

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Olivera S. Mitrović

Korelacija između proteinske i genske ekspresije HER-2 i topoizomeraze 2a kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2013. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Olivera S. Mitrović

Correlation between protein and gene  
expression of HER-2 and topoisomerase 2a in  
infiltrative ductal breast carcinoma

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

**MENTOR:** Prof. dr Vesna Koko, redovni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i naučni savetnik Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu (od oktobra 2012. godine u penziji)

**MENTOR:** Dr med. sci. Vladan Čokić, viši naučni saradnik Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu

**ČLAN KOMISIJE:** Dr med. sci. Mirela Budeč, viši naučni saradnik Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu

**ČLAN KOMISIJE:** Dr biol. sci. Milica Markelić, docent, Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu,

*Za pomoć u izradi ove doktorske disertacije zahvaljujem se:*

*Mojoj porodici, posebno mom Rastku, zahvaljujem na podršci, razumijevanju kao i korisnim sugestijama koje mi je pružao u toku svih faza izrade ovog rada.*

*Svom mentoru dr Vladanu Čokiću, koji je svojim ogromnim angažovanjem doprineo realizaciji ove doktorske disertacije i pokazao da jedan čovjek zaista može sve da postigne.*

*Prof. dr Vesni Koko, redovnom profesoru Biološkog fakulteta u Beogradu, zahvaljujem na korisnim sugestijama koje su doprinele realizaciji ove doktorske disertacije.*

*Dr Milevi Mičić zahvaljujem na angažovanju, strpljenju i nesebičnoj podršci u toku svih faza izrade ovog rada.*

*Članovima komisije, dr Mireli Budeč i dr Milici Markelić, zahvaljujem na korisnim sugestijama.*

*Kolegama i prijateljima iz Laboratorije za imunohistohemiju i elektronsku mikroskopiju IMI-ja, zahvaljujem na saradnji i pomoći u toku rada.*



## KORELACIJA IZMEĐU PROTEINSKE I GENSKE EKSPRESIJE HER-2 I TOPOIZOMERAZE 2A KOD INFILTRATIVNOG DUKTALNOG KARCINOMA DOJKE

### REZIME

**Uvod:** Karcinom dojke predstavlja jako heterogeno oboljenje kao i jedno od najzastupljenijih malignih bolesti u opštoj ženskoj populaciji. Na osnovu prisustva i nivoa ekspresije ER-R, PR-R i HER-2 receptora ostvarena je podela na četiri molekularna tipa karcinoma dojke: luminalni A (ER-R<sup>+</sup> i / ili PR-R<sup>+</sup>, HER-2<sup>-</sup>), luminalni B (ER-R<sup>+</sup> i / ili PR-R<sup>+</sup>, HER-2<sup>+</sup>), HER-2 pozitivni (ER-R<sup>-</sup> i / ili PR-R<sup>-</sup>, HER-2<sup>+</sup>) i trostruko negativni (ER-R<sup>-</sup> i / ili PR-R<sup>-</sup>, HER-2<sup>-</sup>) tip karcinoma dojke. U oko 20 do 30% karcinoma dojke javlja se amplifikacija *HER-2* i *TOP2A* gena. Amplifikacija *HER-2* i *TOP2A* gena je povezana sa lošijim ishodom bolesti, agresivnijim tokom i dobrim odgovorom pacijentkinja na terapiju Herceptinom i antraciklinima. Koamplifikacija *HER-2* i *TOP2A* gena je prisutna u 12 do 38% karcinoma dojke. Na osnovu rezultata nekoliko studija postavljena je hipoteza po kojoj se amplifikacija *TOP2A* gena javlja isključivo sa amplifikacijom *HER-2* gena, mada postoje i drugačija, suprotna mišljenja.

**Cilj:** Cilj naše studije bio je da se odrede genski statusi *HER-2* i *TOP2A* kao i njihova korelacija sa apoptotskim i proliferativnim indeksom, nivoom ekspresije ER-R, PR-R i HER-2 receptora, TOP2A, BRCA1, Bcl-2 i p53 proteina, osnovnim kliničko-patološkim parametrima kod tumora dojke 60 pacijentkinja podeljenih u četiri molekularna tipa.

**Materijal i metode:** Šezdeset tkivnih uzoraka karcinoma dojke ispitivano je imunohistohemijskom metodom na prisustvo i stepen ekspresije ER-R, PR-R, HER-2, p53, Bcl-2, TOP2A, BRCA1, ssDNA, Ki67, kao i FISH metodom na stepen genske modifikacije *HER-2* i *TOP2A*. Stepen modifikacije *HER-2* i *TOP2A* gena analiziran je primenom *HER-2* FISH pharmDxTM kit i *TOP2A* FISH pharmDxTM kit (DakoCytomation).

### **Rezultati:**

**Kliničko-patološki podaci** - Starost ispitanica se kretala u rasponu između 38 i 87 godina ( $64.79 \pm 21$ ). Veličina tumora se kretala u opsegu između 0.4 i 5.5 cm, dok je

histološki gradus G1 bio zastupljen kod 6 (10%) karcinoma, histološki gradus G2 kod 25 (41.7%) i histološki gradus G3 kod 17 (28.3%) karcinoma dojke. Kod 26 (43.4%) ispitanica infiltracija regionalnih limfnih čvorova tumorskim ćelijama je bila odsutna, dok je kod 22 (36.6%) ispitanice zabeležena pozitivna infiltracija regionalnih limfnih čvorova. Metastaze su prisutne kod sedam ispitanica dok je kod 39 ispitanica registrovan uredan nalaz bez prisustva metastaza.

***HER-2 i TOP2A genske aberacije kod ispitanica sa četiri različita molekularna tipa karcinoma dojke*** - U luminalnom A tipu karcinoma dojke amplifikacija *HER-2* gena je zastupljena samo u jednom tumoru (1/24, 4.2%), dok je visok nivo amplifikacije *TOP2A* gena zabeležen u tri karcinoma (3/24, 12.5%), nizak nivo amplifikacije u pet (5/24, 20.8%), dok je delecija *TOP2A* gena zastupljena u karcinomu jedne ispitanice (1/24, 4.2%).

Nizak nivo amplifikacije *HER-2* gena zabeležen je u pet (5/26, 19.3%) dok je visok nivo genske amplifikacije zabeležen u šest karcinoma (6/26, 23%) luminalnog B tipa. Genske modifikacije *TOP2A* su bile učestalije u odnosu na *HER-2* u tumorima ispitanica luminalnog B tipa. Nizak nivo amplifikacije *TOP2A* karakterisao je tumore šest ispitanica (6/26, 23.1%), visok nivo amplifikacije zabeležen je u karcinomima pet ispitanica (5/26, 19.2%), dok je *TOP2A* genska delecija zastupljena u četiri tumora (4/26, 15.4%).

Nizak nivo amplifikacije *TOP2A* gena zastupljen je samo u jednom tumoru (1/4, 25%) trostruko negativnog tipa. Visok nivo amplifikacije *HER-2* gena zabeležen je kod četiri tumora (4/6, 66.7%), a nizak nivo amplifikacije u samo jednom tumoru (1/6, 16.7%) *HER-2* pozitivnog tipa. Genske modifikacije *TOP2A* su zabeležene u tumorima kod četiri ispitanice, od toga je kod tri zabeležen nizak nivo amplifikacije (3/6, 50%), a kod jedne visok nivo amplifikacije *TOP2A* gena (1/6, 16.7%).

***Korelacija između genskog statusa HER-2 i TOP2A sa ekspresijom drugih bioloških markera*** - Statistički značajna negativna korelacija karakterisala je odnos između *HER-2* genskog statusa i ekspresije ER-R, PR-R i Bcl-2 proteina, dok je statistički značajna pozitivna korelacija karakterisala odnos stepena ekspresije *HER-2* receptora i *TOP2A* genskog statusa. U tumorima trostruko negativnog tipa takođe je zabeležena statistički

značajna negativna korelacija između ekspresije TOP2A, BRCA1 proteina i *HER-2* genskog statusa, dok je pozitivna korelacija karakterisala odnos između p53 proteina i *HER-2* genskog statusa. U tumorima ispitanica luminalnog A tipa, *TOP2A* genski status negativno je korelirao sa stepenom ekspresije Bcl-2 proteina.

**Preživljavanje i tip terapije** - Tipovi primenjenih terapija kod ispitanica obuhvaćenih ovom studijom sastojali su se od endokrine, hemoterapije, terapije zračenjem i terapije primenom antitela Herceptina. Kod većine pacijentkinja iz sva četiri molekularna tipa karcinoma dojke primenjena je kombinacija hemoterapijskih agenasa (AC, CMF), hormonska terapija (tamoksifen, nolvadeks) i terapija zračenjem. Studija je obuhvatila praćenje toka bolesti ispitanica u toku četvorogodišnjeg perioda (januar 2009. do februara 2013.). U toku ovog vremenskog perioda kod dve ispitanice je nastupila smrt kao direktna posledica ove bolesti dok kod njih 39 nije bilo znakova bolesti. Prosečan period opšteg preživljavanja kao i preživljavanje bez pojave recidiva iznosi 34.8 meseci. Prosečno najduži period opšteg preživljavanja registovan je kod ispitanica sa *HER-2* pozitivnim tipom karcinoma dojke i iznosio je  $44.8 \pm 10.2$  meseca. Najkraći period opšteg preživljavanja karakterisao je ispitanice sa trostruko negativnim tipom karcinoma dojke (iznosio je  $19.5 \pm 18$  meseci).

**Zaključak:** Rezultati ove studije su pokazali da tumore luminalnog A i B tipa generalno karakteriše mala veličina, odsustvo infiltracije regionalnih limfnih nodusa tumorskim ćelijama i dugačak period opšteg preživljavanja u odnosu na tumore trostruko negativnog tipa. Luminalne tipove tumora je takođe najčešće odlikovao nizak nivo ekspresije proteina p53, visok nivo očuvane ekspresije Bcl-2 proteina kao i niske vrednosti indeksa proliferacije. Karcinome *HER-2* pozitivnog tipa odlikovala je potpuno redukovana ekspresije Bcl-2 proteina, nizak indeks apoptoze, kao i dominantno prisustvo *HER-2* i *TOP2A* genskih aberacija. Tumore luminalnog tipa karakteriše dobra prognoza ishoda bolesti kod ispitanica, mala verovatnoća za pojavu metastaza, kao i dobar odgovor na hormonsku terapiju (nolvadeks, tamoksifen) u poređenju sa ispitanicama čiji tumori imaju odlike trostruko negativnog i *HER-2* pozitivnog tipa. Takođe, karcinomi dojke ispitanica sa luminalnim A i B tipom odlikuje visok stepen

zastupljenosti genskih aberacija *TOP2A* u odnosu na *HER-2* genski status što opravdava njegovu ulogu samostalnog prediktivnog i prognostičkog markera u karcinomu dojke.

Na osnovu sumiranja svih rezultata iznetih u ovoj disertaciji može se zaključiti da luminalne tipove karcinoma dojke sa jedne strane, i trostruko negative i *HER-2* pozitivne tipove karcinoma sa druge strane, karakteriše određeni obrazac ekspresije ispitivanih bioloških markera što je značajno za izbor terapije, predviđanje odgovora na terapiju i ishoda same bolesti kod ispitanica sa karcinomom dojke.

**Ključne reči:** molekularni tipovi karcinoma dojke, *HER-2* i *TOP2A* genske aberacije, ER-R, PR-R, *HER-2*, *TOP2A*, *BRCA1*, p53, Bcl-2, Ki67 i ssDNA imunohistohemijska ekspresija.

**Naučna oblast:** Biologija.

**Uža naučna oblast:** Biologija ćelija i tkiva.

UDK broj: [616-006.6 : 612.664.1] : 576.385.5 (043.3)

# CORRELATION BETWEEN PROTEIN AND GENE EXPRESSION OF HER-2 AND TOPOISOMERASE 2A IN INFILTRATIVE DUCTAL BREAST CARCINOMA

## SUMMARY

**Introduction:** Breast cancer is a heterogeneous disease and the most common malignancy in women with increasing incidence in recent years. According to immunohistochemical expression of estrogen receptor (ER-R), progesterone receptor (PR-R) and HER-2 four different molecular subtypes of breast cancer were identified: luminal A (ER-R<sup>+</sup> and / or PR-R<sup>+</sup>, HER-2<sup>-</sup>), luminal B (ER-R<sup>+</sup> and / or PR-R<sup>+</sup>, HER-2<sup>+</sup>), HER-2 positive (ER-R<sup>-</sup> and / or PR-R<sup>-</sup>, HER-2<sup>+</sup>) and triple negative (ER-R<sup>-</sup> and / or PR-R<sup>-</sup>, HER-2<sup>-</sup>) breast cancer subtypes. *HER-2* and *TOP2A* genes are amplified in 20–30 % of breast cancers. Amplification of *HER-2* and *TOP2A* genes are associated with a poor prognosis and predictive response to treatment by Herceptin and anthracycline. Co-amplification of *HER-2* and *TOP2A* has been seen in approximately 12–38 % of patients with breast cancers. A few retrospective studies have reported that *TOP2A* gene amplification occurs almost exclusively in conjunction with *HER-2* gene amplification.

**Aim:** The aim of our study is to investigate *HER-2* and *TOP2A* gene aberrations and their correlation with apoptotic and proliferative indexes, Bcl-2, p53, ER-R, PR-R, HER-2, TOP2A, BRCA1, clinicopathological parameters and overall survival in four molecular subtypes of breast cancer.

**Material and methods:** Sixty paraffin-embedded breast cancer tissue samples were studied immunohistochemically for the expression of ER-R, PR-R, HER-2, p53, Bcl-2, ssDNA, Ki67, BRCA1, TOP2A and FISH for *HER-2* and *TOP2A* gene aberrations. *HER-2* and *TOP2A* gene copy number were analyzed by *HER-2* FISH pharmDx™ kit and *TOP2A* FISH pharmDx™ kit (DakoCytomation), respectively.

