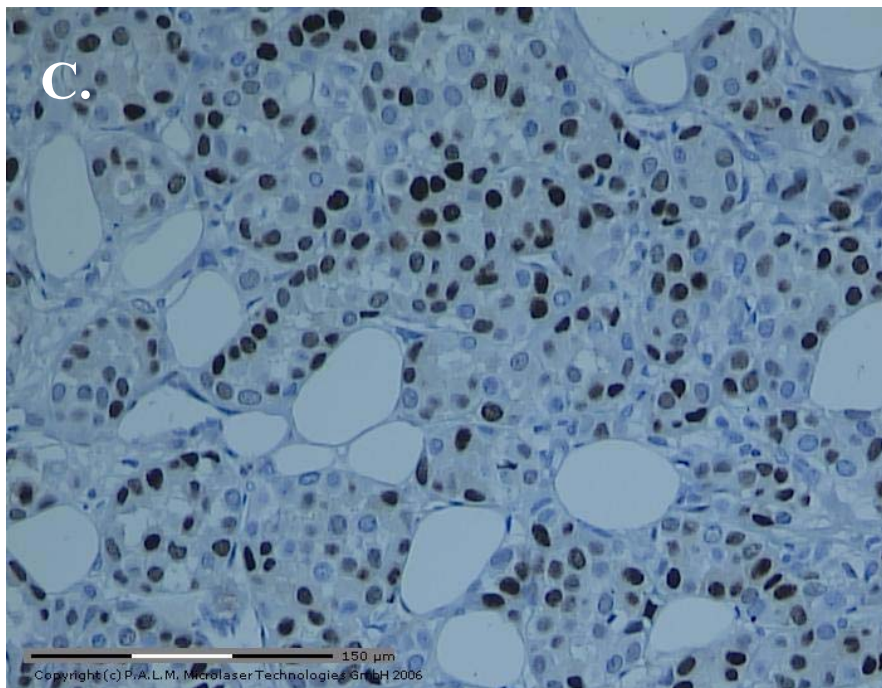
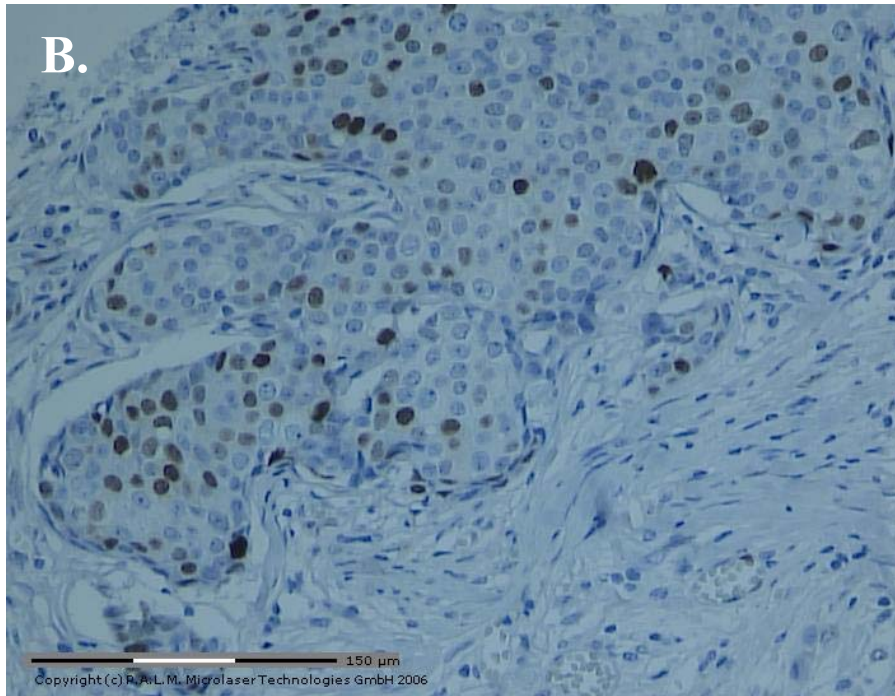
ER- premenopauza	54	5			0.0258
-		9	7	2	5
+		21	9	0	1

N- broj ispitivanih uzoraka, NA- nema podataka, ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI-Nottingham prognostički index, LVI – limfovaskularna invazija, nEGFR- nuklearni EGFR, mEGFR-membranski EGFR, CCND1-ciklin D1 gen.

4. 8. Analiza ciklin D1 ekspresije i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima

Ukupno 113 uzoraka je bilo dostupno za evaluaciju ciklin D1 ekspresije (razlozi navedeni pod 4.1.). Od analiziranih 113 uzoraka, 10 (8.84%) ih je bilo negativno odnosno pokazivalo slabu ekspresiju ciklin D1 proteina, 31 (27.43%) uzorak je bio umjereno pozitivan na ciklin D1, a 72 (63.71%) uzorka su imala snažnu ekspresiju ciklin D1 proteina prema Allred bodovanju (vidi Materijale i metode pod 3.3.2.) (Tablica 12) (Slika 15.).





Slika 15. Prikazani su reprezentativni primjerci tumora sa negativnom, umjerenom i snažnom ciklin D1 ekspresijom. A.) Invazivni duktalni rak dojke, histološkog stupnja III sa negativnom ciklin D1 ekspresijom. B.) Invazivni duktalni rak dojke, histološkog stupnja I, sa umjerenom ekspresijom ciklin D1 proteina. C.) Invazivni duktalni rak dojke, histološkog stupnja I, sa snažnom ekspresijom ciklin D1 proteina.

Korelirajući ekspresiju ciklin D1 proteina sa ostalim patohistološkim parametrima našla se proporcionalna statistički značajna korelacija sa ER ($p=0.0113$), te inverzna statistički značajna korelacija sa NPI ($p=0.0309$) i mEGFR ($p=0.0201$) (Tablica 12). Ostale korelacije nisu bile statistički značajne (Tablica 12).

Tablica 12. Ciklin D1 proteinska ekspresija u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa patohistološkim parametrima, HER-2 i EGFR

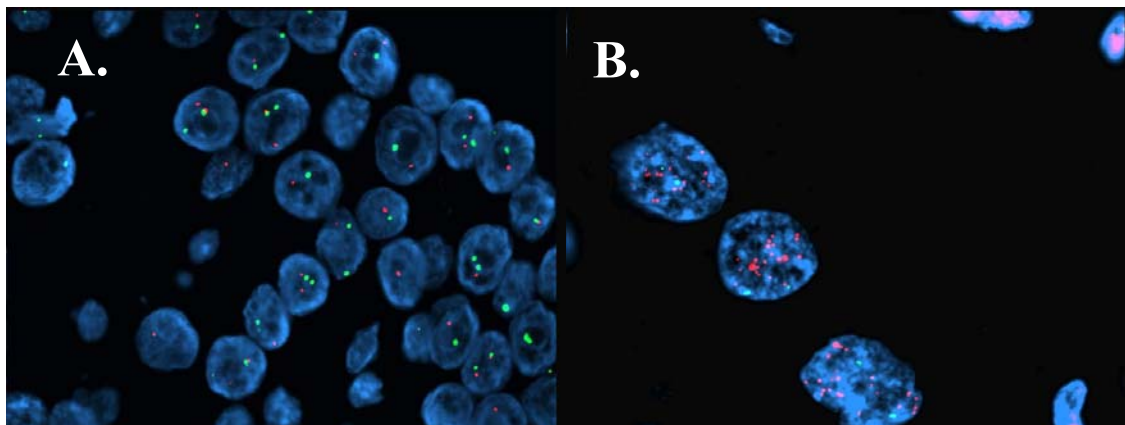
Parametri	N	NA	Ciklin D1 negativno/slabo pozitivno	Ciklin D1 umjerenom pozitivno	Ciklin D1 snažno pozitivno	Fisherov točni test (p)
Ukupno	113	5	10	31	72	
Veličina tumora	113	5				0.0691
T1 (≤ 2 cm)			5	11	46	
T2 (2 - 5 cm)			5	18	22	
T3 (> 5 cm)			0	2	4	
Histološki stupanj	113	5				0.4803
I			3	6	22	
II			4	16	38	
III			3	9	12	
Limfni čvorovi (metastaze)	113	5				0.5395
0			5	14	42	
1-3			2	5	14	
≥ 4			3	12	16	

ER	113	5				0.0113
-			5	19	22	
+			5	12	50	
PR	113	5				0.104
-			6	14	22	
+			4	17	50	
NPI	112	6				0.0309
Dobar (< 3.4)			3	11	43	
Umjereno dobar (3.4-5.4)			4	8	19	
Loš (>5.4)			2	12	10	
LVI	79	39				1
-			1	5	15	
+			4	15	39	
Ki-67	113	5				0.1681
<10%			3	16	30	
10-30%			2	10	30	
>30%			5	5	12	
nEGFR	112	6				0,5132
0 negativno			8	17	42	
+ slabo pozitivno			2	5	19	
++ umjereno pozitivno			0	3	4	
+++ jako pozitivno			0	6	7	
mEGFR	112	6				0.0201
0			6	28	66	
1+			4	3	3	
2+			0	0	1	
3+			0	0	1	
EGFR gen	110	8				0.2302
Nema amplifikacije			8	30	70	
Amplifikacija			1	0	1	
HER-2	112	6				0.5691
0			7	19	44	
1+			0	4	13	
2+			2	2	6	
3+			1	6	8	
HER-2 gen	113	5				0.1826
Nema amplifikacije			7	23	62	
Amplifikacija			3	8	10	

N- broj ispitivanih uzoraka, NA- nema podataka, ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI- Nottingham prognostički index, LVI-limfovaskularna invazija, nEGFR- nuklearni EGFR, mEGFR-membranski EGFR.

4. 9. Analiza statusa CCND1 gena u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa ostalim patohistološkim parametrima

Ukupno 112 uzoraka je bilo adekvatno za evaluaciju statusa CCND1 gena (razlozi navedeni pod 4.1.). Analiza statusa CCND1 gena je pokazala da 15 (13.39%) tumora ima amplifikaciju CCND1, a da 97 (86.60%) tumora nema amplifikacije CCND1 gena (Tablica 13) (Slika 16.).



Slika 16. Ciklin D1 FISH analiza A.) uzorak raka dojke bez amplifikacije CCND1 gena i B.) uzorak raka dojke sa CCND1 amplifikacijom, povećanje 1000x.

CCND1 genska amplifikacija je pokazala statistički značajnu korelaciju samo sa ekspresijom mEGFR ($p= 0.0420$, χ^2 -test), dok sve ostale korelacije nisu imale statističku značajnost (Tablica 13).

Tablica 13. Status ciklin D1 gena u invazivnom duktalnom raku dojke i korelacije sa patohistološkim parametrima, HER-2 i EGFR

Parametri	N	NA	CCND1 Nema amplifikacije	CCND1 Amplifikacija	Fisherov točni test (p)
Ukupno	112	6	97	15	
Veličina tumora	112	6			0.210
T1 (≤ 2 cm)			52	9	
T2 (2 - 5 cm)			41	4	
T3 (> 5 cm)			4	2	
Histološki stupanj	112	6			0.380
I			28	2	
II			48	10	
III			21	3	
Limfni čvorovi (metastaze)	112	6			0.608
0			52	8	
1-3			17	4	
≥ 4			28	3	
ER	112	6			0.094
-			43	3	
+			54	12	
PR	112	6			0.783
-			37	5	
+			60	10	
NPI	111	7			0.818
Dobar (< 3.4)			47	9	
Umjereno dobar (3.4-5.4)			28	3	
Loš (> 5.4)			21	3	
LVI	79	39			0.499
-			19	2	
+			48	10	

Ki-67	112	6			0.507
<10%			43	5	
10-30%			34	8	
>30%			20	2	
nEGFR	112	6			0.557
0 negativno			59	8	
+ slabo pozitivno			22	3	
++ umjereno pozitivno			5	2	
+++ jako pozitivno			11	2	
mEGFR	112	6			0.0420*
0			86	14	
1+			10	0	
2+			1	0	
3+			0	1	
EGFR gen	110	8			0.255
Nema amplifikacije			94	14	
Amplifikacija			1	1	
HER-2	112	6			0.906
0			61	9	
1+			15	2	
2+			8	2	
3+			13	2	
HER-2 gen	112	6			0.733
Nema amplifikacije			78	13	
Amplifikacija			19	2	

N- broj ispitivanih uzoraka, NA- nema podataka, ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI- Nottingham prognostički index, LVI-limfovaskularna invazija, nEGFR- nuklearni EGFR, mEGFR-membranski EGFR, CCND1-ciklin D1 gen, χ^2 - test.