## Results:

**Clinicopathological parameters** - The ages of patients ranged from 38 to 87 years (64.79 ± 21). The tumor size ranged between 0.4 and 5.5 cm, and the histological grades

were G1, G2 and G3 in 6 (10 %), 25 (41.7 %), and 17 (28.3 %) patients, respectively. In 26 patients (43.4 %) lymph node status was negative; while in 22 patients (36.6 %) was detected positive lymph node status. Distant metastasis characterized 7 (15.3 %) patients and in 39 (84.7 %) patients we did not find a distant metastasis.

***HER-2 and TOP2A gene aberrations in four molecular subtypes of breast cancer*** - Among 24 patients of luminal A subtype, only in one case (1/24, 4.2 %) a low level of *HER-2* gene amplification was detected, while 3 cases (3/24, 12.5 %) were highly amplified for *TOP2A*, 5 cases (5/24, 20.8 %) had low level of *TOP2A* gene amplification and in one case (1/24, 4.2 %) *TOP2A* gene deletion was detected. We characterized 5 cases with low (5/26, 19.3 %) and 6 cases with high (6/26, 23 %) level of *HER-2* gene amplification in total 26 patients of luminal B subtype of breast cancer. In the same subtype, a low level of *TOP2A* gene amplification was detected in 6 cases (6/26, 23.1 %), high level in 5 cases (5/26, 19.2 %) and in 4 cases (4/26, 15.4 %) were detected *TOP2A* gene deletion. In patients with triple negative subtypes of breast cancer, only one case (1/4, 25 %) had a low level of *TOP2A* gene amplification whereas all other cases did not have *HER-2* or *TOP2A* gene aberrations. In *HER-2* positive subtype of breast cancer, we characterized 4 cases (4/6, 66.7 %) with high amplified *HER-2* gene, and one case (1/6, 16.7 %) with a low level of *HER-2* gene amplification. *TOP2A* gene had a low level of amplification in 3 cases (3/6, 50 %) and in one case (1/6, 16.7 %) a high level of *TOP2A* gene amplification was registered.

***Correlation between HER-2 and TOP2A gene aberrations with expression of other biological markers*** - *HER-2* gene aberrations correlated negatively with ER-R, PR-R and Bcl-2 protein, while statistically significant positive correlation was detected between *HER-2* gene aberrations and *HER-2* receptor expression and *TOP2A* gene aberrations. *HER-2* gene aberrations correlated positively with p53 protein expression in triple negative breast cancer subtype. Statistically significant negative correlation was detected between the expression of *TOP2A* and BRCA1 protein in comparison with the *HER-2* gene status in triple negative breast cancer subtype. In luminal A molecular breast cancer subtype, *TOP2A* gene aberration negatively correlated with Bcl-2 protein expression.

***Survival analysis and therapy*** - Treatment was nonrandomized and consistent with endocrine therapy, chemotherapy, radiotherapy, Herceptin and their different combinations. In the most patients from all four molecular subtypes of breast cancer a combination of chemotherapy agents (AC, CMF), hormonal therapy (tamoxifen, nolvadex) and radiotherapy was applied. Follow-up of the patients extended from January 2009. to February 2013. Two patients died of breast carcinoma and 39 patients did not have symptoms of remission. The median of disease free survival (DFS) and overall survival (OS) were 34.8 months. We found that DFS and OS were significantly longer ( $44.8 \pm 10.2$  months) in patients with HER-2 positive molecular subtype. The shortened OS characterized patients with triple negative breast cancer subtype ( $19.5 \pm 18$  months).

***Conclusion:*** The results of this study showed that luminal A and B subtypes of breast cancer are generally characterized by small tumor size, negative lymph node status, as well as a longer period of overall survival compared to the triple negative breast cancer subtype. Breast cancers from luminal A and B subtypes are characterized with low levels of p53 protein expression and proliferative index, but high level of Bcl-2 protein expression. In HER-2 positive breast cancer subtype tumor has negative expression for Bcl-2 protein, low level of apoptotic index, and high level of *HER-2* and *TOP2A* gene aberrations. Luminal A and B breast cancers have a more favourable prognosis, small occurrence of metastases and good response to hormonal therapy (nolvadex, tamoxifen), compared to the triple negative and HER-2 positive tumors. Also, patients in luminal A and B breast cancer subtypes are characterized by a high proportion of cases with amplification and deletion of *TOP2A* gene in comparison to *HER-2* gene status, justifying *TOP2A* significance as an individual prognostic marker regarding anthracycline therapy.

According to presented results we concluded that the luminal A and B breast cancer subtypes on one side and triple negative and HER-2 positive breast cancer molecular subtypes on the other side share similar specific model of expression of studied biological markers that are important for the choice of therapy, prediction response to therapy and outcome of the disease in patients with breast cancer.

**Keywords:** molecular subtypes of breast cancer, *HER-2* and *TOP2A* gene aberrations, ER-R, PR-R, HER-2, p53, Bcl-2, TOP2A, BRCA1, Ki67 and ssDNA expression.

**Scientific field:** Biology.

**Special topics:** Cell and Tissue Biology.

UDK number: [616-006.6 : 612.664.1] : 576.385.5 (043.3)



# SADRŽAJ

## I UVOD

I.1. KARCINOM DOJKE .....	1
I.1.1. Epidemiologija .....	1
I.1.2. Etiologija .....	2
I.1.2. 1. Faktori spoljašnje sredine .....	3
I.1.2.2. Endokrini činioci–egzogeni i endogeni hormoni .....	4
I.1.2.3. Genetički faktori u nastanku karcinoma dojke .....	5
I.1.2.3.1. Amplifikacija gena kod infiltrativnih karcinoma dojke .....	6
I.1.2.3.2. Gubitak heterozigotnosti kod karcinoma dojke-LOH .....	7
I.1.2.3.3. Tumor-supresorski geni kod karcinoma dojke .....	7
I.1.2.3.4. Genske promene kod naslednog (familijarnog) karcinoma dojke.....	8
I.2. KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE.....	9
I.2.1. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke .....	11
I.2.2. Luminalni tip karcinoma dojke.....	12
I.2.2.1. Luminalni A tip karcinoma dojke.....	12
I.2.2.2. Luminalni B tip karcinoma dojke.....	13
I.2.3. Tripl ili trostruko negativni tip karcinoma dojke .....	13
I.2.4. HER-2 pozitivni tip karcinoma dojke.....	14
I.3. BIOLOGIJA KARCINOMA DOJKE.....	14
I.3.1. TNM klasifikacija karcinoma dojke i histološki gradus tumora (G).....	16
I.3.2. BIOLOŠKI MARKERI KARCINOMA DOJKE I NJIHOV OPŠTI ZNAČAJ	18
I.3.2.1. FAMILIJA RECEPTORA EPIDERMALNIH FAKTORA RASTA–HER/c- erbB .....	18
I.3.2.2. HER-2 RECEPTOR (receptor za humani epidermalni faktor rasta 2) .....	19
I.3.2.3. HER-2 i transtuzumab / Herceptin .....	21
I.3.2.3. HER-2 receptor i CMF terapija .....	22
I.3.2.4. HER-2 receptor i taksani .....	22
I.3.2.5. HER-2 i antraciklini .....	23

I.3.3. BIOLOGIJA TOPOIZOMERAZE 2A (TOP2A) .....	23
I.3.3.1. Intratumorska heterogenost <i>TOP2A</i> genskog lokusa u tumorskim ćelijama karcinoma dojke.....	25
I.3.4. STEROIDNI RECEPTORI (ER-R i PR-R) I KARCINOM DOJKE .....	26
I.3.4.1. Estrogenski receptor (ER-R) i karcinom dojke .....	27
I.3.4.2. Progesteronski receptor (PR-R) i karcinom dojke.....	28
I.3.5. GEN <i>TP53</i> / PROTEIN P53 I KARCINOM DOJKE.....	28
I.3.6. PROTOONKOGEN <i>BCL-2</i> / PROTEIN BCL-2 I KARCINOM DOJKE .....	31
I.3.7. APOPTOZA I KARCINOM DOJKE .....	34
I.3.7.1. Strukturne odlike ćelije tokom procesa apoptoze .....	35
I.3.7.2. Apoptoza u karcinomu dojke.....	36
I.3.7.3. Familija Bcl-2 proteina u apoptotskom modelu karcinoma dojke .....	38
I.3.7.4. Evaluacija indeksa apoptoze u karcinomu dojke.....	39
I.3.8. PROLIFERATIVNI MARKER (KI-67) I KARCINOM DOJKE.....	40
I.3.8.1. Struktura i funkcija Ki67 proteina.....	40
I.3.8.2. Ki67 i karcinom dojke .....	41
I.3.8.3. Prognostički značaj Ki67.....	42
I.3.8.4. Prediktivni značaj Ki67 .....	43
I.3.8.5. Prediktivni značaj Ki67 - neoadjuvantni tretman.....	44
I.4. BRCA1 (BREAST CANCER) I KARCINOM DOJKE.....	46
I.4.1. Gen BRCA1 .....	46
I.4.2. Protein BRCA1 .....	46
I.4.3. Fenotipske karakteristike karcinoma dojke s mutacijama gena <i>BRCA1</i> .....	47
II CILJ ISTRAŽIVANJA .....	48
III MATERIJAL I METODE .....	49
III.1. ISPITANICI .....	49
III.2. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke.....	49
III.3. PATOHISTOLOŠKA ANALIZA.....	51
III.3.1. Priprema uzoraka za rutinski patohistološki pregled, imunohistohemijska i FISH ispitivanja .....	51
III.3.2. Rutinski makroskopski i patohistološki pregled.....	51
III.4. IMUNOHISTOHEMIJSKA ISPITIVANJA .....	51
III.4.1. Princip primenjene imunohistohemijske metode LSAB <sup>+</sup> /HRP .....	52

III.4.2. Protokol imunohistohemijske metode LSAB <sup>+</sup> /HRP.....	52
III.4.2.1. Demaskiranje antigena.....	54
III.4.2.2. Postupak bojenja .....	54
III.4.2.3. Kontrola kvaliteta i specifičnosti imunohistohemijskog bojenja.....	55
III.5. SEMIKVANTITATIVNA PROCENA EKSPRESIJE PROTEINA HER-2, ER-R, PR-R, p53, Bcl-2, BRCA1, TOP2A, KAO I KVANTITATIVNO ISPITIVANJE INDEKSA PROLIFERACIJE (Ki67) I INDEKSA APOPTOZE (ssDNA) .....	55
III.5.1. Semikvantitativna procena ekspresije HER-2 proteina .....	56
III.5.2. Semikvantitativna procena ekspresije ER-R i PR-R.....	56
III.5.3. Semikvantitativna procena nukleusne akumulacije tumor supresorskog proteina p53 .....	57
III.5.4. Semikvantitativna procena ekspresije proteina Bcl-2.....	57
III.5.5. Semikvantitativna procena ekspresije proteina BRCA1 .....	58
III.5.6. Semikvantitativna procena ekspresije proteina TOP2A .....	58
III.5.7. Određivanje indeksa proliferacije - Ki67.....	58
III.5.8. Određivanje indeksa apoptoze - ssDNA .....	59
III.6. FISH ISPITIVANJA .....	59
III.6.1. Princip primenjene FISH metode .....	59
III.6.2. Protokol primenjene FISH metode .....	60
III.6.3. Kvantifikacija signala .....	61
III.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA .....	62
IV REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	63
IV.1. REZULTATI KLINIČKIH ISPITIVANJA .....	63
IV.1.1. Kliničko-patološka ispitivanja karcinoma dojke.....	63
IV.2. REZULTATI ISPITIVANJA EKSPRESIJE BIOLOŠKIH MARKERA .....	67
IV.2.1. Rezultati ispitivanja ekspresije ER-R i PR-R .....	67
IV.2.2. Rezultati ispitivanja ekspresije tumor supresornog proteina p53 .....	71
IV.2.3. Rezultati ekspresije receptora HER-2.....	72
IV.2.4. Rezultati ispitivanja indeksa apoptoze - ssDNA .....	75
IV.2.5. Rezultati ispitivanja indeksa proliferacije – Ki67 .....	76
IV.2.6. Rezultati ekspresije proteina Bcl-2.....	79
IV.2.7. Rezultati ekspresije BRCA1 proteina.....	81
IV.2.8. Rezultati ekspresije TOP2A proteina .....	82

IV.2.9. Rezultati ispitivanja <i>HER-2</i> genskog statusa.....	84
IV.2.10. Rezultati praćenja <i>TOP2A</i> genskog statusa.....	87
IV.3. REZULTATI POREĐENJA EKSPRESIJE BIOLOŠKIH MARKERA KARCINOMA DOJKE SA KLINIČKO - PATOLOŠKIM PARAMETRIMA.....	90
IV.3.1. Ekspresija bioloških markera karcinoma dojke u odnosu na životno doba ispitanica.....	90
IV.4. REZULTATI KORELACIJE EKSPRESIJE ISPITIVANIH BIOLOŠKIH MARKERA U ODNOSU NA GENSKI STATUS <i>HER-2</i>	100
IV.4.1. Korelacija ekspresija ER-R u odnosu na genski status <i>HER-2</i> .....	100
IV.4.2. Korelacija ekspresije PR-R u odnosu na genski status <i>HER-2</i> .....	101
IV.4.3. Korelacija ekspresije p53 proteina u odnosu na genski status <i>HER-2</i> .....	104
IV.4.4. Korelacija ekspresije proteina Bcl-2 u odnosu na genski status <i>HER-2</i> .....	106
IV.4.5. Korelacija ekspresije proteina Ki67 u odnosu na genski status <i>HER-2</i> .....	108
IV.4.6. Korelacija ekspresije ssDNA (indeksa apoptoze) u odnosu na genski status <i>HER-2</i> .....	110
IV.4.7. Korelacija ekspresije <i>HER-2</i> receptora u odnosu na genski status <i>HER-2</i> .....	112
IV.4.8. Korelacija ekspresije BRCA1 proteina u odnosu na genski status <i>HER-2</i> .....	114
IV.4.9. Korelacija ekspresije <i>TOP2A</i> proteina u odnosu na genski status <i>HER-2</i> .....	116
IV.5. REZULTATI KORELACIJE EKSPRESIJE ISPITIVANIH BIOLOŠKIH MARKERA U ODNOSU NA GENSKI STATUS <i>TOP2A</i>	118
IV.5.1. Korelacija ekspresije ER-R u odnosu na genski status <i>TOP2A</i> .....	118
IV.5.2. Korelacija ekspresije PR-R u odnosu na genski status <i>TOP2A</i> .....	119
IV.5.3. Korelacija ekspresije tumor supresornog proteina p53 u odnosu na genski status <i>TOP2A</i> .....	121
IV.5.4. Korelacija ekspresije Bcl-2 proteina u odnosu na genski status <i>TOP2A</i> .....	123
IV.5.5. Korelacija ekspresije Ki67 proteina (indeksa proliferacije) u odnosu na genski status <i>TOP2A</i> .....	125
IV.5.6. Korelacija ekspresije ssDNA (indeksa apoptoze) u odnosu na genski status <i>TOP2A</i> .....	127
IV.5.7. Korelacija ekspresije <i>HER-2</i> receptora u odnosu na genski status <i>TOP2A</i> .....	129
IV.5.8. Korelacija ekspresije BRCA1 proteina u odnosu na genski status <i>TOP2A</i> .....	131
IV.5.9. Korelacija ekspresije <i>TOP2A</i> proteina u odnosu na genski status <i>TOP2A</i> .....	133
IV.5.10. Korelacija <i>HER-2</i> i <i>TOP2A</i> genskih statusa.....	135
V DISKUSIJA .....	136
V.1. KLINIČKI PODACI.....	136

V.2. FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE MOLEKULARNIH TIPOVA KARCINOMA DOJKE–OPŠTA RAZMATRANJA.....	140
V.2.1. ER-R i PR-R kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke.....	142
V.2.2. Tumor supresorni protein p53 kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke	144
V.2.3. HER-2 protein kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke.....	146
V.2.4. Bcl-2 protein kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke .....	149
V.2.5. Ki67 protein kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke .....	151
V.2.6. Apoptotski indeks kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke .....	153
V.2.7. BRCA1 protein kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke .....	155
V.2.8. TOP2A protein kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke.....	158
V.2.9. Genski status <i>HER-2</i> i <i>TOP2A</i> kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke	159
V.2.10. Prognostički značaj genskog statusa <i>HER-2</i> i <i>TOP2A</i> u karcinomu dojke..	162
V.3. KLINIČKI ZNAČAJ ISPITIVANJA GENSKIH MODIFIKACIJA U KARCINOMU DOJKE .....	165
V.3.1. Značaj ispitivanja proteinskog i genskog statusa <i>HER-2</i> u karcinomu dojke	165
V.3.2. Značaj ispitivanja proteinskog i genskog statusa <i>TOP2A</i> u karcinomu dojke ....	168
VI ZAKLJUČAK	172
VII LITERATURA	175

# I UVOD

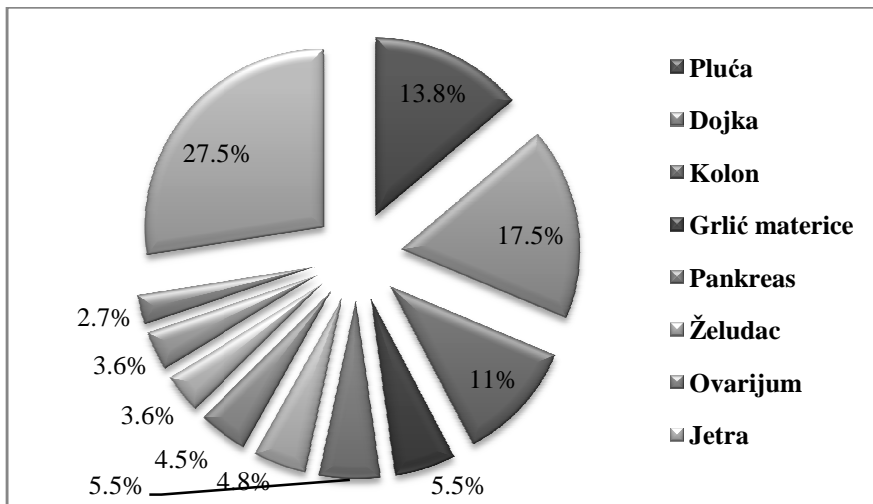
## I.1. KARCINOM DOJKE

### I.1.1. Epidemiologija

Karcinom dojke predstavlja najčešći vid maligniteta kod žena širom sveta i čini više od 20% svih malignih bolesti u ženskoj populaciji. Prema podacima većine zemalja sveta, osim azijskih, incidenca karcinoma dojke i mortalitet rastu sa godinama, a najviši su kod žena od 85 godina i starijih, gde je incidenca čak preko 350/100.000<sup>1,2</sup>.

Prema riziku od nastanka ovog oboljenja ustanovljena je podela na zemlje visokog rizika (Severna Amerika i severna Evropa), zemlje srednjeg rizika (Južna Amerika i južna Evropa) i zemlje niskog rizika (Azija i Afrika)<sup>1,2</sup>.

Najviši rizik od nastanka karcinoma dojke je u razvijenim zemljama Severne Amerike, Evrope i Australije gde se kod 6% žena razvije invazivni karcinom pre 75. godine života. Nešto niži rizik od pojave oboljenja javlja se u manje razvijenim regionima subsaharske Afrike i južne i istočne Azije, uključujući i Japan, gde je verovatnoća za pojavu karcinoma dojke tri puta manja nego u zemljama Evrope i Amerike.



**Grafikon 1.** Zastupljenost smrtnosti od različitih vrsta maligniteta u ženskoj populaciji u Srbiji u 2009. godini

Do kraja 2007. godine u Srbiji bilo je oko 15 000 žena koje su bile na terapiji za karcinom dojke, dok se svake godine broj pacijentkinja sa ovom dijagnozom povećava za

4000 novih slučajeva. U svetu se incidenca povećava za 1% godišnje, zbog čega se procenjuje da će u prvoj deceniji trećeg milenijuma gotovo milion žena oboljeti od karcinoma dojke širom sveta. Standardizovana stopa mortaliteta je 22.4 na 100.000 žena, odnosno 1300 umrlih žena godišnje, što predstavlja vodeći uzrok smrti (18% od ukupnog mortaliteta žena) <sup>1-3</sup>.

Uvođenjem organizovanog skrininga za karcinom dojke, novih metoda rane dijagnostike i ciljane onkološke terapije, smrtnost usled karcinoma dojke u Americi i zemljama EU opada iz godine u godinu, tako da je u poslednjih 35 godina smanjena za 35% <sup>2</sup>.

### **I.1.2. Etiologija**

Identifikovane su tri moguće grupe činilaca/faktora rizika odgovornih za razvoj karcinoma dojke: **genetički, endokrini i faktori spoljašnje sredine** <sup>4-7</sup>.

Najznačajniji genetički činioci se odnose na aktivaciju protoonkogeni na 17q (npr. HER-2/neu), inaktivaciju tumor supresorskih gena sa genskog lokusa 1p, 1q, 3p, 5p, 6q, 7q, 8p, 13q, 15q, 16q, 17p (p53), 17q (BRCA, NF 1) i 18q i inaktivaciju gena odgovornih za popravku oštećene DNK. Endokrini činioci su: endogeni hiperestrinizam, egzogeni unos hormona (oralna kontracepcija) i neadekvatno hormonsko lečenje. Među najznačajnijim faktorima spoljašnje sredine koji dovode do pojave i razvoja karcinoma dojke su: virusne infekcije, povećano konzumiranje alkohola, izloženost jonizujućem zračenju, pušenje i stres <sup>6,7</sup>.

Noviji epidemiološki i klinički podaci ukazuju da gojaznost kod žena u postmenopausalnom periodu života predstavlja jedan od faktora rizika za pojavu karcinoma dojke, razvoj posebno agresivnih tumorskih formi, kao i rezistentnost na delovanje antikarcinomskih lekova. Precizan molekularni mehanizam ovog procesa nije poznat, ali se pretpostavlja da je povezan sa hormonom leptinom koga sintetišu i luče adipociti. Ishrana je takođe važan faktor rizika, s obzirom da je dokazana veza između mnogih aktivnih supstanci iz hrane i pojave karcinoma dojke, kao i protektivnog dejstva ovih supstanci <sup>7</sup>.

### I.1.2.1. Faktori spoljašnje sredine

Ishrana i fizička aktivnost, gojaznost, pušenje, stres, abortus i laktacija mogu da utiču na pojavu karcinoma dojke. Epidemiološki podaci ukazuju da povećan rizik od pojave i razvoja karcinoma dojke imaju naročito žene sa tzv. zapadnjačkim stilom života, koji se karakteriše visokokaloričnom dijetom bogatom životinjskim mastima i proteinima, kombinovanom sa nedostatkom fizičke aktivnosti. Pored visokog rizika od nastanka karcinoma dojke, moderni stil života nosi visok rizik od nastanka karcinoma prostate, kolona, rektuma i endometrijuma <sup>7</sup>.

Tokom perioda menopauze uglavnom dolazi do povećanja telesne težine čime se povećava i rizik od pojave karcinoma dojke. Među fizički aktivnim ženama, smanjen je rizik od pojave karcinoma dojke između 20-40%. Ishrana obogaćena voćem i povrćem smanjuje rizik od pojave karcinoma dojke, a konzumiranje crvenog, naročito prženog mesa ga povećava. Neka od nerešenih pitanja koja se tiču ishrane uključuju dugotrajne kumulativne efekte izloženosti kontaminirajućim supstancama, bilo da se one formiraju prilikom kuvanja, kao što su heterociklični amini u prepečenom mesu, ili je reč o ostacima pesticida. Interesantno je da duvan ima antiestrogeno dejstvo zbog čega predstavlja potencijalni protektivni faktor. Pacijentkinje sa psihijatrijskim oboljenjima imaju 3.5 puta veću incidencu nastanka raka dojke u odnosu na ostale bolesnice, tj. 9.5 puta veću u odnosu na opštu žensku populaciju <sup>7</sup>.

Što se tiče uticaja reproduktivnog ponašanja na rizik od pojave karcinoma dojke, utvrđeno je da se karcinom češće javlja kod žena koje su imale ranu menarhu, nikad nisu rađale, ili su rađale više puta a prvi porođaj imale u kasnoj životnoj dobi. Neplodnost *per se* može biti faktor rizika usled izostanka dojenja <sup>7</sup>. Takođe, kasna menopauza znatno povećava rizik od pojave karcinoma dojke. Najnovije studije su pokazale da su godine prilikom porođaja, i to ne samo prvog, povezane sa rizikom od karcinoma dojke, pri čemu porođaji pre tridesete godine imaju protektivni efekat <sup>7</sup>.

U grupu specifičnih karcinogena koji utiču na pojavu i razvoj karcinoma dojke možemo ubrojati izloženost jonizujućem zračenju, izloženost hemijskim agensima, konzumiranje alkohola i virusne infekcije <sup>7</sup>. Višegodišnje prospektivne studije koje su sprovedena na ženskoj populaciji Hirošime i Nagasakija koje su bile izložene nuklearnom zračenju pokazale su da kod njih postoji povećan rizik od pojave karcinoma



dojke, naročito kod onih žena koje su u vreme zračenja bile u periodu puberteta <sup>7</sup>. Karcinom dojke je češći u određenim grupama zanimanja uključujući menadžere i administrativne i kancelarijske službenice, kod kojih postoji poremećaj cirkadijalnog ritma (u toku noćnog rada), s obzirom da žene koje rade pretežno noću imaju veći rizik od pojave karcinoma <sup>2</sup>.

Tokom poslednjih 15-ak godina raste broj dokaza o potencijalno štetnom riziku od izlaganja ne samo hormonima, već i veštačkim supstancama koje imaju hormonsku aktivnost. Na osnovu ovih nalaza nastao je koncept o tzv. kseno-hormonima, pre svega o kseno-estrogenima. Biološka uloga ovih supstanci je nepoznata. Većina epidemioloških studija ukazuje na značaj različitih organohlornih pesticida koji zaostaju u životnom okruženju duže vreme, kao i u masnom tkivu različitih životinja, uključujući i čoveka <sup>7</sup>.

Na osnovu eksperimenata na životinjama postavljena je i hipoteza o virusima kao mogućim uzročnicima karcinoma dojke. Istraživanja su pokazala da kod miševa retrovirus dovodi do pojave tumora dojke ukoliko se prenese putem mleka od majke na ženske potomke. Takođe, jedan od potencijalnih kancerogena je i Epstein-Barr-ov virus, iako ispitivanja koja su sprovedena u SAD ne predstavljaju potpuno siguran dokaz o njegovoj kancerogenosti <sup>7</sup>.

### **I.1.2.2. Endokrini činioci – egzogeni i endogeni hormoni**

Oralna kontraceptivna sredstva i supstituciona terapija u menopauzi imaju najveći uticaj na pojavu i razvoj karcinoma dojke. Studije koje su sprovedene na ženama koje su u postmenopauzalnom periodu koristile estrogensku terapiju pokazuju malo povećanje rizika koje je u korelaciji sa dužinom upotrebe estrogenske terapije <sup>1,7</sup>.