4. 10. Usporedba HER-2, mEGFR i ciklin D1 proteinske ekspresije sa amplifikacijom korespondirajućeg gena

Podaci HER-2 imunohistokemije i HER-2 FISH analize bili su dostupni za ukupno 115 tumora. Statistički snažna korelacija je dobivena usporedbom ove dvije metode za evaluaciju HER-2 ($p < 0.00001$) (Tablica 14). Nijedan imunohistokemijski

negativan tumor na HER-2 nije imao amplifikaciju, dok je jedna uzorak evaluiran kao HER-2 1+ imao amplifikaciju istoimenog gena. Svi tumori klasificirani imunohistokemijski kao HER-2 3+ su imali amplifikaciju HER-2 gena, dok je od 6 tumora sa HER-2 imunohistokemijom 2+ njih 4 imalo amplifikaciju ovog gena (Tablica 14).

Tablica 14. Usporedba HER-2, mEGFR i ciklin D1 imunohistokemije sa FISH analizom korespondirajućeg gena

Parametri	IHC	FISH		Fisherov točni test (p)
		Nema amplifikacije	Amplifikacija	
HER-2	0	71	0	< 0.00001
	1+	17	1	
	2+	6	4	
	3+	0	16	
mEGFR	0	98	0	0.0035
	1+	10	0	
	2+	0	1	
	3+	0	1	
Ciklin D1	Negativno/slabo poz.	10	0	0.0362
	Umjereno poz.	30	1	
	Snžno poz.	57	14	

IHC- imunohistokemija; FISH - fluorescentna *in situ* hibridizacija; mEGFR- membranski EGFR.

Također statistički značajna korelacija je dobivena usporedbom mEGFR imunohistokemije sa FISH analizom za istoimeni gen (p=0.0035) (Tablica 14). Ukupno je 110 uzoraka imalo rezultate mEGFR imunohistokemije i FISH, svi tumori klasificirani imunohistokemijski kao negativni ili 1+ mEGFR su bili bez amplifikacije EGFR gena, a

preostala dva tumora klasificirana kao 2+ i 3+ mEGFR su imala amplifikaciju gena (Tablica 14).

Podaci ciklin D1 imunohistokemije i CCND1 FISH analize bili su dostupni za ukupno 112 tumora. Statistički značajna korelacija je dobivena između CCND1 amplifikacije i ciklin D1 umjerene/snažne ekspresije ($p=0.0362$) (Tablica 14). Od 15 tumora koji su imali CCND1 amplifikaciju 14 ih je imalo snažnu ekspresiju ciklin D1 proteina, a 1 je imao umjerenu ekspresiju ciklina D1 (Tablica 14). Svi tumori koji su bili imunohistokemijski ciklin D1 negativni, odnosno slabo pozitivni nisu imali amplifikacije CCND1 gena.

4. 11. Analiza petogodišnjeg preživljenja obzirom na ispitivane faktore – univarijantna i multivarijantna analiza

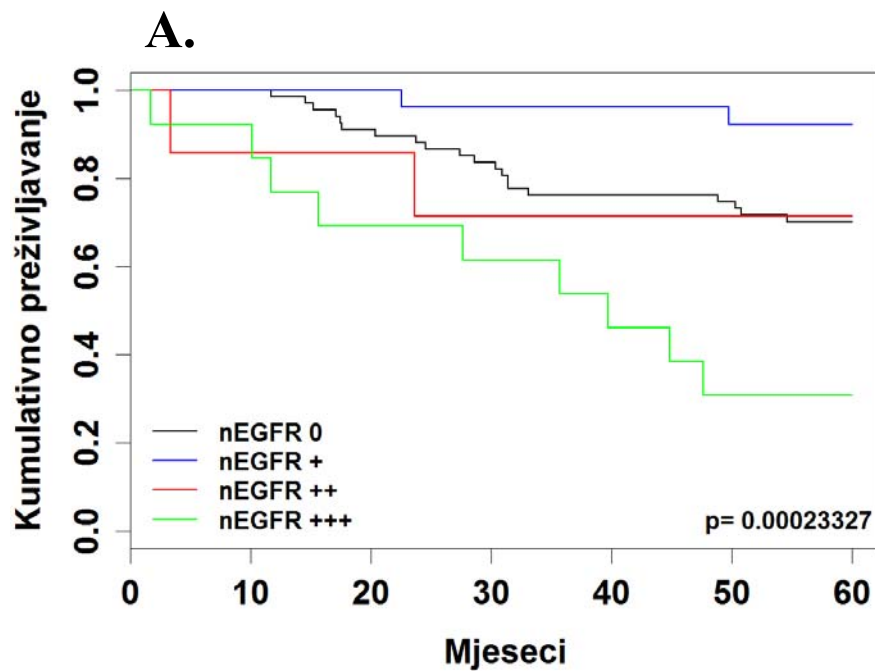
Univarijantna analiza preživljenja u koju su bili uključeni svi pacijenti je pokazala da veličina tumora ($p=0.0000167$), histološki stupanj ($p=0.0011$), zahvaćenost limfnih čvorova metastazama ($p=0.0010$), PR ($p=0.0012$), NPI ($p=0.00000028$), i nEGFR ($p=0.0002$) predstavljaju statistički značajne prognostičke faktore 5-ogodišnjeg preživljenja dok je amplifikacija HER-2 gena u istoj analizi pokazala graničnu vrijednost statističke značajnosti ($p=0.0522$) (Tablica 15) (Slika 17.). Prognostička važnost prekomjerne ekspresije mEGFR i EGFR amplifikacije na preživljenje nije se mogla neovisno evaluirati zbog malog broja informativnih slučajeva (svega 2 pacijenta).

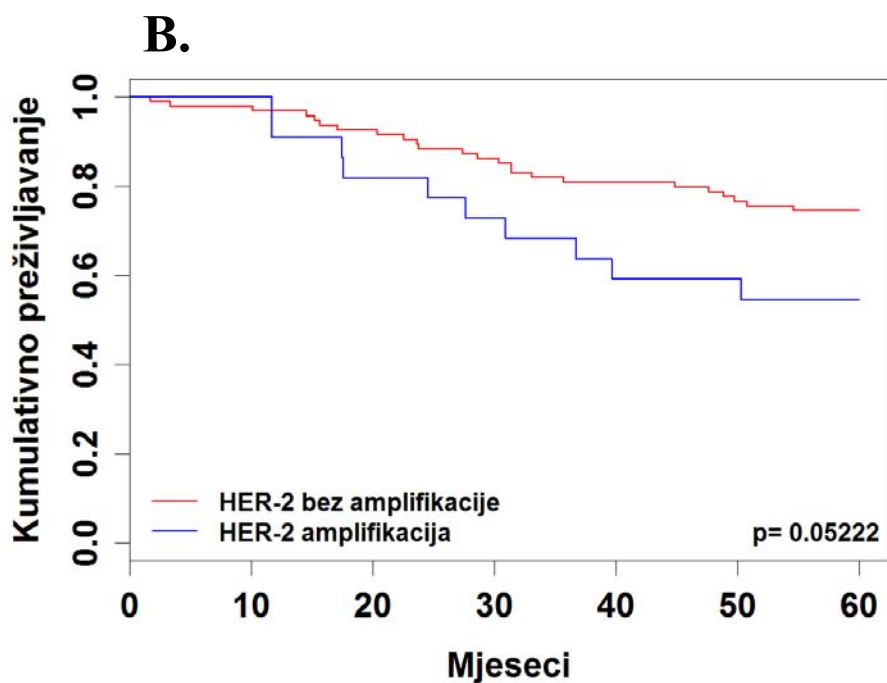
Tablica 15. Univarijantna analiza - petogodišnje preživljenje (uključeni svi pacijenti).

	N	Umrli	Preživljenje (mean)	Preživljenje (std.err)	Log-rank test (p)
Ukupno	117	34	0.84	0.038	
Veličina tumora	117	34			1.67 x10⁻⁵
T1 (≤ 2 cm)	63	10	0.90	0.040	
T2 (2 - 5 cm)	46	18	0.78	0.075	
T3 (> 5 cm)	8	6	0.52	0.378	
Histološki stupanj	117	34			0.0011
I	64	11	0.89	0.042	
II	21	7	0.79	0.110	
III	32	16	0.72	0.109	
Limfni čvorovi (metastaze)	117	34			0.0010
0	31	4	0.91	0.055	
1-3	61	16	0.84	0.052	
≥4	25	14	0.68	0.138	
ER	117	34			0.0830
-	47	18	0.78	0.074	
+	70	16	0.87	0.045	
PR	117	34			0.0012
-	43	20	0.74	0.089	
+	74	14	0.89	0.040	
NPI	115	33			2.80 x10⁻⁷
Dobar (< 3.4)	59	7	0.92	0.037	
Umjereno dobar (3.4- 5.4)	31	10	0.81	0.085	
Loš (>5.4)	25	16	0.64	0.153	
LVI	83	24			0.5058
-	22	5	0.84	0.092	
+	61	19	0.83	0.057	
Ki-67	113	33			0.3340
<10%	49	12	0.85	0.056	
10-30%	42	12	0.83	0.069	
>30%	22	9	0.75	0.121	
Kromosom 17	116	34			0.0878
Monosomija	2	1	0.50	0.707	
Disomija	90	22	0.86	0.040	
Polisomija	24	11	0.73	0.123	
HER-2	116	34			0.2667
0	71	19	0.85	0.048	
1+	18	4	0.84	0.099	
2+	11	3	0.80	0.152	
3+	16	8	0.69	0.167	

HER-2 gene	116	34			0.0522
Nema amplifikacije	94	24	0.85	0.040	
Amplifikacija	22	10	0.73	0.129	
Ciklin D1	113	33			0.1193
Negativno/slabo pozitivno	10	5	0.66	0.226	
Umjereno pozitivno	31	11	0.79	0.090	
Snažno pozitivno	72	17	0.86	0.045	
CCND1	112	33			0.3986
Nema amplifikacije	97	27	0.84	0.041	
Amplifikacija	15	6	0.74	0.151	
nEGFR	113	33			0.0002
0	67	20	0.83	0.053	
+	26	2	0.93	0.051	
++	7	2	0.76	0.211	
+++	13	9	0.58	0.249	

N- broj ispitivanih uzoraka, ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI- Nottingham prognostički index, LVI – limfovaskularna invazija, nEGFR- nuklearni EGFR, CCND1-ciklin D1 gen, mean-srednje preživljenje, std.err- standardna greška.





Slika 17. A.) Kaplan-Meier krivulje preživljenja prikazuju kraće sveukupno preživljenje pacijenata sa tumorima koji pokazuju nEGFR +++ ekspresiju u odnosu na nEGFR negativne tumore (cijela skupina) i B) Kaplan-Meier krivulje preživljenja pacijentica sa HER-2 amplifikacijom pokazuju lošije preživljenje u odnosu na pacijentice sa tumorima bez HER-2 amplifikacije (na granici statističke značajnosti).

Također, kada su pacijentice podijeljene u dvije grupe, pre-menopauzalnu i post-menopauzalnu, većina prognostičkih faktora značajnih prilikom testiranja cijele skupine, je zadržala svoju statističku značajnost (Tablica 16). Međutim, u pre-menopauzalnoj skupini je uočeno da je prekomjerna ekspresija ciklina D1 dobila statističku značajnost ($p=0.0027$) u smislu boljeg preživljenja za pacijentice koje su imale tumore sa snažnom ekspresijom ovog proteina, dok se snažno nEGFR ($p=0.000004$) bojanje pokazalo lošijim prognostičkim faktorom u istoj skupini (Tablica 16; Slika 18). No iste korelacije vezano

Tablica 16. Univarijantna analiza - petogodišnje preživljenje (pre- i post- menopauza).