Međutim, postoje i čvrsti dokazi koji idu u prilog velikom značaju seksualnih steroidih (androgeni, estrogen, progesteron) hormona u razvoju tumora dojke <sup>1</sup>. Verovatnoća pojave karcinoma dojke je veća posle menopauze, kada se zaustavlja ovarijalna sinteza estrogena i progesterona i dok se ovarijalna produkcija androgena postepeno smanjuje <sup>7</sup>. Rizik od karcinoma dojke direktno zavisi od izloženosti tkiva dojke dejstvu estrogena. Eksperimenti u *in vitro* uslovima pokazuju da estrogeni utiču na povećavanje indeksa proliferacije ćelija dojke i inhibiraju proces apoptoze. Rizik je

dotatno povećan kod postmenopauzних žena koje imaju povišen nivo testosterona i androstenediona, redukovane nivoa globulina koji se vezuje za seksualne hormone (engl. *sex hormone-binding globuline*-SHBG) i povećanje nivoa estrona, estradiola i raspoloživog estradiola koji se ne vezuju sa SHBG <sup>7</sup>. Jedna od važćih hipoteza „estrogen plus progesteron“, postulira da se rizik od karcinoma dojke dalje povećava kod žena. Hronična hiperinsulinemija može dovesti do povećane ovarijalne ili adrenalne sinteze seksualnih steroida, naročito androgena, i smanjenja hepaticke sinteze SHBG i njegovog nivoa u cirkulaciji <sup>7</sup>. Naročito kod žena u postmenopauzi, povećanje androgena u plazmi dovodi do povećanja sinteze estrogena u adipoznom tkivu i otuda povećanje estrona i estradiola što sve zajedno znatno povećava rizik od pojave i razvoja karcinoma dojke <sup>7</sup>.

### **I.1.2.3. Genetički faktori u nastanku karcinoma dojke**

Karcinom dojke kao i karcinomi drugih organa, nastaje kao rezultat postepene akumulacije genskih poremećaja među kojima su ključni aktivacija onkogeni (putem genske amplifikacije) i inaktivacija tumor-supresorskih gena (putem genskih mutacija i delecija). Takođe se kod karcinoma dojke zapažaju i određene hromozomske aberacije, kao što su hiperploidija, nebalansirana translokacija, amplifikacija određenih hromozomskih podregiona (amplifikacija DNK) i gubitak hromozomskog materijala tj. delecija <sup>4,8-13</sup>.

Približno 75% karcinoma dojke pokazuje hiperploidni broj hromozoma, a kao posledica ove citogenetske promene nastaju nebalansirane translokacije među kojima su najizrazitije i(1)(q10), der(1;16)(q10;p10), i(8)(q10). Navedene genetske aberacije često su udružene sa delecijama na hromozomima 1 (p13, p22, q12, q42), 3 (p12-p14) i 6 (q21) <sup>14</sup>.

Genetskom analizom amfikona u karcinomskim ćelijama dojke identifikovano je više od 20 hromozomskih podregiona u kojima je povećan broj kopija određenih sekvenci DNK (amplifikacija DNK). Ti regioni su: 1q31-q32, 8q24, 11q13, 16p13, 17q12, 17q22-q24 i 20q13 <sup>4</sup>. Međutim, za većinu ovih regiona ostalo je nepoznato koji su kritični geni amplifikovani. Najnovije studije su pokazale da najveći prognostički i prediktivni značaj kod karcinoma dojke imaju genetske aberacije koje se odvijaju u

okviru regiona *HER-2* i *TOP2A* gena. Hromozomski regioni sa povećanim brojem kopija obično se prostiru na 10 megabaza, što sugeriše da je u amplifikaciju uključeno najčešće više od jednog gena <sup>4,9,10</sup>.

#### **I.1.2.3.1. Amplifikacija gena kod infiltrativnih karcinoma dojke**

Tokom pojave i razvoja tumorskih promena često dolazi do aktivacije onkogeni, što se najčešće ostvaruje amplifikacijom onkogeni ili retko putem tačkastih mutacija <sup>15</sup>. Geni koji su najčešće amplifikovani kod karcinoma dojke su: *HER-2* (receptor za humani epidermalni faktor rasta 2), *TOP2A* (topoizomeraza 2 A), *EGFR* (receptor za epidermalni faktor rasta), *FGFR1* (receptor 1 fibroblastnog faktora rasta), *FGFR2* (receptor 2 fibroblastnog faktora rasta), *MYC*. Ovi geni su poznati kao kritične tačke amplifikacije <sup>4</sup>. Na hromozomskom regionu **7p13** amplifikuje se gen *EGFR* i ovaj genski poremećaj prisutan je kod manje od 3% karcinoma dojke. Amplifikacija gena *FGFR1* na regionu **8p12** zapaža se kod 10%, a gena *MYC* na regionu **8q24** kod 20% karcinoma dojke <sup>15</sup>. Gen *FGFR2* koji se nalazi na regionu **10q26** amplifikuje se kod 12% karcinoma dojke. Amplifikacija gena za ciklin D1 (*CCND1*) na hromozomskom regionu **11q13** dešava se kod 15 - 20% karcinoma dojke i udružena je sa ekspresijom ER-R <sup>15,16</sup>. Aktivacija ekspresije ER-R može da se odvija i putem vezivanja ciklina D1, što rezultira u aktivaciji receptora na ligand-nezavisan način <sup>17,18</sup>.

Istraživanja su pokazala da prekomerna ekspresija ciklina D1, koja se registruje imunohistohemijski kod oko 80% slučajeva invazivnih lobularnih karcinoma dojke, nije uvek praćena amplifikacijom gena *CCND1*. Kod karcinoma dojke naročit značaj se pridaje amplifikaciji gena *HER-2* koji se nalazi na hromozomskom regionu **17q12**. Genska amplifikacija *HER-2* najčešće rezultira u prekomernoj ekspresiji proteina **HER-2**, kome se pripisuje uloga važnog prognostičkog i prediktivnog faktora, kod oko 20 - 30% karcinoma dojke <sup>17</sup>. Poslednjih nekoliko godina posebna pažnja je usmerena na ispitivanje prisustva i stepena amplifikacije *TOP2A* gena koji se nalazi u neposrednoj blizini *HER-2* gena <sup>18</sup>. S obzirom na jako blisku lokalizaciju, ova dva gena često podležu istovremenoj amplifikaciji u tumorskim ćelijama, tako da je potvrđena amplifikacija jednog od njih najčešće siguran znak da je amplifikovan i drugi gen. Ovakav fenotip prisutan u tumorskim ćelijama označava se kao koamplifikacija dva

gena<sup>19</sup>. Do sada je pokazano da ovaj fenotip tumorskih ćelija ima benefit kod primene određenih tipova hemoterapijskih agenasa kao i monoklonskih antitela specifično sintetisanih na ove proteine. Nekoliko različitih varijanti koamplifikacije zabeleženo je na hromozomskom regionu **17q22-q24-RPS6KB1, PAT1, TBX2**, i ovakva amplifikacija beleži se kod oko 10% karcinoma dojke. Takođe, na regionu **20q13** moguća je amplifikacija/ko-amplifikacija nekoliko važnih gena – **CSEIL/CAS, NCOA3, ZNF217, CYP24** i **STK15/BTAK/Aurora A**, koja se sreće čak kod 27% karcinoma dojke<sup>15,17,19</sup>.

#### **I.1.2.3.2. Gubitak heterozigotnosti kod karcinoma dojke-LOH**

Poseban vid genske modifikacije koji rezultira gubitkom heterozigotnosti (engl. *Loss of heterozygosity*- LOH) je čest genetički događaj kod karcinoma dojke i u različitom stepenu, može da pogodi bilo koji krak hromozoma<sup>5</sup>. Zapravo radi se o specifičnom gubitku alela, ali i alelnom disbalansu. Često se ovaj vid genske modifikacije izjednačava sa delecijom, iako može biti izazvan i somatskom rekombinacijom. S obzirom da LOH može da pogodi regione na kracima hromozoma koji su nosioci tumor-supresorskih gena, njegov značaj danas je izuzetno aktuelizovan<sup>15</sup>.

#### **I.1.2.3.3. Tumor-supresorski geni kod karcinoma dojke**

Tumor-supresorski geni su geni koji inhibiraju inicijaciju ili progresiju tumorskog rasta<sup>18</sup>. Kod karcinoma dojke identifikovano je nekoliko tumor-supresorskih gena, od kojih će najvažniji biti navedeni u daljem tekstu. Gen **M6P/IGF2R** se nalazi na hromozomskom regionu 6q26 i kodira sintezu receptora insulinu-sličnog faktora rasta 2 (IGF2R). Tokom kancerogeneze često dolazi do inaktivacije ovog gena. IGF2R je označen kao tumor-supresor s obzirom da ima sposobnost da se vezuje za mitogen IGF-II i da ga razlaže, kao i da podstiče aktivaciju inhibitora rasta TGFβ (transformišući faktor rasta beta) i reguliše ciljna mesta delovanja lizozomalnih enzima. Besmislene mutacije u ovom genu koje se sreću kod oko 6% karcinoma dojke dovode do gubitka funkcije vezivanja liganda za intaktni IGF2R<sup>20</sup>. Gen **RBI** se nalazi na regionu

hromozoma 8q11, i kodira sintezu proteina RB1CC1 koji ima transkripcionu funkciju. Istraživanja su pokazala da oko 20% karcinoma dojke ima mutacije u ovom genu koje uključuju i 9 velikih intersticijalnih delecija. Kod karcinoma dojke kod kojih postoji mutacija u ovom genu uvek su inaktivisana oba alela *RBI*<sup>20</sup>. Gen *CDHI* lociran je na hromozomu 16q22 i kodira sintezu intracelularnog adhezivnog molekula E-kadherina. Inaktivacione mutacije koje pogađaju ovaj gen sreću se kod 60% infiltrativnih lobularnih karcinoma dojke. Većina mutacija u *CDHI* dešavaju se u kombinaciji sa LOH tako da dolazi do potpunog izostanka ekspresije E-kadherina i nemogućnosti njegove detekcije imunohistohemijskom metodom. Jedan od najpoznatijih tumorsupresorskih gena poznat je kao *TP53*. Približno 20% obolelih od karcinoma dojke ima mutacije u genu *TP53* lokalizovanom na hromozomu 17p13. Ovaj gen kodira sintezu nukleusnog proteina od 53 kD koji se vezuje za DNK kao tetramer i učestvuje u transkripciji i replikaciji DNK. Genski nemodifikovani "wild type" p53 indukuje zaustavljanje ćelijskog ciklusa ili aktivira proces apoptoze, u zavisnosti od uslova u mikrookruženju. Mutacijama u *TP53* inaktivira se ili oštećuje jedna od ovih funkcija. Često se dešavaju tzv. besmislene („missense”) mutacije u DNK-vezujućem domenu proteina, a ređe su to i „frame-shifting“ mutacije. Većina ovih mutacija prati LOH, tj. gubitak wild type alela. Mutacije tipa „missense” u *TP53* mogu biti detektovane imunohistohemijski u vidu akumulacije proteina p53 zato što mutirani p53 ne može da aktivira ekspresiju proteina MDM2 (engl. *mouse double minute 2 homolog*)<sup>18,21</sup>. U normalnim, fiziološki nepromenjenim uslovima u ćeliji, protein MDM2 podstiče p53 na degradaciju posredovanu ubikvitinom i na taj način formira mrežu povratne sprege koja održava nizak nivo p53 u ćeliji<sup>21</sup>.

#### **I.1.2.3.4. Genske promene kod naslednog (familijarnog) karcinoma dojke**

Danas je poznato da više od 10% karcinoma dojke ima naslednu osnovu<sup>22</sup>. Germinativne mutacije određenih gena dovode do pojave naslednog (familijarnog) karcinoma dojke, koji predstavlja autozomno dominantno oboljenje. Dvadesetak godina ranije, tačnije 1994. godine, Skolnik i saradnici uspešno su klonirali prvi gen odgovoran za naslednu predispoziciju prema razvoju karcinoma dojke—*BRCA1* (engl. *breast cancer type 1 susceptibility protein*). Inače, gen *BRCA1* mapiran je na hromozomu 17q21 četiri

godine ranije <sup>22</sup>. Analizom mutacija u ovom genu upotrebom tehnike rekombinacije došlo se do saznanja da su se mutacije desile u rano Rimsko doba i da su *de novo* mutacije retke. Wooster i saradnici su 1994. godine na hromozomu 13q12-13 mapirali drugi gen odgovoran za naslednu predispoziciju za karcinom dojke – *BRCA2*, a godinu dana kasnije isti autori su dati gen i klonirali <sup>23</sup>. Odmah nakon otkrića ova dva gena i njihovih mutacija došlo se do značajnog napretka u razumevanju naslednog karcinoma dojke i u početku se mislilo da su te mutacije odgovorne za 50-80% familijarnih karcinoma dojke. Danas se međutim zna da mutacije u *BRCA1* i *BRCA2* učestvuju sa svega 20% u ukupnom familijarnom riziku za nastanak karcinoma dojke. Geni koji su takođe povezani sa pojavom familijarnog karcinoma dojke su *TP53*, *CHK2* i *ATM* <sup>23</sup>.

Procenjeno je da su mutacije gena *BRCA1* ili *BRCA2* prisutne kod manje od 0.2% celokupne svetske populacije (prevalenca je između 1:500 do 1:1000), a da je u SAD jedna od 250 žena (0.4% svih žena u SAD) nosilac ovih mutacija <sup>23</sup>.

Osnovna razlika između nosioca mutacija u *BRCA1* i 2 genu je da čak i muški nosioci mutacija *BRCA2* imaju povećan rizik za pojavu karcinoma dojke <sup>23</sup>.

Osobe kod kojih postoji mutacija u *BRCA1/2* genima, pored karcinoma dojke i ovarijuma, imaju i povećan rizik za pojavu nekih drugih tumora, kao što su karcinom materice, prostate i debelog creva. Kod nosioca mutacija *BRCA2* postoji povećan rizik za pojavu karcinoma pankreasa, melanoma kože, žučne kese/žučnih puteva i jajovoda <sup>22,23</sup>.

## I.2. KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE

Klasifikacija malignih tumora dojke je uglavnom bazirana na histološkom izgledu a manje na histogenezi. Brojni karcinomi pokazuju mešovite histološke slike, a tumor se klasifikuje prema dominantnoj komponenti, što je nekada i izvor različitih dijagnoza. Postoje brojne klasifikacije malignih tumora dojke, a najčešće je u upotrebi klasifikacija Svetske zdravstvene organizacije (WHO) (tabela 1). Imajući u vidu odnos malignih ćelija prema bazalnoj lamini, karcinomi mogu biti neinvazivni, koji ne prelaze bazalnu laminu, ili invazivni, ukoliko prelaze bazalnu laminu <sup>24</sup>.

Najagresivniji oblik karcinoma dojke je **duktalni karcinom**, koji vrlo često prelazi u invazivni oblik i to za dvostruko kraće vreme od lobularnog karcinoma *in situ*

(20 godina). Na osnovu stepena agresivnosti duktalni karcinom dojke se deli na tipove: komedo, kribriformni, apokrini, papilarni, mikropapilarni i solidni tip. Komedo i kribriformni tip duktalnog karcinoma dojke su najagresivniji <sup>24</sup>. Najzastupljeniji tip karcinoma dojke je invazivni duktalni karcinom koji čini 75% svih karcinoma dojke. Tumor je invazivan i "uvlači" okolno vezivno i masno tkivo, a sam je jako tvrde konzistencije. Može dovesti do uvlačenja kože ili retrakcije bradavice <sup>24</sup>.

**Tubularni karcinom** čini 10-20% slučajeva svih karcinoma dojke i lako se otkriva mamografijom. To je obično mala lezija, manja od 1 cm, tvrde konzistencije, a histološki se prepoznaju područja skleroze i depozita elastina. U 65% slučajeva javlja se zajedno sa intraduktalnim tumorom dojke. Čelije tumora karakteriše atipičan histološki izgled i brojne mitoze <sup>24</sup>.

**Lobularni karcinom** čini 11% svih slučajeva raka dojke. Karakteristično je da se javlja u obe dojke čak u 46% slučajeva. Razvija se od završnih kanalića lobulusa. Postoje 2 oblika ovog karcinoma: a) *carcinoma lobulare in situ* i b) *carcinoma lobulare invasivum*. Čelije lobularnog karcinoma *in situ* su krupnije od normalnih, imaju ovalne nukleuse i sitne nukleoluse i uglavnom nema mitozu i polimorfizma. Oko 30% pacijentkinja sa *carcinoma lobulare in situ* razvijaju karcinom u obe dojke. Invazivni lobularni karcinom se javlja u 5-10% slučajeva. Makroskopski je često bez jasnih granica, gumaste konzistencije, ponekad tvrd. Histološki se primećuju zraci malignih ćelija raspršenih po vezivnoj stromi, koje su sitne, sa izraženim polimorfizmom <sup>24</sup>.

**Medularni karcinom** čini oko 1% svih karcinoma dojke. Mekan je i mesnate konzistencije. Histološki ima oskudnu stromu, a maligne ćelije rastu u vidu sincicijuma, u širokim nepravilnim poljima. Obično postoji infiltracija tumorskih ćelija u regionalne limfne čvorove <sup>24</sup>.

**Koloidni (mucinozni) karcinom** karakteriše se unutarćelijskim i vanćelijskim stvaranjem sluzi. Radi se o mekanim, sivkastoplavim čvorovima želatinozne konzistencije. Histološki postoje dve slike tumora. U prvom slučaju ćelije plutaju u većoj količini bazofilne sluzi, koja otiče u susedne tkivne prostore. U drugom slučaju tumorske ćelije rastu u dobro izraženim žljezdanim tvorevinama u čijim se lumenima nalazi sluzavi sekret <sup>24</sup>.

**Pagetova bolest** je oblik duktalnog karcinoma dojke koji se javlja kod nešto starije populacije. Počinje kao tipični intraduktalni karcinom, ali zahvata i glavne

izvodne kanale, odakle se širi, vrši infiltraciju kože, bradavice i areole. Zahvaćeni deo kože je ispucao i vlažan, stoga se često nadovezuje i bakterijska infekcija. Histološku sliku karakteriše invazija epidermisa Pagetovim ćelijama koje su krupne, hiperhromatične. Ima povoljnu prognozu i pored širenja na kožu <sup>24</sup>.

Kao posebni klinički entiteti izdvajaju se: zapaljenski karcinom, karcinom u trudnoći i za vreme laktacije, okultni karcinom sa metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima, karcinom ektopične dojke, karcinom kod muškaraca i karcinom dojke kod dece <sup>24</sup>.

### **I.2.1. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke**

U poslednjih nekoliko godina istraživači su posebnu pažnju posvetili ispitivanju značaja i primene molekularne klasifikacije karcinoma dojke u procesu odabira odgovarajuće terapije kao i razvoja novih terapijskih protokola. U većini studija sprovedenih u poslednjih 5 godina navedena je podela karcinoma dojke na četiri osnovna tipa <sup>25-27</sup>. Osnovni princip na kome se zasniva podela karcinoma dojke na odgovarajuće tipove izvršena je na osnovu imunohistohemijske ekspresije određenih bioloških markera u karcinomskim ćelijama. Ova klasifikacija je izvedena na osnovu ekspresije ER-R, PR-R, HER-2 receptora i ekspresije proliferativnih markera:

1. **LUMINALNI A TIP** (ER-R<sup>+</sup> i/ili PR-R<sup>+</sup> i HER-2<sup>-</sup>)
2. **LUMINALNI B TIP** (ER-R<sup>+</sup> i /ili PR-R<sup>+</sup> i HER-2<sup>+</sup>)
3. **TRIPL ILI TROSTRUKO NEGATIVNI KARCINOMI ILI BAZALNI TIP KARCINOMA** (ER-R<sup>-</sup>, PR-R<sup>-</sup> i HER-2<sup>-</sup>)
4. **HER-2 POZITIVNI TIP** (ER-R<sup>-</sup>, PR-R<sup>-</sup> i HER-2<sup>+</sup>)

Prvu grupu čini takozvani luminalni A tip karcinoma dojke koga karakteriše molekularni fenotip sa ER-R i/ili PR-R pozitivnom ekspresijom, a negativnom ekspresijom HER-2 receptora <sup>25-27</sup>. Drugu grupu čini luminalni B tip karcinoma dojke koji je vrlo sličan po svom molekularnom fenotipu luminalnom A tipu karcinoma dojke od koga se razlikuje samo po pozitivnoj ekspresiji HER-2 receptora. Trostruko (tripl) negativni tumori ili bazalnom tipu - slični tumori, koji su ER-R, ER-R i HER-2 receptor negativni tumori, svrstani su u treću molekularnu kategoriju karcinoma dojke <sup>26</sup>. Četvrtu grupu čine HER-2 pozitivni karcinomi dojke kod kojih postoji pozitivna ekspresija



HER-2 receptora, kao i amplifikacija gena za HER-2 kao i nekoliko drugih gena koji se nalaze na hromozomu 17 (najčešće gen *TOP2A*)<sup>26</sup>.

**Tabela 1.** WHO klasifikacija karcinoma dojke

---

**WHO klasifikacija karcinoma dojke:**

---

**A. Neinvazivni**

---

1. **Intraduktalni karcinom**
2. **Intraduktalni papilarni karcinom**
3. **Lobularni karcinom *in situ***

**B. Invazivni**

1. **Invazivni duktalni karcinom**
2. **Invazivni lobularni karcinom**
3. **Medularni karcinom**
4. **Koloidni karcinom (mucinozni karcinom)**
5. **Pagetova bolest**
6. **Tubularni karcinom**
7. **Adenoidni cistični karcinom**
8. **Invazivni komedo karcinom**
9. **Apokrini karcinom**
10. **Invazivni papilarni karcinom**

---

## **I.2.2. Luminalni tip karcinoma dojke**

Luminalni tip karcinoma dojke je dobio ime po veoma sličnoj ekspresiji bioloških markera ovih tumora i luminalnog epitela dojke. Naime i za normalno, tumorski nepromenjeno tkivo dojke, kao i za ovaj tip tumora specifična je ekspresija luminalnih citokeratina 8 i 18. Luminalni tip karcinoma dojke čini većinu ER-R pozitivnih karcinoma dojke, a karakteriše se i ekspresijom PR-R i specifičnih gena koji su uključeni u aktivaciju estrogena<sup>26,27</sup>.

Luminalni A i B tipovi karcinoma dojke se međusobno razlikuju po svom osnovnom molekularnom profilu i prognostičkim osobinama.

### **I.2.2.1. Luminalni A tip karcinoma dojke**

Luminalni A tip karcinoma dojke, čini više od 40% svih tipova karcinoma dojke, obično ima visoku ekspresiju ER-R, nisku ekspresiju HER-2 receptora, kao i nizak nivo ekspresije markera proliferacije, manje od 14% <sup>26,27</sup>.

Dodatni marker, koji se eksprimira uglavnom kod luminalnog A tipa karcinoma dojke je GATA3. Definicija luminalnog tipa karcinoma dojke ne zasniva se na pozitivnoj ekspresiji EGFR i CK5/6, mada se može zabeležiti u nekim slučajevima ovog karcinoma. Manje od 9% karcinoma ovog tipa ima histološki gradus G3. Ovaj tip tumora karakteriše najbolja prognoza ishoda bolesti u odnosu na druge tipove karcinoma dojke <sup>26</sup>. Na osnovu molekularnog profila svi tipovi čistog lobularnog karcinoma *in situ* pripadaju luminalnom A tipu karcinoma dojke <sup>26,27</sup>.

### **I.2.2.2. Luminalni B tip karcinoma dojke**

Luminalni B tip karcinoma dojke je zastupljen kod 9% do 16% svih pacijentkinja sa karcinomima dojke. Karakteriše ga agresivniji tok bolesti, lošiji ishod, kao i ER-R, PR-R pozitivnost i pozitivna ekspresija EGFR-1, HER-2 i ciklin E1. Indeks proliferacije je kod ovog tipa karcinoma dojke povećan u odnosu na luminalni A tip karcinoma dojke i iznosi uglavnom više od 14% <sup>26,27</sup>.

### **I.2.3. Tripl ili trostruko negativni tip karcinoma dojke**

Zavisno od sistema skorovanja pozitivne ekspresije za ER-R i PR-R kao i metode za određivanje stepena ekspresije HER-2 proteina ovaj tip karcinoma dojke čini između 10% i 17% svih karcinoma dojke <sup>26,28,29</sup>. Ovaj tip tumora dojke je najzastupljeniji kod pacijentkinja mlađeg životnog doba, nešto je učestaliji kod žena u Africi i Americi, ima agresivniji tok u odnosu na druge tipove karcinoma dojke <sup>28,29</sup>. Najbolja ilustracija stepena agresivnosti ovog karcinoma jeste činjenica da se recidiv javlja između prve i treće godine nakon otkrivanja tumora, a da se najveći stepen smrtnosti beleži u roku od pet godina nakon prve terapije <sup>29</sup>. Follow-up studije kod ovih pacijentkinja su ograničene samo na desetogodišnji period. Interesantno je takođe da je period praćenja kod pacijentkinja sa trostruko-negativnim karcinomima dojke značajno kraći nakon pojave prve metastaze u odnosu na druge tipove karcinoma dojke. S patološke tačke gledišta razlika u agresivnosti između trostruko negativnih i ostalih

tipova karcinoma dojke ne iznenađuje s obzirom da ove tumore uglavnom karakteriše visok histološki gradus III (slaba diferentovanost tumora)<sup>29</sup>.

Veoma često se u literaturi može naići na molekularnu klasifikaciju u kojoj postoji i bazalnom tipu-slični karcinomi dojke<sup>29</sup>. Ovaj tip karcinoma dojke zbog osnovne sličnosti sa trostruko negativnim tipom karcinoma dojke svrstava se u isti tip. Bazalnom tipu slični karcinomi dojke su dobili ime po tome što neoplastične ćelije ovih tumora eksprimiraju gene koji su svojstveni i normalnim bazalnim /mioepitelnim ćelijama dojke (uključujući CK-HMW, CK, CK5/6, CK14 i CK17, vimentin, p-kadherin, abkristalin, fascin i kaveolin 1 i 2)<sup>26,29</sup>.

#### **I.2.4. HER-2 pozitivni tip karcinoma dojke**

Ovaj tip karcinoma dojke se javlja sa učestalošću između 8% i 16%<sup>26</sup>. Na osnovu ekspresije ER-R u okviru ovog tipa karcinoma dojke klasifikuju se dve podgrupe: ER-R negativni koji su slični bazalnom tipu karcinoma dojke (ER-R<sup>-</sup> i HER-2<sup>+</sup> pozitivni karcinomi), i ER-R pozitivni, koji su slični luminalnom B tipu karcinoma dojke (mogu da eksprimiraju i PR-R)<sup>26</sup>. U nekim slučajevima pored HER-2 receptora eksprimira se i EGFR. U većini slučajeva tumor supresorni protein p53 se ne eksprimira u ovom tipu karcinoma dojke, dok je ekspresija CK8/18 izrazito heterogena. Ukoliko je prisutna, pozitivna ekspresija EGFR, fokalnog je karaktera i zastupljena je u manje od 5% tumorskih ćelija. Ovaj tip karcinoma dojke je uglavnom prisutan kod duktalnog *in situ* karcinoma i karakteriše se lošom prognozom ishoda bolesti<sup>30</sup>.

### **I.3. BIOLOGIJA KARCINOMA DOJKE**

Biologija procesa nastanka karcinoma dojke obuhvata proučavanje kompleksa faktora koji doprinose pojavi, razvoju i progresiji karcinoma. Kancerogeneza tkiva dojke predstavlja višestepeni proces povezan sa akumulacijom genskih aberacija, najverovatnije sa po 5-6 specifičnih mutacija po somatskoj ćeliji. Oko 5-10% karcinoma dojke je uzrokovano naslednim germinativnim mutacijama u genima koji učestvuju u pojavi i razvoju karcinoma<sup>31</sup>.