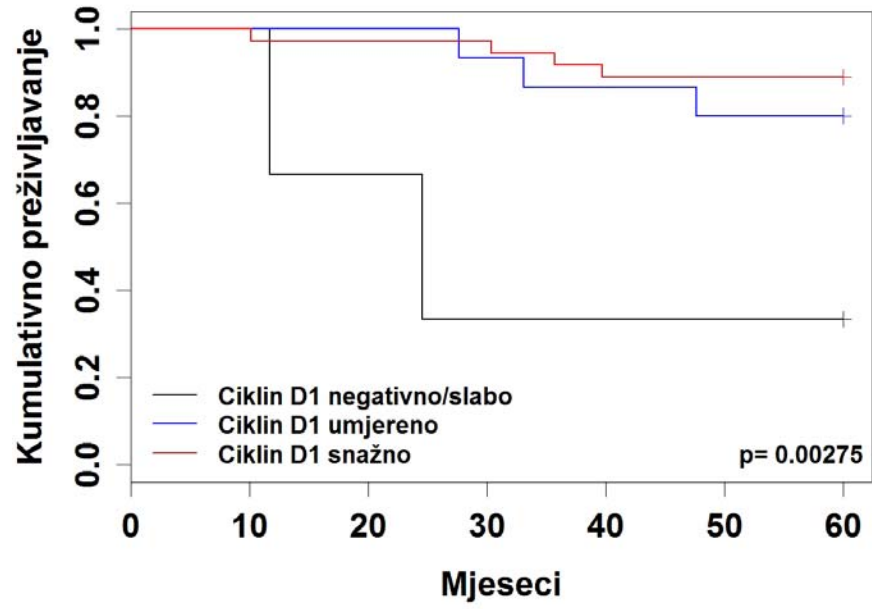
	PREMENOPAUZA					POSTMENOPAUZA				
	N	Umrli	Preživljenje (mean)	Preživljenje (std.err)	Log-rank test (p)	N	Umrli	Preživljenje (mean)	Preživljenje (std.err)	Log-rank test (p)
Ukupno	58	10	0.89	0.042		59	24	0.77	0.068	
Veličina tumora	58	10			6x10⁻⁵	59	24			0.0347
T1 (≤ 2 cm)	33	1	0.96	0.030		30	9	0.80	0.087	
T2 (2 – 5 cm)	21	6	0.81	0.101		25	12	0.73	0.121	
T3 (> 5 cm)	4	3	0.43	0.630		4	3	0.43	0.630	
Histološki stupanj	58	10			0.0127	59	24			0.0560
I	34	2	0.95	0.038		30	9	0.80	0.087	
II	9	2	0.81	0.158		12	5	0.72	0.179	
III	15	6	0.74	0.151		17	10	0.67	0.174	
Limfni čvorovi (metastaze)	58	10			0.0265	59	24			0.0219
0	16	1	0.93	0.064		15	3	0.85	0.107	
1-3	30	4	0.90	0.057		31	12	0.76	0.097	
≥4	12	5	0.72	0.179		13	9	0.58	0.249	
ER	58	10			0.2045	59	24			0.1557
-	24	6	0.83	0.087		23	12	0.69	0.138	
+	34	4	0.91	0.050		36	12	0.80	0.081	
PR	58	10			0.0391	59	24			0.0659
-	15	5	0.77	0.136		28	15	0.69	0.125	
+	43	5	0.92	0.043		31	9	0.81	0.083	

NPI	56	9			0.0001	59	24			0.0008
Dobar (< 3.4)	32	1	0.97	0.032		27	6	0.85	0.080	
Umjereno dobar (3.4-5.4)	13	2	0.87	0.106		18	8	0.73	0.144	
Loš (>5.4)	11	6	0.64	0.226		14	10	0.60	0.234	
LVI	44	8			0.7056	39	16			0.8453
-	14	2	0.88	0.097		8	3	0.70	0.231	
+	30	6	0.87	0.068		31	13	0.76	0.099	
Ki-67	54	9			0.7930	59	24			0.1100
<10%	21	3	0.89	0.074		28	9	0.80	0.089	
10-30%	19	3	0.88	0.082		23	9	0.75	0.119	
>30%	14	3	0.83	0.115		8	6	0.51	0.378	
Kromosom 17	57	10			0.1254	59	24			0.2521
Monosomija	2	1	0.50	0.707						
Disomija	46	6	0.91	0.043		44	16	0.78	0.076	
Polisomija	9	3	0.75	0.191		15	8	0.67	0.182	
HER-2	57	10			0.3079	59	24			0.2004
0	33	4	0.91	0.051		38	15	0.76	0.087	
1+	8	1	0.87	0.133		10	3	0.77	0.169	
2+	5	1	0.80	0.223		6	2	0.72	0.253	
3+	11	4	0.74	0.175		5	4	0.44	0.585	
HER-2 gen	57	10			0.0324	59	24			0.1322
Nema amplifikacije	43	5	0.92	0.043		51	19	0.78	0.071	
Amplifikacija	14	5	0.76	0.148		8	5	0.58	0.313	
Ciklin D1	54	9			0.0027	59	24			0.5365
Negativno/slabo pozitivno	3	2	0.44	0.680		7	3	0.67	0.262	
Umjereno pozitivno	15	3	0.85	0.107		16	8	0.69	0.167	
Snažno pozitivno	36	4	0.92	0.047		36	13	0.78	0.086	
CCND1 gen	53	9			0.7979	59	24			0.2220
Nema amplifikacije	46	8	0.89	0.049		51	19	0.79	0.070	

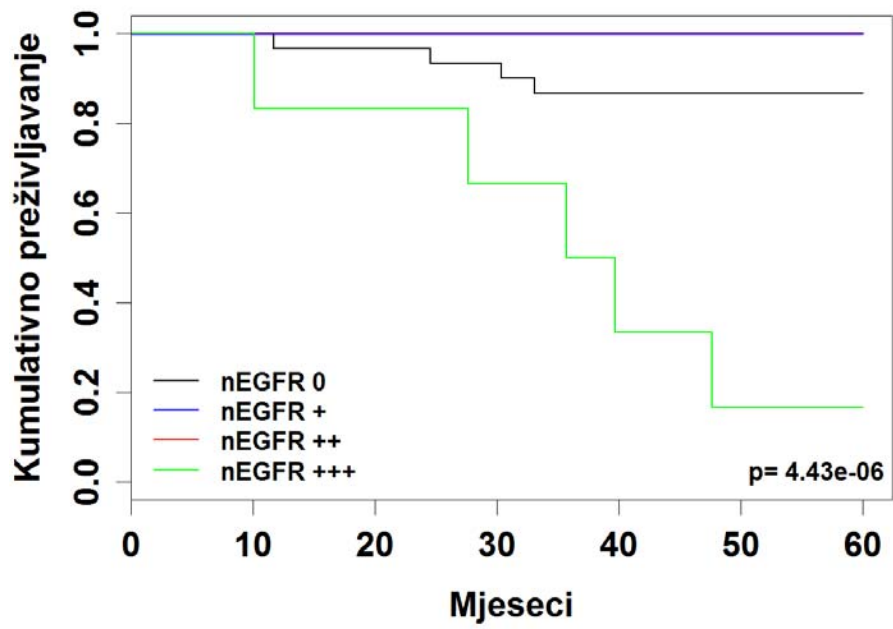
Amplifikacija	7	1	0.85	0.154		8	5	0.58	0.313
nEGFR	54	9			4.43	59	24		0.3377
					x10⁻⁶				
0	30	4	0.90	0.057		37	16	0.75	0.094
+	16	0	1	0		10	2	0.83	0.140
++	2	0	1	0		5	2	0.66	0.318
+++	6	5	0.44	0.547		7	4	0.60	0.318

N- broj ispitivanih uzoraka, ER- estrogen receptor, PR- progesteron receptor, NPI-Nottingham prognostički index, LVI – limfovaskularna invazija, nEGFR- nuklearni EGFR, CCND1-ciklin D1 gen, mean-srednje preživljenje, std.err- standardna greška.

A.



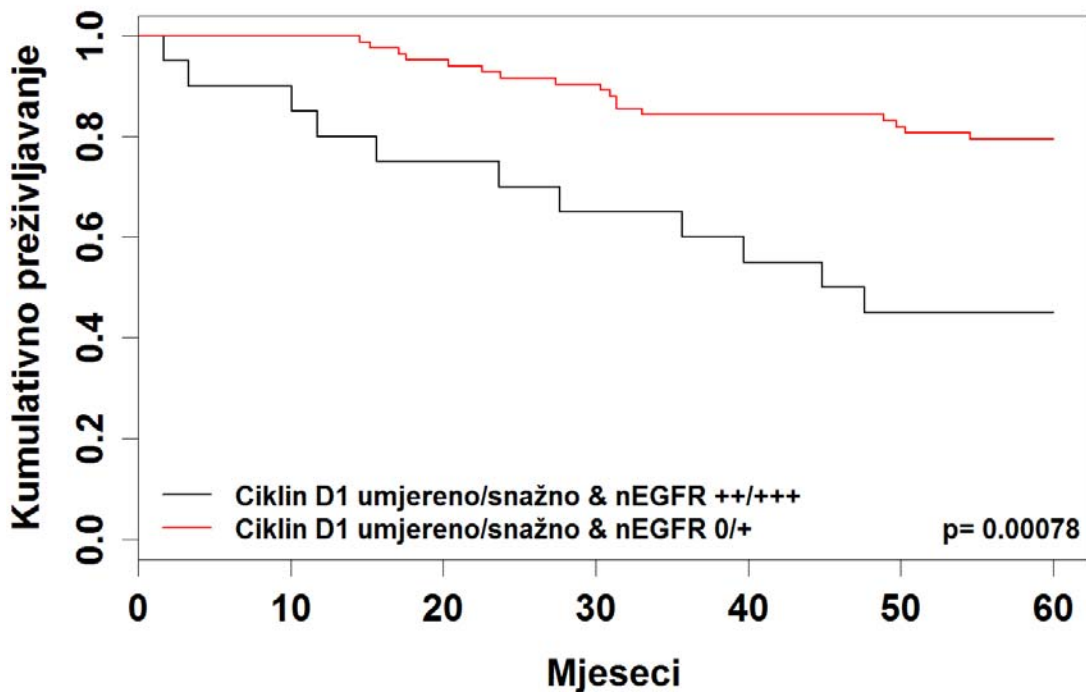
B.



Slika 18. A.) Kaplan-Meier krivulje preživljenja prikazuju bolje sveukupno preživljenje pacijentica u premenopauzalnoj grupi sa tumorima koji pokazuju snažnu ekspresiju ciklin D1 proteina u odnosu na ciklin D1 negativne/slabo pozitivne tumore, B) Kaplan-Meier krivulje preživljenja prikazuju kraće sveukupno preživljenje pacijentica u premenopauzalnoj skupini sa tumorima koji pokazuju snažnu nEGFR (+++) ekspresiju u odnosu na nEGFR negativne tumore.

uz ciklin D1 i nEGFR nisu nađene u post-menopauzalnoj skupini pacijentica (Tablica 16). Iako ciklin D1 prekomjerna ekspresija nije bila statistički značajna u smislu boljeg sveukupnog preživljenja u post-menopauzalnoj ($p=0.5365$) i cijeloj skupini ($p=0.1193$) pacijentica ipak je primjećen trend prema boljem preživljenju u obje skupine. Također pokušali smo međusobnim sparivanjem utvrđenih patohistoloških i ispitivanih parametara sa ciklin D1 ekspresijom i CCND1 amplifikacijom utvrditi postoji li određena kombinacija koja utječe na samo preživljenje pacijentica bilo u negativnom ili pozitivnom smislu. Fisherov točni test pokazao je statistički značajno bolje preživljenje pacijentica koje su imale prekomjernu ekspresiju ciklina D1 i ER pozitivne tumore ($p=0.0422$), PR pozitivne tumore ($p=0.0145$) i tumore histološkog stupnja I ($p=0.0192$). Nismo pronašli statistički značajnu korelaciju u smislu boljeg ili lošijeg sveukupnog preživljenja kada je ciklin D1 ekspresija ili CCND1 amplifikacija bila uparena s HER-2 i mEGFR proteinskom ekspresijom odnosno genskom amplifikacijom. Također CCND1 amplifikacija sama po sebi nije pokazala statistički značajnu korelaciju sa sveukupnim preživljenjem. Utvrđeno je i da tumori sa umjerenom/snažnom ekspresijom ciklina D1 i

nEGFR imaju statistički lošije kumulativno preživljenje u usporedbi sa tumorima koji imaju umjenu/snažnu ekspresiju ciklina D1 i negativno/slabo nEGFR bojanje ($p=0.00078$) (Slika 19).



Slika 19. Kaplan-Meier krivulje preživljenja pokazuju da pacijenti sa umjerenom/snažnom ekspresijom ciklina D1 i nEGFR imaju statistički lošije preživljenje u odnosu na pacijente sa tumorima koji imaju umjerenom/snažnu ekspresiju ciklina D1 i negativnu/slabu ekspresiju nEGFR.

Multivarijantna analiza na cjelokupnoj skupini pacijenata je pokazala da su samo veličina tumora, histološki stupanj, NPI i nEGFR neovisni prognostički faktori za sveukupno preživljenje (Tablica 17). U našoj ispitivanoj skupini pokazalo se da

pacijentice sa nEGFR +++ ekspresijom imaju 3.4 puta veći rizik od smrti nego nEGFR negativne pacijentice (stopa rizika=3.402; p=0.0026) (Tablica 17).

Tablica 17. Multivarijantna analiza prediktora sveukupnog preživljenja (Cox proporcionalni rizični model regresije)

Parametri	Stopa rizika	95% interval pouzdanosti	P
¹ Veličina tumora > 2cm	3.09	2.054 - 4.654	0.0058
² Histološki stupanj III	6.90	3.635 - 13.103	0.0026
³ NPI	2.96	1.810 - 4.853	0.0280
⁴ nEGFR +++	3.40	2.264 - 5.109	0.0026

¹U usporedbi sa veličinom tumora ≤ 2 cm

² U usporedbi sa histološkim stupnjem I

³Odgovara linearnom parametru, povećanje stope rizika sa povećanjem NPI

⁴ U usporedbi sa nEGFR negativnim tumorima

NPI-Nottingham prognostički index

5. RASPRAVA

Danas se smatra da je rak dojke heterogena bolest zbog toga što se tumori razlikuju u morfologiji, prognozi i samom odgovoru na terapiju. Iako je rak dojke najčešća maligna neoplazma među ženama, zahvaljujući učinjenim napredcima u liječenju, u posljednja dva desetljeća, uključujući ranu detekciju i razvoj novih lijekova značajno je smanjena smrtnost od ove neoplazme. Dugo vremena su glavne opcije liječenja pacijenata oboljelih od raka dojke bili kirurško odstranjivanje tumora, radioterapija i kemoterapija, no danas je jasno da ovakav tip liječenja više nije dovoljan. Glavno ograničenje kemoterapije je nemogućnost razlikovanja stanica raka od normalnih stanica što je dodatno istaknulo potrebu za liječenjem koji će biti ciljno usmjereno samo na maligne stanice.

Bolje razumijevanje osnovnih molekularnih regulacijskih mehanizama u nastanku i razvoju tumora omogućilo je otkrivanje molekula koje su ključne za nastanak malignog fenotipa stanica te razvoj ciljno usmjerene terapije kao što su monoklonalna protutijela i inhibitori tirozin kinaze. Primarni cilj novih takozvanih "pametnih lijekova" je da su specifično usmjereni na molekularne markere na tumorskim stanicama upravo da bi se poboljšalo liječenje i smanjio citotoksični učinak lijeka na normalne stanice. Stoga su upravo dostignuća u molekularnoj medicini bila ključna u identifikaciji tumorskih markera koji ne samo da imaju prognostički već i prediktivni značaj. Danas je primarni cilj liječenja pacijentica oboljelih od raka dojke da se tretman liječenja individualno prilagodi svakom pacijentu, a upravo je to istaklo potrebu za što boljim diferenciranjem

neoplazmi, dodatnim karakteriziranjem prognostičkih i terapijskih faktora te otkrićem novih biomarkera.

Prekomjerna ekspresija proteina iz EGFR obitelji i ciklina D1 čest je nalaz u raku dojke. Međutim, u literaturi nedostaje radova koji sustavno ispituju ekspresiju i amplifikaciju HER-2, EGFR i ciklina D1 kod raka dojke, te njihov utjecaj na preživljenje i prognozu u istoj grupi pacijenata, pa su stoga i rezultati studija nerijetko oprečni. Stoga smo u ovom istraživanju ispitali ekspresiju proteina i gensku amplifikaciju HER-2, EGFR, ciklina D1 te status 17. kromosoma na TMA sastavljenim od uzoraka invazivnog dukalnog raka dojke što je omogućilo jednako kontrolirane uvjete za imunohistokemijske i *in situ* (FISH, fluorescentna *in situ* hibridizacija) analize za sve uzorake (smanjena mogućnost metodološke varijabilnosti).

Navedeni proteini sudjeluju u tumorogenezi te se povezuju sa prognostičkim faktorima rizika za rast, razvoj i terapijski odgovor niza tumora, pa tako i raka dojke, a značaj njihovih interakcija je utoliko veći što već postoje lijekovi koji su specifično usmjereni upravo na ove molekule.

HER-2 protein, prekomjerno je ekspimiran u oko 15-30% slučajeva invazivnog raka dojke i u više od 90% slučajeva prekomjerna ekspresija je posljedica genske amplifikacije (50, 98). U ovoj studiji ukupno je bilo oko 24% (uključujući HER-2 3+ i 2+) uzoraka sa prekomjernom ekspresijom HER-2 proteina, odnosno oko 18% sa amplifikacijom HER-2 gena što je u skladu sa ranije objavljenim rezultatima. Također svi tumori koji su bili 3+ HER-2 imali su amplifikaciju dok su od 6 tumora, koji su bili očitani kao 2+ HER-2, njih 4 imala su amplifikaciju gena. Statistički značajna korelacija između HER-2 imunohistokemije i HER-2 FISH analize pokazala je da su ove dvije

metode kompatibilne i da se u našim uvjetima HER-2 imunohistokemija može koristiti kao zamjena za HER-2 gensku evaluaciju, osim u graničnim 2+ HER-2 slučajevima kada je potrebno još učiniti i FISH analizu, što je u skladu sa ranijim studijama. Još je Slamon i sur. 1987. godine ukazao da tumori sa amplifikacijom HER-2 gena pokazuju agresivnije ponašanje, a ovo opažanje je kasnije potvrđeno u preko 100 različitih studija (24, 31). Također se pokazalo da je evaluacija HER-2 proteina/gena, uz to što predstavlja važan prognostički faktor, važan prediktivni faktor ne samo za specifično usmjerenu terapiju monoklonalnim protutijelima (trastuzumabom = Herceptin[®]) već i za kemoterapiju i hormonalnu terapiju (32, 98). Studije pokazuju da HER-2 prekomjerna ekspresija u raku dojke korelira sa pozitivnim limfnim čvorovima, visokim nuklearnim stupnjem, negativnim hormonskim receptorima i visokom proliferativnom aktivnosti tumora (23, 29, 31). U provedenom istraživanju smo također pronašli korelaciju između prekomjerene HER-2 proteinske ekspresije i negativnih hormonskih receptora i proliferativne aktivnosti tumora dok je HER-2 genska amplifikacija još pokazala korelaciju i sa histološkim stupnjem. Univarijantna analiza preživljenja je pokazala da pacijentice sa tumorima koji imaju HER-2 amplifikaciju pokazuju statistički značajno lošije preživljenje (osobito premenopauzalna skupina pacijentica, dok je cjelokupna skupina imala statistički granično značajnu korelaciju sa lošijim preživljenjem) dok za HER-2 prekomjernu ekspresiju proteina nismo dobili statistički značajnu korelaciju sa sveukupnim preživljenjem.

U ovoj studiji također je nađena korelacija između HER-2 imunohistokemije i polisomije kromosoma 17. Provedeno istraživanje je pokazalo u 20.68% slučajeva polisomiju 17 kromosoma što i nije zanemariv broj, međutim osim statistički značajne

korelacije sa HER-2 imunohistokemijom i granično značajne korelacije sa Ki-67 nije se našlo drugih značajnih povezanosti. Slični podaci vezani za prevalenciju polisomije kromosoma 17 potvrđeni su i u drugim studijama i kreću se od 10.3% do 48.7%, ovisno o ispitivanom uzorku i samom definiranju polisomije 17 (22, 38, 42). Također je uočen mnogo veći broj slučajeva polisomije kromosoma 17 u FISH HER-2 negativnim slučajevima (bez amplifikacije HER-2 gena) nego kod FISH HER-2 pozitivnih slučajeva (sa HER-2 amplifikacijom) (Tablica 7), kao što je potvrđeno i u prethodnim studijama (99). Iako je naravno potreban veći broj slučajeva da bi se mogli izvući značajniji zaključci, podaci dobiveni ovim istraživanjem također ukazuju na to da se tumori sa HER-2 amplifikacijom razlikuju od tumora sa polisomijom 17, što potvrđuje ranija istraživanja (42, 99). Dok su tumori sa HER-2 amplifikacijom povezani sa višim histološkim stupnjem i negativnim ER receptorima tumori sa polisomijom 17 nisu pokazivali statistički značajne korelacije sa ovim patohistološki nepovoljnijim parametrima, što indirektno upućuje da se tumori sa polisomijom 17 ponašaju kao tumori bez HER-2 amplifikacije. Međutim, Kaplan-Meier krivulja preživljenja pokazuje da tumori sa polisomijom 17 ipak imaju lošije preživljenje u odnosu na HER-2 tumore bez amplifikacije, dapače sama krivulja preživljenja se gotovo poklapa sa onom od tumora koji imaju HER-2 amplifikaciju (Slika 11). Ovakav rezultat kumulativnog preživljenja ipak i nije neočekivan obzirom da sama aneuploidija predstavlja određenu genetsku nestabilnost, što bi za posljedicu imalo da se takvi tumori ponašaju agresivnije u odnosu na one koji je nemaju, a sličan trend su uočila i neka ranija istraživanja (99). Studija Vanden Bempt i sur. (99) je pokazala da tumori bez HER-2 amplifikacije imaju statistički bolje preživljenje u odnosu na tumore sa HER-2 amplifikacijom, no tumori sa

polisomijom 17 su pokazali trend boljeg preživljenja od HER-2 amplificirajućih tumora ali ipak lošije u odnosu na HER-2 negativne tumore. Trenutno nedostaju studije koje koreliraju polisomiju kromosma 17 sa kliničkim odgovorom na trastuzumab terapiju i glavno pitanje koje se postavlja je da li polisomija 17 može predvidjeti odgovor na terapiju trastuzumabom u slučajevima HER-2 prekomjerene ekspresije bez amplifikacije HER-2 gena (44). Rezultati nekih studija sugeriraju da se tumori sa polisomijom 17 i bez HER-2 amplifikacije patohistološki ne mogu razlikovati od samih tumora bez HER-2 amplifikacije, što upućuje da vjerojatno takvi tumori nebi odgovorili na trastuzumab terapiju (99, 27). No nedavno provedena studija Hofmann i sur. pokazala je pozitivan odgovor na trastuzumab terapiju kod dva pacijenta sa polisomijom 17, bez HER-2 amplifikacije, međutim oba pacijenta su imala tumore sa 3+ HER-2 proteinskom ekspresijom (100).

Budući da su u mnogim malignim neoplazmama pronađene aberacije EGFR signalnog puta i da se EGFR smatra jednim od glavnih onkogenih faktora u ovom smo istraživanju, na istoj skupini tumora, također imunohistokemijski ispitali proteinsku ekspresiju mEGFR, nEGFR-a te FISH analizom odredili status EGFR gena u jezgrama tumorskih stanica. Iako studije opisuju prekomjernu ekspresiju mEGFR u raku dojke od 5% do 91% (19, 51, 52, 53, 54), a u nekima od njih se mEGFR povezuje i sa lošijim preživljenjem (101, 102) još uvijek nema jasnog dokaza koji bi ukazivao na prognostički značaj ovog proteina u raku dojke.

Ova studija je pokazala u 1.8% tumora prekomjernu ekspresiju mEGFR proteina (2+ i 3+ EGFR ekspresija zajedno), dok je 8.9% tumora imalo 1+ EGFR ekspresiju, što se u konačnici smatra negativnim rezultatom za mEGFR proteinsku ekspresiju. Studije

koje su prikazale visok postotak stanica sa prekomjernom ekspresijom mEGFR osim korištenja drugih laboratorijskih metoda, nisu imale strogo definirane kriterije prekomjerne ekspresije već se bilo koji postotak >1% uzimao kao pozitivan rezultat za prekomjernu ekspresiju (19, 50). Međutim pojedine studije ukazuju na to da čak i niska razina mEGFR ekspresije može imati važnu ulogu u samoj biologiji tumora naročito u kontekstu ekspresije i prekomjerne ekspresije drugih proteina iz EGFR obitelji (103). Oba tumora iz ove studije koja su imala prekomjernu ekspresiju mEGFR proteina imala su također i amplifikaciju EGFR gena (1.8% uzoraka) što se slaže sa ranijim studijama koje pokazuju raspon amplifikacije EGFR gena od 0.8% do 6% (45, 96).