Geni uključeni u proces pojave i razvoja karcinoma dojke obuhvataju: *BRCA1*, *BRCA2*, *ER-R*, *PR-R*, *EGFR*, *p53*, *HER-2*, *TOP2A* i druge. U osnovi procesa maligne transformacije leži poremećaj ravnoteže između ćelijske proliferacije i apoptoze. Čelije sa genetičkim abnormalnostima preživljavaju zahvaljujući defektima u apoptotskim putevima<sup>31,32</sup>.

Razumevanje genetskih mehanizama odgovornih za nastanak i rast malignih ćelija dovelo je do potpuno novog pristupa u dijagnostici i terapiji karcinoma dojke. Porast znanja iz biologije karcinoma dojke ima sve značajniji udeo u utvrđivanju stope rizika, predviđanja prognoze i odgovora na terapiju<sup>33</sup>. Savremena istraživanja usmerena su ka pronalasku novih efikasnih lekova koji ciljano deluju na ćelije tumora. Na taj način zdrave ćelije organizma ostaju pošteđene a samim tim su i neželjena dejstva terapije smanjena<sup>33,34</sup>.

Marker ima prediktivnu vrednost samo ukoliko njegovo prisustvo ili odsustvo određuje rezistenciju ili osetljivost pacijenta sa karcinomom dojke na određenu terapiju. Značajan prognostički i prediktivni značaj ima posebno gen *HER-2* i prekomerna ekspresija njegovog proteina<sup>35</sup>. Istraživanja su pokazala da je prekomerna ekspresija proteina *HER-2* kod pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke u korelaciji sa visokim histološkim gradusom, niskim sadržajem steroidnih receptora u tumoru, povećanim proliferativnim potencijalom i pojavom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, što ukazuje da je povećan sadržaj *HER-2* u karcinomu dojke faktor loše prognoze. Amplifikacija *TOP2A* gena dovodi do prekomerne ekspresije ovog enzima u tumorskim ćelijama karcinoma dojke i uslovljava bolji odgovor navedenih pacijentkinja na delovanje terapije antraciklinima<sup>36</sup>.

Za procenu odgovora na hormonsku terapiju, najčešće se prati ekspresija *ER-R* i *PR-R*. Prekomerna ekspresija *ER-R* danas se najviše koristi za selekciju pacijentkinja sa ranom dijagnozom bolesti i dobrim odgovorom na antiestrogen tamoksifen. Određivanje stepena ekspresije *PR-R* takođe može pomoći u proceni uspešnosti primene odgovarajuće hormonske terapije<sup>31</sup>.

Najnovije studije su usmerene posebno na ispitivanje promena na genetičkom nivou u tumorskim ćelijama karcinoma dojke, a koje bi sa druge strane imale značaja kao mesta ciljanog delovanja određenih, novih vidova terapije. Tokom poslednjih par

godina aktuelizovana je posebno amplifikacija *HER-2* i *TOP2A* gena koji imaju poseban značaj u predviđanju odgovora na terapiju herceptinom i antraciklinima <sup>35,36</sup>.

### **I.3.1. TNM klasifikacija karcinoma dojke i histološki gradus tumora (G)**

Osnovne histološke i makroskopske karakteristike tumora koje su neophodno za postavljanje pravilne dijagnoze kao i za odabir buduće terapije su: veličina tumora (T), stepen zahvaćenosti regionalnih limfnih nodusa (N), prisustvo metastaze (M) i histološki gradus tumora (G) <sup>37</sup>.

Osnovu za klasifikaciju malignih tumora, prema njihovoj rasprostranjenosti dao je Francuz Pierre Denoix u periodu između 1943. i 1953. godine <sup>37</sup>. On je tumore (T) svrstao prema tome da li su tumorske ćelije zahvatile i regionalne limfne čvorove-noduse (N), ili je postojeći primarni tumor već stvorio i udaljene metastaze (M). Danas je prihvaćena TNM klasifikacija UICC (engl. *International Union against Cancer*), koja je 1987. godine doživela promene u smislu približavanja UICC i AJC (engl. *American Joint Commission on Cancer Staging and End Results Reporting*) <sup>38</sup>. Ova klasifikacija je rezultat kliničkog, radiološkog i laboratorijskog ispitivanja (tabela 2).

Histološki gradus tumora definiše stepen njegove diferentovanosti. Određivanje gradusa je važno jer je gradus jedna od komponenti koja se uzima u obzir kod određivanja agresivnosti tumora odnosno prognoze za svakog bolesnika s malignim tumorom. Može se uopšteno reći da tumori nižeg gradusa imaju bolju prognozu. Određivanje gradusa osim prognostičke važnosti u nekim tipovima malignih tumora kao što su sarkomi mekih tkiva, tumori mozga, karcinomi dojke i prostate ima i terapijsku važnost jer vrsta i odabir terapije zavisi od samog gradusa tumora <sup>39</sup>.

Prema opšteprihvaćenoj preporuci Američke komisije za kancer tumori se klasifikuju u 4 grupe na osnovu stepena svoje diferentovanosti: dobro diferentovani tumori (gradus 1-G1), umereno diferentovani tumori (gradus 2-G2), slabo diferentovani tumori (gradus 3-G3) i nediferentovani tumori (gradus 4-G4). Ćelije tumora gradusa 1 izrazito podsećaju na ćelije normalnog tkiva iz kojega nastaju i imaju tendenciju da se sporo umnožavaju i rastu te se smatra da će se takvi maligni tumori ponašati najmanje agresivno.

Ćelije tumora gradusa 2 još uvek podsećaju na ćelije normalnog tkiva iz kojega nastaju, ali imaju tendenciju bržeg umnožavanja i rasta u poređenju sa ćelijama tumora gradusa 1. Ćelije tumora gradusa 3 i 4 jako se razlikuju ili uopšte ne podsećaju na ćelije normalnih tkiva iz kojih nastaju, brzo se umnožavaju i rastu te se takvi tumori ponašaju izrazito agresivno <sup>39</sup>.

Način određivanja gradusa razlikuje se za svaki tip malignog tumora. Kod karcinoma dojke koristi se tzv. Bloom-Richardsonov sistem određivanja gradusa koji uz stupanj diferentovanosti ćelija uključuje i način rasta tumora kao i broj mitozu <sup>39,40</sup>.

<b>Tabela 2. TNM klasifikacija karcinoma dojke</b>
<b>T<sub>x</sub></b> -Primarni tumor se ne može dokazati
<b>T<sub>0</sub></b> - Nepalpabilan tumor
<b>T<sub>is</sub></b> - Prein vazivni rak (carcinoma <i>in situ</i> ), neinfiltrirajući intraduktalni rak ili Pagetova bolest bradavice bez znakova tumora
<b>T<sub>1</sub></b> - Tumor s najvećim promerom do 2 cm
<b>T<sub>1a</sub></b> -Tumor s najvećim promerom do 0.5 cm
<b>T<sub>1b</sub></b> -Tumor s najvećim promerom između 0.5 i 1 cm
<b>T<sub>1c</sub></b> - Tumor s najvećim promerom između 1 i 2 cm
<b>T<sub>2</sub></b> - Tumor s najvećim promerom između 2 i 5 cm
<b>T<sub>3</sub></b> - Tumor s najvećim promerom većim od 5 cm
<b>T<sub>4</sub></b> -Tumor bilo koje veličine s direktnim širenjem na zid grudnog koša ili kožu (Zid grudnog koša obuhvaća: rebra, interkostalnu muskulaturu i <i>musculus serratus anterior</i> , ali ne i pektoralni mišić)
<b>T<sub>4a</sub></b> -Zahvaćen zid grudnog koša
<b>T<sub>4b</sub></b> -Edem, prožimanja ili ulceracija kože dojke ili okolni kožni čvorići, u području iste dojke
<b>T<sub>4c</sub></b> –Obuhvata T <sub>4a</sub> i T <sub>4b</sub>
<b>T<sub>4d</sub></b> -Upalni karcinom
<b>PN<sub>x</sub></b> -Regionalni limfni čvorovi se ne mogu odrediti
<b>pN<sub>0</sub></b> - Regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni
<b>pN<sub>1</sub></b> -Istostrani pazušni limfni čvorovi su zahvaćeni
<b>pN<sub>2</sub></b> -Istostrani pazušni limfni čvorovi srasli međusobno ili na susedne strukture
<b>pN<sub>3</sub></b> -Zahvaćeni su istostrani unutrašnji limfni čvorovi unutar dojke
<b>M<sub>x</sub></b> -Metastaze se ne mogu odrediti
<b>M<sub>0</sub></b> -Nema dokaza o prisustvu udaljenih metastaza
<b>M<sub>1</sub></b> -Udaljene metastaze (uključujući metastaze u istostrane supraklavikularne limfne čvorove)
<b>pN<sub>1a</sub></b> - mikrometastaze, manje od 0.2 cm
<b>pN<sub>1b</sub></b> - metastaze u jednom ili više limfnih čvorova veće od 0.2 cm
<b>pN<sub>1bI</sub></b> -metastaze u jednom do tri limfna čvora, veličine 0.2 do 2 cm
<b>pN<sub>1bII</sub></b> -metastaze u 4 ili više limfnih čvorova, veličine 0.2 do 2 cm
<b>pN<sub>1bIII</sub></b> -tumor prelazi kapulu limfnog čvora i manji je od 2 cm
<b>pN<sub>1bIV</sub></b> -metastaze u limfnom čvoru veličine 2 cm ili veće

### **I.3.2. BIOLOŠKI MARKERI KARCINOMA DOJKE I NJIHOV OPŠTI ZNAČAJ**

Prilikom tumorske transformacije ćelija dolazi do disbalansa između procesa apoptoze i proliferacije. Kao posledica narušavanja ćelijske homeostaze dolazi do poremećaja u ekspresiji određenih markera čija je pojava specifična za tumorsku transformaciju ćelija prilikom pojave i razvoja karcinoma dojke. Biološki markeri čija se promena javlja i prati u tumorskim ćelijama karcinoma dojke su ER-R i PR-R, HER-2 receptor, p53 tumor supresorni protein, Bcl-2 antiapoptotski protein, Ki67 protein, BRCA1, kao i TOP2A enzim. Biološki markeri se prate zbog svog poznatog prognostičkog i prediktivnog značaja za pacijentkinje sa navedenim tipovima karcinoma.

#### **I.3.2.1. FAMILIJA RECEPTORA EPIDERMALNIH FAKTORA RASTA – HER/c-erbB**

Evolucija HER signalne mreže odvijala se paralelno sa evolucijom i usložnjavanjem samih životnih formi. HER-u slične forme receptora pronađene su i kod beskičmenjaka. Crv, *Caenorhabditis elegans* ima jednu formu HER-sličnih receptora i vezuje samo jedan ligand za ovaj receptor. Voćna mušica *Drosophila melanogaster* takođe ima HER-sličnu familiju receptora koja vezuje četiri različite forme liganada. Sisari, sa druge strane imaju familiju od četiri receptora koji vezuju veliki broj različitih liganada <sup>35</sup>.

Familija receptora epidermalnih faktora rasta je uključena u normalni razvoj i u kancerogenezu dojke. To su proteini koji se nalaze na površini ćelija i u normalnim uslovima kontrolišu rast i deobu ćelije. Locirani su na ćelijskoj membrani i zaslužni su za prenos proliferativnih signala epitelnih ćelija, uključujući i epitelne ćelije dojke. Povećanje ekspresije receptora epidermalnih faktora rasta dovodi do nekontrolisanog rasta i deobe ćelija što leži u osnovi tumorske transformacije <sup>35</sup>. Ova familija onkogena sastoji se od četiri člana: c-erbB-1, c-erbB-2, c-erbB-3 i c-erbB-4. Proteini ove familije imaju samo 25-30% opšte homologije ali dele vrlo sličnu spoljašnju strukturu. c-erbB-1 i c-erbB-2 imaju značajnu ulogu u neoplastičnoj transformaciji dojke <sup>35</sup>.

Gen koji kodira sintezu EGFR/c-erbB-1/HER-1, mapiran je na hromozomu 7p13q-22, sadrži 26 egzona, kodira transmembranski glikoprotein od 170 kDa<sup>35</sup>. Protein se sastoji od ekstracelularnog domena bogatog cisteinom koji služi za vezivanje liganda, jednog kratkog transmembranskog domena i citoplazmatskog domena sa tirozin kinaznom aktivnošću<sup>35</sup>. Vezivanjem liganda EGF za EGFR receptor dolazi do dimerizacije molekula samog receptora ili njegove dimerizacije sa drugim članovima ove familije, dovodeći do autofosforilacije domena sa tirozin- kinaznom aktivnošću, što rezultira u aktivaciji receptora. Nakon vezivanja liganda i aktivacije receptora dolazi do indukcije ćelijske deobe, obično u kooperaciji sa drugim signalnim regulatorima ćelijskog rasta<sup>35</sup>. Za razliku od normalnog, tumorski nepromenjenog tkiva dojke, EGFR nije eksprimiran u svim karcinomima dojke. Incidenca njegove pozitivnosti kod karcinoma dojke je 30-40%. U tumorskim ćelijama karcinoma dojke EGFR ima antiapoptotsku funkciju. Zajedno sa grupom bioloških markera koji ukazuju na agresivniji tok i lošiji ishod bolesti, ekspresija EGFR je povezana sa visokim histološkim gradusom tumora, slabom ekspresijom ER-R, slabim odgovorom na hormonsku terapiju i smanjenom stopom preživljavanja<sup>35</sup>.

Uloga c-erbB-3 i c-erbB-4 u normalnim ćelijama dojke je nepoznata. Eksprimirani su u nekim karcinomima dojke ali njihov prognostički značaj je limitiran<sup>35</sup>.

### **I.3.2.2. HER-2 RECEPTOR (receptor za humani epidermalni faktor rasta 2)**

Gen koji kodira sintezu c-erbB-2/HER-2 je mapiran na hromozomu 17q21 i kodira transmembranski glikoprotein od 185 kDa<sup>17,35</sup>. Receptori HER-1 i HER-2 dele 40% strukturne sličnosti kada je u pitanju njihov ekstracelularni domen. Obe forme receptora poseduju dva regiona bogata cisteinom koji mogu biti zaslužni za stabilizaciju njihove trodimenzionalne strukture i mogućnosti da vežu ligande<sup>35</sup>.

Sve članove HER receptorske familije karakteriše slična molekularna struktura koja se odnosi na cisteinom-bogat ekstracelularni, ligand-vezujući domen, lipofilni transmembranski domen i intracelularni tirozin-kinazni domen sa regulatornim karboksi-terminalnim segmentom. Ligand se vezuje za ekstracelularni domen receptora i dovodi do formiranja homo- ili heterodimera što je neophodno za aktiviranje unutarćelijske



tirozin-kinazne aktivnosti. Sve ovo dovodi do konformacione promene proteina i aktivacije čitave kaskade signalnih puteva. Veliki broj liganada se vezuje za HER-2 receptor, međutim ni jedan od njih ne pokazuje izuzetno visoku specifičnost vezivanja samo za ovaj receptor. Među njima najpoznatiji su EGF, heparin vezujući EGF-sličan faktor rasta, TGF-alfa, amfiregulin,  $\beta$ -celulin, epiregulin i velika familija različitih formi neuregulina<sup>35</sup>. Bez obzira na nisku specifičnost i afinitet za vezivanje različitih liganada za HER-2 receptor dokazano je da EGF-slični ligandi imaju bivalentnu prirodu i da se vezuju na dva mesta za HER-2 receptor. Jedno od tih mesta je sa manjim afinitetom vezivanja, dok je drugo mesto specifičnije sa većim afinitetom vezivanja<sup>17,35</sup>.

Visoka signalna potentnost heterodimera u koje spada i HER-2 receptor zasniva se na nekoliko ključnih osobina ovog receptora. Jedan od njih jeste visok kapacitet HER-2 receptora da redukuje stopu disocijacije sa visoko afinitetnim ligandima, sposobnost da indukuje aktivaciju drugih članova HER receptorske familije aktivirajući signalne puteve u koje su oni uključeni, kao i sposobnost aktivacije MAP i Jun N-terminalnog signalnog puta koji su uključeni u proces aktivacije mitoze u ćeliji<sup>35</sup>. Takođe je primećeno da dimeri koji sadrže HER-2 receptor u svom sastavu ne podležu razgradnji u ćeliji od strane lizozoma nego se odvajaju i vraćaju na površinu ćelije što rezultuje u prekomernoj ekspresiji ovog receptora na ćelijskoj membrani. Onkogeni potencijal HER-2 receptora može biti aktiviran putem nekoliko genetskih mehanizama koji uključuju tačkaste mutacije i amplifikacije nemutiranih protoonkogeni. Od navedenih promena, najznačajnije i najučestalije su genetske amplifikacije koje su prisutne kod karcinoma dojke i koje dovode do prekomerne ekspresije proteina HER-2. Usled amplifikacije *HER-2* gena dolazi do povećanog intenziteta formiranja dimera sa drugim članovima HER receptorske familije kao i njihove aktivacije na površini karcinomskih ćelija<sup>35</sup>.

Primenom metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) utvrđeno je da je amplifikacija *HER-2* gena prisutna kod 20% do 35% invazivnih karcinoma dojke<sup>36</sup>. Amplifikacija navedenog gena se takođe često sreće i u slučaju karcinoma ovarijuma i želuca, kao i u metastatskim promenama karcinoma raznih drugih organa. *HER-2* amplifikovani karcinomi dojke su okarakterisani kao visoko maligni, imaju visok histološki gradus što je povezano sa lošom i slabom diferencijacijom tumora, imaju

visok proliferativni indeks i visok stepen DNK aneuploidije, kao i odsustvo pozitivne ekspresije hormonskih receptora<sup>35,36</sup>.

Amplifikacija gena i prekomerna ekspresija proteina HER-2 povezana je sa lošim ishodom bolesti i kraćim preživljavanjem dok su nalazi koji se odnose na prognostički značaj ovog markera i dalje kontraverzni ukoliko se uzme u obzir stepen njegove nezavisnosti prilikom predviđanja delovanja terapije kod pacijentkinja sa karcinomom dojke<sup>41</sup>.

### **I.3.2.3. HER-2 i transtuzumab/Herceptin**

Visoka prevalenca prekomerne ekspresije HER-2 receptora u karcinomima dojke dovela je do povećanja njegovog kliničkog značaja i do sinteze monoklonskog anti-humanog antitela transtuzumaba ili Herceptina koji se danas koristi u terapijske svrhe<sup>42</sup>.

Herceptin je rekombinovano humano monoklonsko antitelo koje se vezuje za ekstracelularni domen HER-2 receptora. Prvobitno je Herceptin korišćen u terapijske svrhe kod pacijenata sa amplifikacijom *HER-2* gena i metastaskim stadijumom karcinoma dojke. Međutim, novije studije su pokazale da ovaj vid terapije ima veliki pozitivan efekat i odmah nakon postavljanja dijagnoze i hirurške intervencije<sup>42</sup>.

Herceptin obavlja svoju funkciju tako što se vezuje za ekstracelularni domen HER-2 receptora na ciljnim tumorskim ćelijama što dovodi do redukovanja ekspresije HER-2 receptora. Dodatnim smanjenjem same ekspresije HER-2 receptora na površini ćelije, Herceptin indukuje aktivaciju inhibitora ciklin-zavisne kinaze p<sup>27kip1</sup> i proteina p<sup>130</sup> koji je povezan sa retinoblastomom što dovodi do smanjenja broja tumorskih ćelija koje se nalaze u S fazi ćelijskog ciklusa<sup>42</sup>.

Herceptin ima veliki klinički značaj u pogledu terapije kod karcinoma dojke sa blagim negativnim efektima koji se uglavnom odnose na kardiovaskularnu disfunkciju. U SAD transtuzumab je odobren kao zvanični terapijski protokol kod pacijentkinja sa karcinomom dojke od strane WHO 1998. godine<sup>42</sup>. Kod žena sa metastatskim karcinomima dojke kod kojih postoji prekomerna ekspresija HER-2 receptora Herceptin se primenjuje kao jedini vid terapije. Efikasnost ovog terapijskog agensa se beleži kod 12-27 % pacijentkinja sa metastatskim oblicima karcinoma dojke<sup>42</sup>.

Herceptin ima sinergistički antitumorski efekat kada se upotrebi u kombinaciji sa konvencionalnim citotoksičnim lekovima. Postoje i klinički podaci koji ukazuju na poboljšani efekat primene Herceptina u terapijske svrhe u kombinaciji sa drugim hemoterapijskim agensima u odnosu na samostalnu primenu ovog antitela. Preživljavanje se kod navedene grupe pacijentkinja produžava za 30-50% u poređenju sa pacijentkinjama kod kojih se primenjuje standardna, konvencionalna hemoterapija<sup>42</sup>. Izuzetno visoku toksičnost izaziva terapija Herceptinom u kombinaciji sa ciklofosfamidom i antraciklinima koji deluju kao inhibitori *TOP2A*<sup>42</sup>.

Godine 2007. FDA (engl. *U.S. Food and Drug Administration*) je odobrila upotrebu lapatiniba kod pacijentkinja sa HER-2 pozitivnim metastatskim karcinomima dojke u kombinaciji sa capecitabinskom terapijom. Lapatinib je oralni tirozin-kinazni inhibitor koji deluje istovremeno i na HER-1 i na HER-2. Deluje na intracelularnom nivou vezujući se za tirozin-kinazni domen što blokira vezivanje ATP-a i inhibira aktivnost HER-2 signalnog puta<sup>42</sup>.

#### **I.3.2.3. HER-2 receptor i CMF terapija**

Jedna od najpoznatijih kombinacija u hemoterapiji karcinoma dojke sastoji se od ciklofosfamida, metotreksata i 5-fluorouracila (CMF terapija). Brojne studije su pokazale da karcinomi sa *HER-2* amplifikacijom pokazuju rezistentnost na ovu hemoterapijsku kombinaciju<sup>42</sup>. Međutim, postoje i studije sa oprečnim rezultatima. Počevši od 2007. godine, kod svih pacijentkinja kod kojih postoji amplifikacija gena *HER-2* primenjuje se i CMF terapija<sup>42</sup>.

#### **I.3.2.4. HER-2 receptor i taksani**

Taksani deluju na formacije mikrotubula za vreme deobe ćelija i rezultiraju procesom apoptoze<sup>42</sup>. Široka upotreba ovog vida terapije kod karcinoma dojke pokazuje u poslednje vreme probleme sa pojavom brze rezistentnosti na ovaj vid terapije. Pacijenti kod kojih postoji pozitivna ekspresija ER-R i HER-2 proteina imaju pozitivan efekat nakon primene paklitaksela, posebnog oblika taksana, dok oni sa

negativnim HER-2 statusom imaju manji i slabiji učinak nakon primene ovog vida terapije <sup>42</sup>.

### **I.3.2.5. HER-2 i antraciklini**

Na osnovu najnovijih podataka pacijenti koji imaju amplifikaciju *HER-2* gena u svojim tumorima pokazuju najbolji odgovor na delovanje terapije antraciklinima, tako da se ovaj vid terapije primenjuje kao primarni i standardni kod navedene grupe pacijenatkinja <sup>42</sup>. Međutim, jako je malo poznatih činjenica o mehanizmu delovanja antraciklina na HER-2.

Noviji podaci pokazuju da je pozitivan efekat antraciklina kod pacijenata sa *HER-2* amplifikacijom posledica istovremene amplifikacije *TOP2A* gena koja je uglavnom prisutna kao najčešći vid genske modifikacije zajedno sa genskim modifikacijama *HER-2* <sup>42</sup>.

### **I.3.3. BIOLOGIJA TOPOIZOMERAZE 2A (TOP2A)**

Topoizomeraza tipa 2 predstavlja enzim koji je neophodan u procesu razdvajanja novosintetisanih lanaca DNK na kraju procesa replikacije. Ovu funkciju kod eukariota obavlja TOP2A, a kod prokariota topoizomeraza 4 <sup>43</sup>. Topoizomeraza 1 prekida samo jedan lanac DNK, dok topoizomeraza 2 prekida oba lanca DNK, koji se ponovo spajaju posle specifičnog uvijanja DNK u formu heliksa shodno potrebama ćelijskog ciklusa i transkripcione aktivnosti <sup>44</sup>. Oštećenje DNK posredovano topoizomeraza 2 praćeno je zaustavljanjem ćelija u G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> fazi ćelijskog ciklusa i apoptozom. U humanom genomu gen koji kodira sintezu *TOP2A* (shema 1) je lociran na hromozomu 17 na poziciji 21q-22. Gen se sastoji od 30 kb u okviru kojih se nalazi 35 egzona koji kodiraju sintezu proteinske forme od 170 kD. TOP2A se eksprimira u proliferišućim ćelijama, kao i u ćelijama malignih tumora uključujući karcinom kolona, želuca, dojke, limfomima, itd. <sup>44,45</sup>.

Postoje dva tipa TOP2, tip 2A i 2B. Obe forme TOP2 imaju slične strukturne domene i sličan način delovanja, ali poseduju i neke ključne razlike <sup>43</sup>. Topoizomeraza tipa 2A (TOP2A) pravi duple prekide lanaca obuhvatajući 4 bazna para, dok

topoizomeraza 2B (TOP2B) pravi iste takve prekide obuhvatajući region od samo dva bazna para. Dve navedene forme topoizomeraza dele 72% strukturne sličnosti. Studije na *in vitro* modelima su pokazale da senzitivnost na TOP2A inhibitore zavisi od njihovog stepena ekspresije u tumorskim ćelijama. Što je veći nivo ekspresije to je intenzivniji odgovor na delovanje inhibitora<sup>43</sup>.

Tvrđnja da se ekspresija TOP2A odvija samo u proliferišućim ćelijama dokazana je i činjenicom da je indeks proliferacije u pozitivnoj korelaciji sa stepenom ekspresije TOP2A enzima<sup>43,45</sup>. Takođe je dokazano da su negativan receptorski status, prekomerna ekspresija HER-2 receptora, DNK aneuploidija i prisustvo mutacije p53 gena udruženi sa prekomernom ekspresijom TOP2A enzima. Najnovije studije su pokazale da je kod 90% slučajeva sa detektovanom amplifikacijom *HER-2* gena istovremeno prisutna i amplifikacija gena koji kodira sintezu TOP2A enzima. Međutim, veze između amplifikacije *HER-2* gena i *TOP2A* genskih aberacija su komplikovanije u odnosu na početnu pretpostavku da su u svim slučajevima prisutne koamplifikacije dva navedena gena. Nasuprot početnoj hipotezi, ustanovljeno je da je polovina slučajeva amplifikacije *HER-2* udružena sa amplifikacijom *TOP2A* gena, dok je druga polovina udružena ili sa genskom delecijom ili sa nepromenjenim genskim statusom *TOP2A*<sup>43,45</sup>. U drugim tipovima tumora, kao što su karcinomi želuca i pluća, amplifikacija gena *TOP2A* je češća nego amplifikacija *HER-2* gena što ukazuje na činjenicu da su amplifikacije ova dva gena nezavisni i odvojeni događaji koji se odvijaju u amplikonu na poziciji 17q12-q21<sup>45</sup>.