Uspoređujući mEGFR ekspresiju sa ostalim patohistološkim parametrima nađena je korelaciju sa negativnim hormonskim receptorima (ER i PR), proliferativnom aktivnosti tumora, histološkim stupnjem i ciklin D1 proteinskom ekspresijom dok je EGFR genska amplifikacija pokazala korelaciju samo sa histološkim stupnjem i proliferativnom aktivnosti tumora. Ranije studije pokazuju da je mEGFR ekspresija kod raka dojke povezana sa ER i PR negativnim hormonskim receptorima (45, 54) i višim histološkim stupnjem (45). Rezultati korelacija dobivenih ovom studijom između mEGFR i negativnih hormonskih receptora, histološkog stupnja i proliferativne aktivnosti indirektno potvrđuju ranija istraživanja koja povezuju prekomjernu ekspresiju ovog proteina sa agresivnijim tumorima i posljedično lošijom prognozom (47).

Trenutno nema konsenzusa oko uloge EGFR-a kao markera prognoze kod raka dojke i nema jasne povezanosti između EGFR statusa i sveukupnog preživljena iako EGFR pozitivni i ER negativni tumori imaju statistički lošiju prognozu (54). Nažalost zbog malog broja informativnih slučajeva u ovoj studiji nije bilo moguće učinitu

korelaciju prekomjerne mEGFR ekspresije i EGFR genske amplifikacije sa sveukupnim preživljenjem jer su svega dva pacijenta imala prekomjernu mEGFR ekspresiju odnosno EGFR amplifikaciju.

S druge pak strane sve je više dokaza koji upućuju na postojanje direktnog puta EGFR signaliziranja u kojima aktivirani EGFR bude internaliziran u stanicu i prebačen unutar jezgre gdje potom sudjeluje u procesu regulacije genske ekspresije. Ovaj put signaliziranja razlikuje se od tradicionalnog puta prijenosa signala kod kojeg se nakon vezanja liganda na EGFR receptor prenosi samo signal u jezgru putem kaskadnog aktiviranja većeg broja signalnih molekula, a ne sam EGFR receptor. Nuklearna detekcija EGFR-a uočena je u hepatocitima koji se regeneriraju i primarnom adrenokortikalnom karcinomu još prije više od 15 godina (60, 104). Ovaj fenomen nuklearne translokacije nije specifičan samo za EGFR već predstavlja univerzalnu pojavu koja se može primjetiti i kod mnogih drugih staničnih receptora pa je tako nedavno detektirana nuklearna ekspresija i preostalih članova EGFR obitelji; HER-2 (105), HER-3 (106) i HER-4 (107). Nuklearni analog EGFR receptora je protein jednke veličine kao receptor na staničnoj membrani i najvjerojatnije se nalazi u fosforiliranoj formi, međutim još nije jasno kako EGFR receptor bude internaliziran u samu jezgru (62).

Iako je nuklearna akumulacija EGFR-a povezana sa povećanom DNA sintezom i proliferativnim potencijalom, patohistološke posljedice nEGFR još uvijek su nedovoljno istražene. U ovoj studiji nEGFR je detektiran u oko 40% tumora (svi nEGFR pozitivni tumori bez obzira na nivo ekspresije) što je u skladu sa istraživanjem Lo i suradnika (59) dok je 11.5% tumora imalo nEGFR visoku ekspresiju (+++) za razliku od Lo i suradnika (59) koji su detektirali nEGFR (+++) u 6.9% tumora. Studija Lo i suradnika (59) je

značajna po tome što je prva i jedina do sada pokazala da je visoka nEGFR ekspresija povezana sa statistički značajnim smanjenjem sveukupnog preživljenja. Naši podaci također potvrđuju da je visoka nEGFR ekspresija statistički značajno povezana sa smanjenjem sveukupnog preživljenja, a također smo pronašli i statistički značajno skraćeno sveukupno preživljenje u premenopauzalnoj skupini pacijentica (Kaplan-Meier i log-rank test). Ova studija je pokazala u multivariantnoj analizi da visoka nEGFR ekspresija (++++) predstavlja neovisni prognostički faktor za sveukupno preživljenje pacijentica što je po prvi puta do sada opisano. Ovi rezultati su važni stoga što pojedine studije ukazuju na to da anti-EGFR protutijela (C255/Cetuximab) blokiraju zračenjem inducirani nEGFR transport i njegove interakcije sa DNK ovisnom protein kinazom, enzimom koji je uključen u DNK popravak (108, 109). Studija Lo i suradnika (59) također je pokazala pozitivnu korelaciju sa povećanom ekspresijom ciklina D1 i Ki-67 što upućuje na to da tumori sa visokom nEGFR ekspresijom imaju povećan proliferativni potencijal. U ovoj studiji nije pronađena korelacija između nEGFR visoke ekspresije i Ki-67 i ciklina D1. Dobivene rezultate vezano uz koreliranje nEGFR i ciklina D1/Ki-67 teško je kometirati i usporediti sa rezultatima studije Lo i suradnika (59) budući da autori nisu jasno opisali kako je rađena evaluacija Ki-67 i ciklina D1 imunohistokemije te koje su bile granične vrijednosti. Naša studija je pokazala korelaciju nEGFR sa veličinom tumora, zahvaćenošću većeg broja limfnim čvorovima, lošijim NPI i negativnim ER što su sve markeri koji upućuju na agresivnije ponašanje tumora.

Rezultati ove studije su također pokazali da tumori koji imaju umjerenu/snažnu ekspresiju ciklina D1 i nEGFR imaju lošije kumulativno preživljenje u odnosu na tumore sa umjerenom/snažnom ciklin D1 ekspresijom i negativnom/slabom nEGFR ekspresijom.

Ovi rezultati su u korelaciji sa rezultatima studije koja je pokazala da nEGFR djeluje kao transkripcijski ko-faktor koji aktivira ciklin D1 gen, ključni gen regulacije stanične proliferacije (63). Dobiveni rezultati potvrđuju rezultate ranijih studija i sugeriraju da nEGFR igra važnu ulogu u nastanku agresivnijih tumora sa posljedičnim lošijim kliničkim ishodom bolesti.

Ciklin D1 protein igra važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. On zajedno s ciklin ovisnim kinazama, Cdk4 i Cdk6, tvori komplekse koji uzrokuju fosforilaciju pRB, a to onda dovodi do otpuštanja E2F transkripcijskog čimbenika što omogućuje stanici da prođe restrikciju točku u G1 fazi i krene u S fazu staničnog ciklusa. Ciklin D1 protein je prekomjerno eksprimiran do čak ~ 80% karcinoma dojke i značajna većina ovih tumora su ustvari ER pozitivni tumori koji su općenito povezani sa boljom prognozom (77, 110, 111). CCND1 gen je amplificiran tek u 5-25% (45, 76, 112) slučajeva što sugerira da su i drugi mehanizmi uključeni u poremećaj ekspresije ciklin D1 proteina kao što su transkripcijska i post-transkripcijska disregulacija. U ovoj studiji ~ 63% uzoraka imalo je prekomjernu ekspresiju ciklin D1 proteina, dok je CCND1 gen bio amplificiran u ~ 13% slučajeva. Rezultati CCND1 genske amplifikacije određene FISH-om, u ovoj studiji potvrđuje rezultate ranijih studija u kojim se frekvencija amplifikacije CCND1 gena određivala na isti način (96) ili alternativno kromogenom in situ hibridizacijom (CISH metodom) (76, 77) ili pomoću Southern blota (113, 114). U ovoj studiji utvrđena je statistički značajna korelacija između CCND1 amplifikacije i ciklin D1 proteinske ekspresije, gdje su svi slučajevi sa amplifikacijom imali ili snažnu ili umjerenu ekspresiju ciklina D1.

S druge pak strane prekomjerna ekspresija ciklin D1 proteina kod raka dojke, kao što je potvrđeno i u ovom istraživanju, nije začuđujuća jer sam ciklin D1 može biti prekomjerno eksprimiran zbog djelovanja nekoliko različitih signalnih puteva; preko proteina iz EGFR obitelji, ER, c-myc i signalnog puta receptora za fibroblastni faktor rasta (69, 115, 116, 117). Efekti estrogena na stanični ciklus su direktno povezani sa poticanjem povećane ekspresije ciklin D1 proteina (115). CCND1 gen je direktna transkripcijska meta ER i smatra se da se ovo djelovanje ER odvija posredno uključivanjem specifičnih ER ko-aktivatora i aktivacijom inhibitora kapa B kinaze alfa ($IKK\alpha$) i MAPK signalnih puteva (118, 119). S druge pak strane ciklin D1 može regulirati rast estrogen ovisnog tkiva aktivirajući sam ER tako što se veže na njega (aktivacija neovisno o hormonu), što posljedično dovodi do povećane ER posredovane transkripcijske regulacije preko Cdk neovisnih mehanizama (72, 120). Ova pak estrogen-neovisna ER agonistička aktivnost ciklina D1 upućuje na njegovu moguću onkogenu ulogu u ER pozitivnom raku dojke (76).

U ovoj studiji pronađena je statistički značajna povezanost između ER pozitiviteta i snažne ekspresije ciklin D1 proteina, te statistički značajna inverzna korelacija između NPI i mEGFR. Međutim CCND1 amplifikacija nije pokazala statistički značajnu povezanost sa ER pozitivitetom ali je potvrđena statistički značajna inverzna korelacija sa mEGFR. Dobiveni rezultati vezano uz povezanost prekomjerne ekspresije ciklina D1 i ER pozitiviteta govore u prilog konceptu da visoka ER ekspresija može podržavati prekomjernu ekspresiju ciklin D1 proteina. Utvrđena inverzna korelacija ciklin D1 proteinske ekspresije i CCND1 amplifikacije sa mEGFR dobivena u ovom istraživanju također potvrđuje rezultate ranijih istraživanja (121).

Prognostički značaj prekomjerne ekspresije ciklina D1 je još uvijek nejasan. Dok pojedine studije povezuju prekomjernu ekspresiju sa boljim preživljenjem (77, 110) druge pak ukazuju na to da je prekomjerna ekspresija ovog proteina povezana sa lošijim preživljenjem (78, 122). Također određene studije uopće nisu uspjele pronaći bilo kakvu vezu između prekomjerne ekspresije ciklina D1 i prognoze (123, 124). U ovoj studiji gledajući cijelu skupinu ispitivanih pacijentica, nije se našla statistički značajna povezanost između preživljenja i prekomjerne ekspresije ciklin D1 proteina odnosno CCND1 amplikacije. Međutim kada se ispitivana skupina podijelila u pre i post menopauzalnu grupu onda se dobila statistička značajna povezanost između prekomjerne ekspresije ciklin D 1 proteina i boljeg preživljenja ali samo u premenopauzalnoj skupini. Međutim gledajući samo prekomjernu ekspresiju ciklina D1, iako se nije dobila statistički značajna povezanost, ipak se uočio trend boljeg preživljenja i u postmenopauzalnoj skupini kao i gledano na cijelu ispitivanu skupinu zajedno. Također, kada smo uparivali ispitivane parametre kao što su ER, PR, niži histološki stupanj sa snažnom ekspresijom ciklina D1 onda se pokazalo da su ti pacijenti imali bolje preživljenje što sugerira da je prekomjerna ekspresija ciklina D1 dobar prognostički indikator. Budući da nije nađena statistički značajna povezanost između CCND1 amplifikacije i sveukupnog preživljenja prognostički impakt CCND1 amplifikacije indirektno ide u prilog ranijim istraživanjima koja su pokazala da CCND1 amplifikacija nije povezana sa lošijim preživljenjem. Iako pojedina istraživanja upućuju na to da je ciklin D1 glavna meta EGFR signalnog puta u ovoj studiji nije se našla statistički značajna korelacije između HER-2 proteina i ciklina D1, osim inverzne korelacije mEGFR i ciklin D1 ekspresije/CCND1 amplifikacije.

Također nije uočena statistički značajna korelacija između preživljenja i ciklin D1 ko-amplifikacije odnosno ko-ekspresije sa HER-2 i EGFR proteinom/genom.

U zaključku možemo reći da je najvažniji rezultat ove studije neovisni prognostički značaj nEGFR (multivarijantna analiza) koji daje novo značenje EGFR proteinu. Važno je naglasiti da dobiveni rezultati sugeriraju da nEGFR putem ciklina D1 potiče proliferaciju tumorskih stanica i agresivnije ponašanje te posljedično tome lošije preživljenje pacijentica. Ukoliko prekomjerna ekspresija ciklina D1 nije združena sa snažnom nEGFR ekspresijom, onda takvi tumori imaju manje agresivan tijek i posljedično bolje preživljenje pacijentica.

Ciljno usmjerena terapija redefinira ulogu i značaj patologije ističući stalnu potrebu za identificiranjem kliničko relevantnih bioloških faktora među tumorima kako bi se što bolje okarakterizirala i razumjela biologija svakog specifičnog entiteta raka dojke, a liječenje što više individualiziralo.

6. ZAKLJUČCI

Budući da je cilj ove studije bio ispitati proteinsku ekspresiju i gensku amplifikaciju HER-2, mEGFR, nEGFR, ciklina D1 i status 17 kromosoma u invazivnom duktalnom raku dojke te podatke korelirati sa patohistološkim parametrima, menopauzalnim statusom i preživljenjem pacijentica, iz dobivenih rezultata mogu se izvući sljedeći zaključci:

1. Naši rezultati su u skladu s ranijim studijama koje su pokazale da je HER-2 proteinska ekspresija statistički značajno udružena s genskom amplifikacijom. Prema tome HER-2 proteinska ekspresija može se koristiti kao zamjena za evaluaciju statusa gena u tumorskim stanicama dojke.

2. HER-2 proteinska ekspresija je pokazala obrnuto proporcionalnu korelaciju sa ER, PR i direktnu korelaciju sa polisomijom 17. kromosoma, dok je Ki-67 bio na granici statističke značajnosti. HER-2 amplifikacija gena je pokazala obrnuto proporcionalnu korelaciju sa histološkim stupnjem, ER, PR i proporcionalnu korelaciju sa Ki-67. Univarijantna analiza je pokazala da nema statistički značajne korelacije HER-2 proteinske ekspresije i preživljenja u cjelokupnoj skupini niti u pre ili post menopauzalnoj skupini pacijentica. HER-2 genska amplifikacija je bila na granici statističke značajnosti u korelaciji sa lošijim preživljenjem u cjelokupnoj skupini pacijentica i imala je jasnu statistički značajnu povezanost sa lošijim preživljenjem u premenopauzalnoj skupini pacijentica.

3. U ovoj studiji 20.68% uzoraka je imalo polisomiju 17. kromosoma i utvrđena je statistički značajna korelacija sa ekspresijom HER-2 proteina. Usporedbom tri grupe tumora, s polisomijom 17. kromosoma, sa HER-2 amplifikacijom i bez HER-2 amplifikacije nije dobivena statistički značajna razlika u patohistološkim karakteristikama. Međutim pokazalo se da tumori sa polisomijom 17 imaju statistički značajno lošije preživljenje u odnosu na tumore bez HER-2 amplifikacije gena.

4. Membranska ekspresija EGFR proteina utvrđena je u 10.7% tumora, a nuklearna EGFR ekspresija u 40.69% tumora. Amplifikacija EGFR gena je dokazana samo u tumorima sa snažnom membranskom ekspresijom EGFR. Statističke univarijantne i multivarijantne analize su pokazale značaj nuklearnog EGFR proteina kao prognostičkog faktora povezanog sa lošijim preživljenjem bolesnica sa invazivnim duktalnim rakom dojke.

5. mEGFR proteinska ekspresija korelira sa histološkim stupnjem, negativnim ER i PR, Ki-67 i ciklinom D1. EGFR genska amplifikacija korelira sa histološkim stupnjem i Ki-67. nEGFR korelira sa veličinom tumora, metastazama u limfnim čvorovima i NPI, i kod premenopauzalne skupine pronađena je još korelacija sa ER. Prognostička važnost mEGFR prekomjerne ekspresije i EGFR amplifikacije na preživljenje nije se mogla neovisno evaluirati zbog malog broja informativnih slučajeva (svega 2 pacijenta). nEGFR je pokazao statistički značajnu korelaciju sa lošijim preživljenjem u cjelokupnoj skupini i

u premenopauzalnoj grupi pacijentica. Od ispitivanih parametara jedino se nEGFR u multivarijantnoj analizi pokazao kao neovisni prognostički faktor preživljenja.

6. Ciklin D1 proteinska ekspresija statistički značajno korelira sa CCND1 genskom amplifikacijom.

7. Proteinska ekspresija ciklina D1 korelira sa pozitivnim ER, NPI i mEGFR, dok CCND1 genska amplifikacija korelira samo sa mEGFR. Univarijanta analiza je pokazala trend boljeg preživljenja u cijeloj skupini pacijenata i u postmenopauzalnoj grupi, no statistički značajna korelacija sa boljim preživljenjem nađena je samo u premenopauzalnoj grupi pacijentica.

8. Nisu nađene statistički značajne korelacije između ko-ekspresije ili ko-amplifikacije između ispitivanih parametara i preživljenja, osim ko-ekspresije ciklina D1 i nEGFR. Pronađeno je da tumori sa umjerenom/snažnom ekspresijom ciklina D1 i nEGFR imaju statistički lošije kumulativno preživljenje u usporedbi sa tumorima koji imaju umjernu/snažnu ekspresiju ciklina D1 i negativno/slabo nEGFR bojanje. Utvrđeno je statistički značajno bolje preživljenje pacijentica koje su imale ciklin D1 prekomjernu ekspresiju i ER pozitivne tumore, PR pozitivne tumore i tumore histološkog stupnja I. Ostale korelacije između ispitivanih markera i patohistoloških parametara nisu bile statistički značajne.

7. LITERATURA

1. WHO Cancer database Fact sheet N°297 February 2006. Available from URL: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, accessed 19.05.2009.
2. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, IARC CancerBase No.5.Version 2.0. Lyon (Francuska): IARCPress; 2004.
3. Znaor A. Rak dojke u Hrvatskoj - kako stojimo i što očekujemo? Hrvatski časopis za javno zdravstvo 2008 Siječanj; 4(13). Available from URL: <http://www.hcjz.hr/pr.php?id=13572&rnd>, pristupljeno 17.06.2008.
4. Pakkiri P, Lakhani SR, Smart CE. Current and future approach to the pathologist's assessment for targeted therapy in breast cancer. Pathology 2009; 411: 89-99.
5. Bouchalova K, Cizkova M, Cwiertka K, Trojanec R, Hajduch M. Triple negative breast cancer-current status and prospective targeted treatment based on HER1 (EGFR), TOP2 and C-MYC gene assessment. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2009; 153: 13-18.
6. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2005. Bilten br. 30. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2007.

7. Šamija M i sur. Onkologija. Zagreb:Medicinska naklada; 2000.
8. Reis-Filho JS, Lakhani SR. Breast cancer special types: why bother? J Pathol 2008; 216: 394-8.
9. Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. J Natl Cancer Inst 1995; 87:1681-5.
10. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogene 2007; 26:6469-87.
11. Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. Trends Mol Med 2007;13: 527-34.
12. Reid A, Vidal L, Shaw H, de Bono J. Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu). Eur J Cancer 2007; 43: 481-9.
13. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. Ann Oncol 2001;12 Suppl 1:S3-8.
14. Ramsauer VP, Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells. J Biol Chem 2003; 278: 30142-7.

- 15.** Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 2003; 284: 54-65.

- 16.** Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 341-54.

- 17.** Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR i sur. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 1996; 15: 254-64.

- 18.** Magkou C, Nakopoulou L, Zoubouli C i sur. Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2008; 10:R49.

- 19.** Bhargava R, Gerald WL, Li AR i sur. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol* 2005; 18:1027-33.

- 20.** van Krieken JH, Jung A, Kirchner T i sur. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 2008; 453: 417-31.

- 21.** Harari PM, Huang SM. Modulation of molecular targets to enhance radiation. *Clin Cancer Res* 2000;6:323-325.
- 22.** Beser AR, Tuzlali S, Guzey D i sur. HER-2, TOP2A and chromosome 17 alterations in breast cancer. *Pathol Oncol Res* 2007;13:180-5.
- 23.** Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ i sur. HER-2/neu testing in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2003; 120 Suppl:S53-71.
- 24.** Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177-82.
- 25.** Järvinen TA, Liu ET. HER-2/neu and topoisomerase IIalpha--simultaneous drug targets in cancer. *Comb Chem High Throughput Screen* 2003; 6: 455-70.
- 26.** Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ i sur. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 379-98.
- 27.** Rosenberg CL. Polysomy 17 and HER-2 amplification: true, true, and unrelated. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4856-8.

- 28.** Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer--the present. *Histopathology* 2008; 52: 82-90.
- 29.** Fornier M, Risio M, Van Poznak C, Seidman A. HER2 testing and correlation with efficacy of trastuzumab therapy. *Oncology (Williston Park)* 2002; 16: 1340-52.
- 30.** Schnitt SJ, Jacobs TW. Current status of HER2 testing: caught between a rock and a hard place. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 806-10.
- 31.** Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol* 2005; 36: 250-61.
- 32.** Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN i sur; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 118-45.
- 33.** Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP i sur; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 354: 2103-11.

34. Levine MN, Bramwell VH, Pritchard KI i sur. Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2651-8.

35. Järvinen TA, Tanner M, Rantanen V i sur. Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 2000; 156: 839-47.

36. Ellis MJ, Coop A, Singh B i sur. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2001;19: 3808-16.

37. Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol* 2001;12 Suppl 1: S9-13.

38. Hyun CL, Lee HE, Kim KS i sur. The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer. *J Clin Pathol* 2008; 61:317-21.

- 39.** Merola R, Mottolese M, Orlandi G i sur. Analysis of aneusomy level and HER-2 gene copy number and their effect on amplification rate in breast cancer specimens read as 2+ in immunohistochemical analysis. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1501-6.
- 40.** Varshney D, Zhou YY, Geller SA, Alsabeh R. Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HercepTest and PathVysion FISH assay. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 70-7.
- 41.** Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M i sur. The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: a fluorescent in situ hybridization, immunohistochemical, and isotopic mRNA in situ hybridization study. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1221-7.
- 42.** Torrisi R, Rotmensch N, Bagnardi V i sur. HER2 status in early breast cancer: relevance of cell staining patterns, gene amplification and polysomy 17. *Eur J Cancer* 2007; 43: 2339-44.
- 43.** Wang S, Hossein Saboorian M, Frenkel EP i sur. Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. *Mod Pathol* 2002; 15: 137-45.

- 44.** Reinholz MM, Bruzek AK, Visscher DW i sur. Breast cancer and aneusomy 17: implications for carcinogenesis and therapeutic response. *Lancet Oncol* 2009; 10: 267-77.
- 45.** Lambros MB, Natrajan R, Reis-Filho JS. Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer. *Hum Pathol* 2007; 38:1105-22.
- 46.** Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003; 284: 99-110.
- 47.** Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 4: S9-15.
- 48.** Paez JG, Jänne PA, Lee JC i sur. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-500.
- 49.** Lynch TJ, Bell DW, Sordella R i sur. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-39.
- 50.** Milanezi F, Carvalho S, Schmitt FC. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 417-34.

- 51.** Cho EY, Choi YL, Han JJ, Kim KM, Oh YL. Expression and amplification of Her2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer: immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Pathol Int* 2008; 58: 17-25.
- 52.** Rampaul RS, Pinder SE, Wencyk PM i sur. Epidermal growth factor receptor status in operable invasive breast cancer: is it of any prognostic value? *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2578.
- 53.** Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S. Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 71: 67-75.
- 54.** Chan SK, Hill ME, Gullick WJ. The role of the epidermal growth factor receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2006;11:3-11.
- 55.** Yehiely F, Moyano JV, Evans JR, Nielsen TO, Cryns VL. Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12: 537-44.
- 56.** Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* 2006; 25: 5846-53.

- 57.** Kersting C, Kuijper A, Schmidt H i sur. Amplifications of the epidermal growth factor receptor gene (egfr) are common in phyllodes tumors of the breast and are associated with tumor progression. *Lab Invest* 2006; 86: 54-61.
- 58.** Torregrosa D, Bolufer P, Lluch A i sur. Prognostic significance of c-erbB-2/neu amplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer and their relation to estradiol receptor (ER) status. *Clin Chim Acta* 1997; 262: 99-119.
- 59.** Lo HW, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Huang SF, Hung MC. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 338-48.
- 60.** Marti U, Burwen SJ, Wells A i sur. Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocyte nuclei. *Hepatology* 1991; 13: 15-20.
- 61.** Lo HW, Hsu SC, Hung MC. EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocalization. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 95: 211-8.
- 62.** Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer* 2006; 94:184-8.

- 63.** Lin SY, Makino K, Xia W i sur. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 802-8.
- 64.** Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M i sur. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 2005; 7: 575-89.
- 65.** Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E i sur. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 643-55.
- 66.** Haas-Kogan DA, Prados MD, Lamborn KR, Tihan T, Berger MS, Stokoe D. Biomarkers to predict response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cell Cycle* 2005; 4: 1369-72.
- 67.** Sherr C. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-7.
- 68.** Gillett C, Smith P, Peters G, Lu X, Barnes D. Cyclin – dependent kinase inhibitor p27 kip 1 expression and interaction with other cell cycle-associated proteins in mammary carcinoma. *J Pathol* 1999; 187: 200-6.
- 69.** Arnold A, Papanikolaou A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4215-24.

70. Wang T, Cardiff R, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt EV. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 1994; 369: 669-71.
71. Kamalati T, Davies D, Titley J, Crompton MR. Functional consequences of cyclin D1 overexpression in human mammary luminal epithelial cells. *Clin Exp Metastasis* 1998; 5: 415-26.
72. Zwijsen RM, Wientjens E, Klompaker R, van der Sman J, Bernards R, Michalides RJ. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 1997; 88: 405-15.
73. Zwijsen RM, Buckle RS, Hijmans EM, Loomans CJ, Bernards R. Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes Dev* 1998; 12: 3488-98.
74. Gaben AM, Saucier C, Bedin M, Redeuilh G, Mester J. Mitogenic activity of estrogens in human breast cancer cells does not rely on direct induction of mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase or phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2700-13.

75. Sabbah M, Courilleau D, Mester J, Redeuilh G. Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 11217-22.

76. Elsheikh S, Green AR, Aleskandarany MA i sur. CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. Breast Cancer Res Treat 2008; 109: 325-35.

77. Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB i sur. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis. Mod Pathol 2006;19:999-1009.

78. Kenny FS, Hui R, Musgrove EA i sur. Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor –positive breast cancer. Clin Cancer Res 1999; 5: 2069-76.

79. Hwang TS, Han HS, Hong YC, Lee HJ, Paik NS. Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients. Pathol Int 2003;53:74-80.

80. Gillett C, Lee A, Millis R, Barnes D. Cyclin D1 and associated proteins in mammary ductal carcinoma *in situ* and atypical ductal hyperplasia. J Pathol 1998; 184: 396-400.

- 81.** Park K, Han S, Kim HY, Ko I. Cytologic evaluation of cyclin D1 expression in primary breast carcinoma. *Cancer* 2001; 93: 211-5.
- 82.** Roy PG, Thompson AM. Cyclin D1 and breast cancer. *Breast* 2006;15:718-727.
- 83.** Jirström K, Stendahl M, Rydén L i sur. Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. *Cancer Res* 2005;65:8009-16.
- 84.** Stendahl M, Kronblad A, Rydén L, Emdin S, Bengtsson NO, Landberg G. Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *Br J Cancer* 2004; 90:1942-8.
- 85.** Ahnström M, Nordenskjöld B, Rutqvist LE, Skoog L, Stål O. Role of cyclin D1 in ErbB2-positive breast cancer and tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 91:145-51.
- 86.** Lenferink AE, Busse D, Flanagan WM, Yakes FM, Arteaga CL. ErbB2/neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways. *Cancer Res* 2001; 61: 6583-91.

- 87.** Bilalović N, Vranić S, Basić H, Tatarević A, Selak I. Immunohistochemical evaluation of cyclin D1 in breast cancer. *Croat Med J* 2005; 46: 382-8.
- 88.** Zhou Q, Fukushima P, DeGraff W i sur. Radiation and the Apo2L/TRAIL apoptotic pathway preferentially inhibit the colonization of premalignant human breast cells overexpressing cyclin D1. *Cancer Res* 2000; 60: 2611-5.
- 89.** Han EK, Begemann M, Sgambato A i sur. Increased expression of cyclin D1 in a murine mammary epithelial cell line induces p27kip1, inhibits growth, and enhances apoptosis. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 699-710.
- 90.** Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-10.
- 91.** Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 37-47; quiz 50-1.
- 92.** Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 22: 207-19.
- 93.** Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW i sur. A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1982; 45: 361-6.

- 94.** Blamey RW, Ellis IO, Pinder SE i sur. Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990-1999. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1548-55.
- 95.** D'Eredita' G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer* 2001; 37: 591-6.
- 96.** Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J i sur. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 8534-40.
- 97.** Liu K, Muse SV. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 2005; 21: 2128-9.
- 98.** Mayr D, Heim S, Werhan C, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T. Comprehensive immunohistochemical analysis of Her-2/neu oncoprotein overexpression in breast cancer: HercepTest (Dako) for manual testing and Her-2/neuTest 4B5 (Ventana) for Ventana BenchMark automatic staining system with correlation to results of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Virchows Arch* 2009; 454: 241-8.

- 99.** Vanden Bempt I, Van Loo P, Drijkoningen M i sur. Polysomy 17 in breast cancer: clinicopathologic significance and impact on HER-2 testing. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4869-74.
- 100.** Hofmann M, Stoss O, Gaiser T i sur. Central HER-2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin) phase II monotherapy study: Assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. *J Clin Pathol* 2008; 61:89-94.
- 101.** Suo Z, Risberg B, Kalsson MG i sur. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol* 2002; 196: 17-25.
- 102.** Buchholz TA, Tu X, Ang KK i sur. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in patients who have breast carcinoma treated with doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 2005; 104: 676-81.
- 103.** DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton SM, Whalen SG, Moore D 2nd, Thor AD. Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1152-60.
- 104.** Kamio T, Shigematsu K, Sou H, Kawai K, Tsuchiyama H. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma. *Hum Pathol* 1990; 21: 277-82.

- 105.** Wang SC, Lien HC, Xia W i sur. Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell* 2004; 6: 251-61.
- 106.** Offterdinger M, Schöfer C, Weipoltshammer K, Grunt TW. c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 2002; 157: 929-39.
- 107.** Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 2001; 294: 2179-81.
- 108.** Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B i sur. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2005; 280: 31182-9.
- 109.** Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother Oncol* 2005; 76: 157-61.
- 110.** Gillett C, Smith P, Gregory W et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer* 1996; 69: 92-9.

- 111.** Lee A, Park WC, Yim HW, Lee MA, Park G, Lee KY. Expression of c-erbB2, cyclin D1 and estrogen receptor and their clinical implications in the invasive ductal carcinoma of the breast. *Jpn J Clin Oncol.* 2007; 37: 708-14.
- 112.** Molland JG, Donnellan M, Janu NC, Carmalt HL, Kennedy CW, Gillett DJ. Infiltrating lobular carcinoma--a comparison of diagnosis, management and outcome with infiltrating duct carcinoma. *Breast* 2004; 13: 389-96.
- 113.** Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J i sur. Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. *Cancer Res* 1997; 57: 4360-7.
- 114.** Cuny M, Kramar A, Courjal F i sur. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. *Cancer Res* 2000; 60: 1077-83.
- 115.** Butt AJ, McNeil CM, Musgrove EA, Sutherland RL. Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12 Suppl 1: S47-59.
- 116.** Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004; 145: 5439-47.

- 117.** Koziczak M, Holbro T, Hynes NE. Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins. *Oncogene* 2004; 23: 3501-8.
- 118.** Cicatiello L, Addeo R, Sasso A i sur. Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 7260-74.
- 119.** Park KJ, Krishnan V, O'Malley BW, Yamamoto Y, Gaynor RB. Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell* 2005; 18: 71-82.
- 120.** Neuman E, Ladha MH, Lin N i sur. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5338-47.
- 121.** Makretsov NA, Huntsman DG, Nielsen TO i sur. Hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data identifies prognostically significant groups of breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6143-51.

122. Henry JA, Hennessy C, Levett DL, Lennard TW, Westley BR, May FE. int-2 amplification in breast cancer: association with decreased survival and relationship to amplification of c-erbB-2 and c-myc. *Int J Cancer* 1993; 53: 774-80.

123. van Diest PJ, Michalides RJ, Jannink L i sur. Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. Correlations and prognostic value. *Am J Pathol* 1997; 150: 705-11.

124. Reed W, Flørens VA, Holm R, Hannisdal E, Nesland JM. Elevated levels of p27, p21 and cyclin D1 correlate with positive oestrogen and progesterone receptor status in node-negative breast carcinoma patients. *Virchows Arch* 1999; 435: 116-24.

POPIS SKRAĆENICA

ASCO – Američko društvo za kliničku onkologiju (American Society of Clinical Oncology)

CCND1 – ciklin D1 gen

Cdk – ciklin ovisna kinaza

Cdki – inhibitor ciklin ovisne kinaze

CMF – ciklofosfamid, metotreksat i fluorouracil

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EGF – epidermalni faktor rasta

EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta

ER – estrogen receptor

FISH – fluorescentna *in situ* hibridizacija

HE – hemalaun eozinom

HER – humani receptor epidermalnog faktora rasta

HZZJZ – Hrvatski zavod za javno zdravstvo

IKK α – inhibitor kapa B kinaze alfa

iNOS – inducibilna dušični oksid sintetaza (inducible nitric oxide synthase)

LVI – limfo vaskularna invazija

MAPK – mitogen aktivirajuće protein kinaze

mEGFR – membranski EGFR

mRNA – glasnička (messenger) ribonukleinska kiselina

nEGFR – nuklearni EGFR

NPI – Nottingham prognostički indeks

pEGFR – fosforilirani EGFR

PI3K – fosfoinozitol-3-kinaza

PR – progesteron receptor

pRB – fosforilirani retinoblastomski protein

SRC-1 – koaktivator steroidnog receptora

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TGF- α – transformirajući faktor rasta-alfa

TKIs – inhibitori tirozin kinaza

TMA – tkivnim mikroarejima (tissue microarrays)

TOP2 – topoizomreaza II α

**EUROPEAN
CURRICULUM VITAE
FORMAT**



Studeni 2009.g.

OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Ita Hadžisejdić
Adresa	Medovićeva 27, 51000 Rijeka
Telefon	051 263 270
Elektronička pošta, Web adresa	itah@net.hr
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	06.06.1974.
Matični broj iz Upisnika znanstvenika	279625

RADNO ISKUSTVO

• Datumi (od – do)	2005 - do sada
Ustanova zaposlenja	Medicinski fakultet u Rijeci, Zavod za patologiju
Naziv radnog mjesta	Asistent
Funkcija	Liječnik u molekularno dijagnostičkom laboratoriju
Područje rada	Molekularna dijagnostika
• Datumi (od – do)	1999 - 2000
Ustanova zaposlenja	KBC Rijeka
Naziv radnog mjesta	Stožista
Funkcija	Liječnik pripravnik
Područje rada	Liječnik pripravnik na stažu

ŠKOLOVANJE

Datum	2002 - 2005
Mjesto	Winnipeg, Kanada
Ustanova	Faculty of Medicine, University of Manitoba
Zvanje	Magistar znanosti (M.Sc)
Datum	1993 - 1999
Mjesto	Rijeka
Ustanova	Medicinski fakultet Sveučilšta u Rijeci
Zvanje	Doktor medicine

USAVRŠAVANJE

Godina	2008
Mjesto	Medical University of Graz, Austrija
Ustanova	Institute of Hygiene, Microbiology and Environmental Medicine
Područje	Dijagnostika CMV i HPV

Godina	2007
Mjesto	Medical University of Graz, Austrija
Ustanova	Institute of Hygiene, Microbiology and Environmental Medicine
Područje	Dijagnostika HCV i HBV

Godina	2005
Mjesto	Bonn-Duisdorf, Njemačka
Ustanova	Institutu za patologiju Bollmann
Područje	Fluorescenta in situ hibridizacija (FISH)

Godina	2002-2005
Mjesto	Winnipeg, Kanada
Ustanova	Faculty of Medicine, University of Manitoba
Područje	Virologija-reovirus

Godina	2000-2002
Mjesto	Rijeka
Ustanova	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Područje	Rak dojke - duktalni invazivni tipa NOS

**OSOBNJE VJEŠTINE I
KOMPETENCIJE**

Materinji jezik	Hrvatski
-----------------	----------

Strani jezici

Jezik	Engleski (položen IELTS akademski nivo)
Govori	Odlično
Piše	Odlično
Čita	Odlično

**SOCIJALNE VJEŠTINE I
KOMPETENCIJE**

Edukacija studenata, timski rad sa suradnicima

**ORGANIZACIJSKE
VJEŠTINE I KOMPETENCIJE**

Organizacija rada u laboratoriju, organizacija praktične i seminarske nastave za studente

TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE	Molekulsko-laboratorijske tehnike
OSTALE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE	Poznavanje rada na računalu: Windows Me i XP; MS Office; Adobe Photoshop; Scion Image; PyMol; Sigma plot; Image J; Internet pretraživanje

PRIVITCI	<p>KVALIFIKACIJSKI RADOVI</p> <p><u>Hadžisejdić I.</u> Mammalian reovirus: Characterization of outer capsid protein changes along virus to ISVP transition pathway, Faculty of Medicine, University of Manitoba, Kanada, 2005. (Magistarski rad)</p> <p>SURADNIK NA ZNANSTVENIM PROJEKTIMA</p> <p>062-0000000-3550 - Grahovac Blaženka: MOLEKULARNI MEHANIZMI KRONIČNE INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA C</p> <p>Znanstveno-tehnička suradnja Hrvatska-Austrija 2008-2009</p> <p>HUMANI PAPILOMAVIRUS U CERVICALNIM NEOPLAZIJAMA: DA LI SU METODE TEMELJENE NA DOKAZIVANJU VIRUSNE MRNA BOLJE OD METODA KOJE DOKAZUJU VIRUSNU DNA?</p> <p>Znanstveno-tehnička suradnja Hrvatska-Austrija 2006-2007 HEPATITIS C VIRUS (HCV) LOAD AND QUASISPECIES COMPLEXITY DURING ANTI-HCV THERAPY</p> <p>SURADNIK NA PROJEKTIMA GRADA RIJEKE</p> <p>PREVALENCIJA HEPATITISA C U GRADU RIJECI 2007-2008</p> <p>ZNANSTVENI RADOVI</p> <p>Radovi indeksirani u Current Contents</p> <p><u>Hadžisejdić I.</u>, Mustać E, Jonjić N, Petković M, Grahovac B. Nuclear EGFR in ductal invasive breast cancer : correlation with cyclin D1 and prognosis. Mod Pathol 2009 (prihvaćeno za publiciranje)</p> <p>Braut T, Krstulja M, Kujundzić M, Manestar D, <u>Hadžisejdić I.</u>, Jonjić N, Grahovac B, Manestar D. Epidermal growth factor receptor protein</p>
-----------------	--

expression and gene amplification in normal, hyperplastic, and cancerous glottic tissue: immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study on tissue microarrays. *Croat Med J.* 2009; 50(4):370-9.

Sabol I, Čretnik M, Hadžisejdić I, Si-Mohamed A, Matovina M, Grahovac B, Levanat S, Grce M. A new approach for the evaluation of the human papillomavirus type 16 variability with high resolution melting analysis. *J Virol Methods.* 2009; 162 (1-2): 142-7.

Đorđević G, Matušan-Ilijaš K, Babarović E, Hadžisejdić I, Grahovac M, Grahovac B, Jonjić N. Hypoxia inducible factor-1alpha correlates with vascular endothelial growth factor A and C indicating worse prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:40.

Koidl C, Bozic M, Hadžisejdić I, Grahovac M, Grahovac B, Kranewitter W, Marth E, Kessler HH. Comparison of molecular assays for detection and typing of human papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199(2):144.e1-6.

Michelin BD, Hadžisejdić I, Bozic M, Grahovac M, Hess M, Grahovac B, Marth E, Kessler HH. Detection of Cytomegalovirus DNA in EDTA Whole Blood Samples: Evaluation of the Quantitative artus(R) CMV LC PCR Kit in Conjunction with Automated Sample Preparation. *J Clin Microbiol* 2008; 46(4): 1241-1245

Kujundžić M, Cvjetković N, Batinac T, Hadžisejdić I, Zamolo G, Velepić M, Brumini G, Brusić S. Quantitative analysis of nasal vascularization in allergic patients treated with mometasone furoate. *Rhinology* 2007; 45(2):140-143.

Batinac T, Zamolo G, Hadžisejdić I, Žauhar G, Brumini G, Ružić A, Peršić V. Expression of bcl-2 family proteins in psoriasis. *Croat Med J* 2007; 48(3):319-326.

Hadžisejdić I, Krašević M, Haller H, Grahovac B. Distribution of human papillomavirus types in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Coll Antropol* 2007; 31 Suppl 2: 97-102.

Grahovac M, Račić I, Hadžisejdić I, Dorić A, Grahovac B. Prevalence of human papillomavirus among Croatian women attending regular gynecological visit. *Coll Antropol* 2007; 31 Suppl 2: 73-77.

Batinac T, Hadžisejdić I, Brumini G, Ružić A, Vojniković B, Zamolo G. Expression of cell cycle and apoptosis regulatory proteins and telomerase in melanocytic lesions. *Coll Antropol* 2007; 31 Suppl 1:17-22.

Manestar-Blažić T, Batinac T, Hadžisejdić I, Brajac I. Apoptosis and immune response are responsible for the site-specific incidence of non-melanoma skin cancer. *Med Hypotheses* 2007; 68(4):853-855.

Hadžisejdić I, Šimat M, Bosak A, Krašević M, Grahovac B. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cervical cancer and precursor lesions. *Coll Antropol* 2006;30(4):879-883.

Batinac T, Zamolo G, Hadžisejdić I, Zauhar G. A comparative study of granzyme B expression in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci* 2006; 44(2):109-112.

Batinac T, Zamolo G, Hadžisejdić I. Telomerase in anti-tumor response. *Med Hypotheses* 2007;68(1):128-130.

Batinac T, Zamolo G, Čoklo M, Hadžisejdić I, Štemberger C, Žauhar G. Expression of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 2006; 202(8): 599-607.

Batinac T, Zamolo G, Čoklo M, Hadžisejdić I. Possible key role of granzyme B in keratoacanthoma regression. *Med Hypotheses* 2006; 66(6): 1129-1132.

Hadžisejdić I, Keding C, Werner E, Wilkins J, Coombs K. High-resolution mass spectrometric mapping of reovirus digestion. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20(3): 438-446.

Radovi koji nisu indeksirani u Current Contents

Mišković B, Stipoljev F, Hadžisejdić I, Grahovac B. Prenatal genotyping of the RHD locus by polymerase chain reaction in fetus at risk of hemolytic disease. *Liječ Vjesn* 2008; 130: 4-6.

STRUČNI RADOVI

Štifter S, Lučin K, Grahovac B, Hadžisejdić I, Valković T, Seili-Bekafigo I, Načinović-Duletić A, Petranović D, Host I, Marijić B, Aralica M, Dvornik Š, Jonjić N. Angiogeneza u multiplom mijelomu. *Bilten Krohema* 2009; 1 (1): 36.

Grahovac B, Hadžisejdić I. Molecular diagnosis of hepatitis C infection. *Medicina* 2007; 43(2): 132-137.

Krašević M, Hadžisejdić I, Grahovac B. Patohistologija prekanceroza i karcinoma vrata maternice. Medix 2007; 72/73: 91-92.

SAŽETCI

Lučin K, Matušan-Ilijaš K, Damante G, Fabbro D, Đorđević G, Hadžisejdić I, Grahovac M, Marić I, Španjol J, Grahovac B, Jonjić N. Osteopontin expression correlates with nuclear factor- κ B activation and apoptosis downregulation in clear cell renal cell carcinoma. Virchows Arch. 2009; 455 (Suppl 1): S1-S482. CC

Dorić A, Grahovac M, Hadžisejdić I, Tomljenović S, Hruskar Z, Grahovac B. Human papillomavirus infection in men: prevalence and HPV type distribution. Clin Chem Lab Med 2008; 46(4): A56. CC

Hadžisejdić I, Grahovac M, Kovač D, Krašević M, Grahovac B. Tissue microarray study of tumour biomarkers in HPV induced cervical neoplasia. Virchows Arch. 2007; 451 (2): 398-399. CC

Hadžisejdić I, Šimat M., Krašević M., Grahovac B. 23rd Interantional Papillomavirus Conference and Clinical Workshop 2006, Prague, Czech Republic, Human papillomavirus types in adenocarcinoma, adenocarcinoma *in situ* and adenosquamous carcinoma in Rijeka region, Croatia

Hadžisejdić I, Grahovac M, Varnai A, Kovač D, Krašević M, Grahovac B. Adriatic Society of Pathology, 21st International Meeting of Adriatic Society of Pathology, 2006, Trieste, Italy, Immunohistochemical profiling of proteins involved in HPV induced uterine cervix carcinogenesis: A tissue microarray study

Hadžisejdić I and Coombs K. American Society for Virology, 23rd Annual Meeting 2004, Montreal, Canada, Structural and functional protein changes during reovirus entry.

SUDJELOVANJE NA MEĐUNARODNIM SKUPOVIMA

22nd European Congress of Pathology 2009, Florence, Italy, Poster prezentacija "Osteopontin expression correlates with nuclear factor- κ B activation and apoptosis downregulation in clear cell renal cell carcinoma"

24th Meeting of the Adriatic Society of Pathology 2009, Duino/Devin, Italy, Oralna prezentacija "Cyclin D1 and nuclear EGFR in invasive ductal breast carcinoma"

4th International qPCR Symposium and Exhibition and Workshops “Diagnostics and Molecular Markers” 2009, Technische Universität Munich, Freising-Weihenstephan, Germany

5th International HPV and Skin Cancer Conference 2008, Heidelberg, Germany, Poster prezentacija “Human papillomavirus DNA versus RNA based methods and risk evaluation of cervical dysplasia”

7th International Symposium on Molecular Diagnostics 2008, Medical University of Graz, Austria, Poster prezentacija “Human papillomavirus infection in men: prevalence and HPV type distribution”

21st European Congress of Pathology 2007, Istanbul, Turkey, Poster prezentacija “Tissue microarray study of tumour biomarkers in HPV induced cervical neoplasia”

International workshop on Human Papillomaviruses and consensus recommendations for cervical cancer prevention & colposcopy training 2007, Dubrovnik, Republic of Croatia, Oralna prezentacija “Laser Capture Microdissection and PCR for analysis of HPV Infection”

23rd Interantional Papillomavirus Conference and Clinical Workshop 2006, Prague, Czech Republic, Poster prezentacija “Human papillomavirus types in adenocarcinoma, adenocarcinoma *in situ* and adenosquamous carcinoma in Rijeka region, Croatia”

Adriatic Society of Pathology 2006, 21st International Meeting, Trieste, Italy Oralna prezentacija “Immunohistochemical profiling of proteins involved in HPV induced uterine cervix carcinogenesis: A tissue microarray study” i poster prezentacija “Validation of Tissue Microarrays and Image-Analysis Technology in Evaluation of Ki67 Renal Cell Carcinoma”

American Society for Virology 2004, 23rd Annual Meeting, McGill University, Montreal Poster prezentacija “Structural and functional protein changes during reovirus entry”

International Antibiotic Resistance Symposium 2004, Faculty of Medicine, University of Manitoba

Canadian Student Health Research Forum: Nutrition, Lifestyle and Health 2004, Faculty of Medicine, University of Manitoba; poster prezentacija

Research Day: Diabetes 2003, Faculty of Medicine, University of Manitoba; poster prezentacija

Research Day: Bio-Imaging Symposium 2002, Faculty of Medicine, University of Manitoba

SUDJELOVANJE NA DOMAĆIM ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

1. Hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem 2009, Opatija, Croatia, Poster prezentacija “ Human papillomavirus infection in men”

4th Croatian Congress of Pathology and Forensic Medicine with International Participation 2008, Osijek, Croatia, Poster prezentacija “Synchronous skin carcinomas analysed by immunohistochemistry and laser capture microdissection followed by PCR for HPV”

STRUKOVNA PREDAVANJA

XXVII. Saltykow Memorial Meeting, Zagreb, 2009

Hrvatski liječnički zbor, Društvo za kemoterapiju: Racionalna farmakoterapija u primarnoj zdravstvenoj zaštiti 2001

NAGRADE, PRIZNANJA I STIPENDIJE

1993. Soros Fondacija (akademska god. 1993/94)

2008. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci - Najbolji mladi znanstvenik za kliničke medicinske znanosti, stomatologiju i javno zdravstvo

ČLANSTVA

Hrvatski liječnički zbor, od 1999.

Hrvatska liječnička komora, od 2001.

Udruga studenta poslijediplomskih studija Sveučilišta Manitoba od 2002

VLASTORUČNI POTPIS