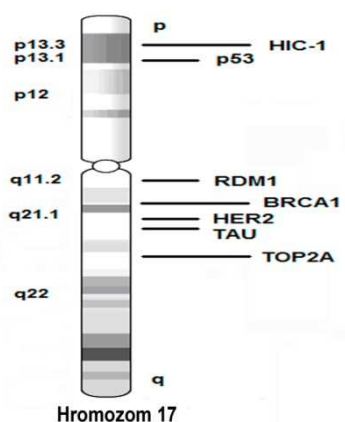
Amplifikacija *TOP2A* gena uslovljava direktnu prekomernu ekspresiju TOP2A proteina što kod pacijentkinja sa karcinomom dojke dovodi do boljeg odgovora na terapiju antraciklinima. Delecija *TOP2A* gena dovodi do brzog smanjenja ekspresije TOP2A enzima i uslovne rezistentnosti na delovanje TOP2A inhibitora. Studije su pokazale da ne postoji korelacija između *HER-2* genskog statusa i hemosenzitivnosti na delovanje antraciklina zbog toga što značajan procenat pacijentkinja i sa kompletnim odgovorom na terapiju ili sa potpunim odsustvom reakcije na antracikline imao prisutnu amplifikaciju *HER-2* gena. Međutim, pacijentkinje sa kompletnim, pozitivnim odgovorom na antraciklinsku terapiju, imale su pored amplifikacije *HER-2* gena i amplifikaciju *TOP2A* gena, dok je loš odgovor na terapiju zabeležen kod pacijentkinja sa delecijom *TOP2A* gena. Novije studije su pokazale da samo pacijentkinje sa

udruženom amplifikacijom *HER-2* i *TOP2A* gena imaju i dobar odgovor na terapiju antraciklinima<sup>43,45</sup>. Takođe, značajno je napomenuti da se interakcija između *HER-2* i *TOP2A* ne dešava samo na DNK nivou, nego i na proteinskom nivou, s obzirom da su najnovije studije pokazale da *HER-2* direktno aktivira ekspresiju *TOP2A* enzima. Ovo, sa druge strane, povećava senzitivnost karcinomskih ćelija na delovanje hemoterapijskih agenasa, tj. inhibitora *TOP2A*<sup>45</sup>.

### I.3.3.1. Intratumorska heterogenost *TOP2A* genskog lokusa u tumorskim ćelijama karcinoma dojke

Novije studije su pokazale da postoji i model takozvane intratumorske heterogenosti koji se odlikuje istovremenim postojanjem tumorskih ćelija koje imaju amplifikaciju i deleciju *TOP2A* gena u istom tumorskom amplitkonu<sup>43</sup>. Prisustvo dve različite populacije ćelija sa potpuno suprotnim genskim statusom ima veliki značaj u određivanju stepena osetljivosti tumorskih ćelija na terapiju antraciklinima. Naime, dok amplifikacija *TOP2A* gena vodi ka hipersenzitivnosti na antracikline, dotle delecija ovog gena uslovljava rezistentnost na delovanje ovog vida terapije<sup>43</sup>. Najverovatnije je da u ovakvim slučajevima dolazi do rezistentnosti ćelija koje imaju deleciju gena *TOP2A*. Ove ćelije preživljavaju delovanje terapije, rastu i proliferišu bez obzira na citotoksično dejstvo hemoterapijskih agenasa. Navedena situacija može biti jedan od razloga lošeg odgovora tumorskih ćelija na delovanje antraciklinske terapije<sup>43</sup>.

Vredno je napomenuti da je intratumorska heterogenost koja se odnosi na *TOP2A* prisutna kod oko 15% *HER-2* amplifikovanih tumora dojke<sup>43</sup>.



**Shema 1.** Šematski prikaz hromozoma 17 i raspored nekoliko molekularnih markera značajnih za karcinom dojke.

### I.3.4. STEROIDNI RECEPTORI (ER-R i PR-R) I KARCINOM DOJKE

Polni endokrini sistem žena sastoji se od 3 hijerarhijske grupe hormona: 1. hormona hipotalamusa (GnRH i LHRH); 2. hormona adenohipofize (FSH i LH) i 3. hormona ovarijuma (estrogena i progesterona). Kod žena postoje tri tipa estrogena: beta-estradiol, estron i estriol. Među progesteronima, najvažniji je progestin, a luče se i male količine 17- $\alpha$ -hidroksi-progesterona. I estrogen i progesteron su steroidi. Sintetišu se u jajniku uglavnom iz holesterola krvi, a u manjoj meri i iz acetyl-CoA <sup>46</sup>.

Estrogen i progesteron su važni regulatori rasta i diferencijacije mlečne žlezde i ženskog reproduktivnog trakta, i uključeni su u razvoj malignih tumora ovih organa <sup>46</sup>.

Steroidni hormoni imaju visok afinitet i specifičnost za intracelularne receptore koji pripadaju superfamiliji proteina uključenih u signalne puteve od značaja za aktivaciju drugih celularnih gena <sup>47</sup>. ER-R i PR-R lokalizovani su u nukleusu. Smatra se da hormon difunduje, ili da se transportuje do nukleusa gde se vezuje za steroidni receptor stvarajući kompleks steroidni hormon - receptor putem dimerizacije receptora. Neki od gena čija je aktivnost regulisana steroidnim receptorima su uključeni u kontrolu ćelijskog ciklusa i danas se veruje da je to najvažniji faktor koji određuje uticaj ER-R na biološko ponašanje karcinoma dojke i njegovu terapiju <sup>47,48</sup>.

ER-R i PR-R se eksprimiraju i u epitelnim ćelijama normalnih struktura dojke, tubuloalveolarnih žlezda i duktusa <sup>47</sup>. Oba receptora se vezuju za svoja ciljna mesta na DNK i utiču na regulaciju procesa transkripcije specifične grupe gena. Karakteriše ih šest specifičnih strukturnih domena koji su obeleženi slovima od A do F. Početni domen, A/B, je odgovoran za transkripciju, domen C je DNK-vezujući domen i ujedno je najkonzervativniji domen, domen D je uključen u održavanje nukleusne stabilnosti, dok domen E ima više različitih funkcija uključujući vezivanje za ligand, dimerizaciju, interakciju sa proteinom toplotnog stresa 90 (HSP90) i transkripcionu aktivnost. F domen predstavlja C terminalni kraj i njegova funkcija još uvek nije u potpunosti razjašnjena <sup>47,48</sup>.

Hormon-zavisni tumori, tj. tumori dojke, endometrijuma, ovarijuma, prostate, testisa, štitaste žlezde i osteosarkomi, dele jedinstven mehanizam kancerogeneze. Endogeni i egzogeni hormoni dovode do ćelijske proliferacije, što predstavlja mogućnost za akumulaciju slučajnih genetičkih grešaka <sup>46</sup>.

### **I.3.4.1. Estrogenski receptor (ER-R) i karcinom dojke**

Estrogene luče jajnici, nadbubrežna žlezda i posteljica <sup>46</sup>. Glavna funkcija estrogena je da izazivaju proliferaciju ćelija i rast tkiva polnih organa, kao i drugih tkiva koja su u vezi sa reprodukcijom <sup>49</sup>. Estrogeni obavljaju i druge funkcije, odgovorni su za normalan razvoj kostiju i kardiovaskularnog sistema, kao i za rast i diferencijaciju neurona. U vreme puberteta količina estrogena se povećava 20 i više puta. Estrogeni menjaju epitel vagine iz kockastog u pločastoslojevit, koji je znatno otporniji na povrede i infekcije. Pod dejstvom estrogena dolazi do značajne proliferacije strome endometrijuma i povećanja razvića žlezda koje treba da obezbede ishranu implantirane jajne ćelije, proliferaciju žlezdanog tkiva i povećanje broja epitelnih ćelija koje oblažu jajovode. Ovi hormoni podstiču razvoj dojki i sistema za produkciju mleka, a odgovorni su i za izgled dojke zrele žene <sup>38,49</sup>.

Estrogeni imaju dvostruku ulogu u razvoju karcinoma dojke: interaguje sa tumor-supresor genima s jedne strane, i stimuliše ćelijsku proliferaciju s druge strane. Studije su pokazale da povećana koncentracija estrogena u periodu postmenopauze povećava rizik od pojave karcinoma dojke <sup>49</sup>.

Još od otkrića 1960. godine, ER-R je postao jedan od najvažnijih prognostičkih i prediktivnih markera karcinoma dojke. Dobro je poznato da je ekspresija ER-R u obrnutoj korelaciji sa gradusom tumora <sup>49</sup>. ER-R je jedan od najčešće korišćenih bioloških markera koji služi za izbor odgovarajuće hormonske terapije. Procena ekspresije ER-R danas se najviše koristi za selekciju pacijentkinja sa ranom dijagnozom bolesti i verovatno dobrim odgovorom na hormonsku terapiju. Pacijentkinje sa pozitivnom ekspresijom ER-R u tumorskom tkivu imaju 7 puta manju verovatnoću od ponovnog javljanja bolesti nakon najmanje 5 godina od primene tamoksifena, nego one sa negativnom ekspresijom ER-R <sup>38,39,49</sup>. Nizak nivo ekspresije ER-R prisutan je u familijarnom karcinomu dojke. Osin i sar. su utvrdili da je ekspresija ER-R u BRCA1 pozitivnim tumorima izrazito niska u poređenju sa ekspresijom ER-R u BRCA2 pozitivnim tumorima, koja je ista kao kod sporadičnih karcinoma dojke <sup>50</sup>.



#### **I.3.4.2. Progesteronski receptor (PR-R) i karcinom dojke**

Progesteron luče jajnici, nadbubrežna žlezda i posteljica. Progesteron podstiče sekretorne promene u endometriju materice, razviće režnjića i alveola dojke. Ovaj hormon takođe podstiče sekretorne promene u sluzokoži jajovoda, čiji sekret je potreban za ishranu oplodene jajne ćelije koje se dele prolazeći kroz jajovod <sup>49</sup>.

Određivanje stepena ekspresije PR-R takođe može pomoći u proceni pozitivnog odgovora nakon primene odgovarajuće hormonske terapije <sup>51</sup>. Progresivniji karcinomi dojke imaju veću verovatnoću da pozitivno odgovore na hormonsku terapiju ukoliko njihov primarni tumor sadrži i ER-R i PR-R, nasuprot onim koji ekspimiraju samo ER-R ili samo PR-R <sup>49</sup>.

Jedno vrlo intrigantno pitanje koje se samo nameće jeste određivanje stadijuma progresije na kojem tumor postaje hormonski nezavisan. Podaci koji se odnose na delovanje progesterona na povećanje rizika od pojave karcinoma dojke su kontroverzni, ali novije studije pokazuju da povećana koncentracija ovog hormona utiče na povećanje rizika od pojave bolesti <sup>49</sup>.

#### **I.3.5. GEN *TP53* / PROTEIN P53 I KARCINOM DOJKE**

Posebnu grupu tumor-supresorskih proteina koju karakteriše strukturna i funkcionalna sličnost čine p53, p63 i p73. Proteini p63 i p73 koji dele sličnu strukturu i funkciju, imaju jasnu ulogu u normalnom razviću, dok p53 ima ulogu u sprečavanju razvoja tumora <sup>18</sup>. Aktivacija ekspresije proteina p53 javlja se kao odgovor na stresne signale i poremećaje u ćelijskim signalnim putevima povezanim sa pojavom tumorskih promena, dovodeći do inhibicije rasta tumorskih ćelija. Tumor supresorni protein p53 može da indukuje nekoliko tipova ćelijskih odgovora kao što su: zaustavljanje ćelijskog rasta, starenje, diferencijacija i apoptoza, pri čemu tip odgovora zavisi od mnogih faktora unutar ili van ćelije <sup>18</sup>. Ponekad, protein p53 doprinosi i popravci genetskih oštećenja u ćeliji, uvodeći popravljene ćelije u proliferaciju <sup>18</sup>. Međutim, najčešće indukcija aktivnosti p53 vodi ireverzibilnoj inhibiciji ćelijskog rasta najverovatnije aktiviranjem apoptoze. Karcinomske ćelije su izrazito osetljive na apoptotske signale i

preživljavaju samo zahvaljujući prisutnim ćelijskim lezijama, kao što je gubitak p53 koji sprečava ćelijsku smrt<sup>18</sup>.

Izostanak aktivacije i gubitak biološke funkcije p53 u karcinomima može se desiti na više načina, uključujući poremećaje koji sprečavaju aktiviranje p53, mutacije unutar gena *TP53* ili mutacije unutar posrednika u funkcionisanju p53<sup>18</sup>. Rezultati ispitivanja mnogih tumora pokazali su da je gen *TP53* mutiran u oko polovine svih karcinoma, što dovodi do gubitka njegove proapoptotske funkcije. Najveći broj mutacija koje pogađaju *TP53* gen detektovane su u centralnom regionu koji je odgovoran za specifično vezivanje sa DNK (od 100. do 300. aminokiseline), dok je samo 5% mutacija nađeno u regulatornim domenima *TP53* (amino-terminalnom domenu od 1. do 99. aminokiseline i karboksi-terminalnom od 301. do 393. aminokiseline)<sup>18</sup>.

Tačkasti tip mutacija *TP53* koje rezultuju zamenom jedne aminokiseline drugom su predominantne u tumorskim promenama. Spektar svih tipova mutacija koje su detektovane u *TP53* genu je zaista jako širok i znatno je drugačiji od onog viđenog kod drugih tumor-supresor gena, u kojima delecije i zamene delova gena rezultiraju potpunim gubitkom proteinske ekspresije. Određeni segmenti *TP53* gena, tzv. kodoni 175, 245, 248, 249, 273 i 282 pokazuju iznenađujuće visoku stopu mutacija, s obzirom da 28% svih mutacija pogađa ovih šest kodona. Kao rezultat mutacije dolazi do inaktivacije *TP53* (zamene jedne baze drugom) pri čemu većina tumorskih ćelija zadržava sposobnost da eksprimira izmenjene (mutirane) oblike proteina p53. Mutirane forme proteina p53 su znatno stabilnije i zastupljenije su u tumorskim ćelijama u većoj količini od nepromenjenog oblika proteina. Razlog zbog koga je mutirani protein stabilniji u tumorskim ćelijama jeste taj da može da se ponaša kao dominantno negativni inhibitor nepromenjenog tipa p53, funkcionišući kao tetramer. Gubitak heterozigotnosti je jedna od najčešćih posledica nagomilavanja tačkastih mutacija *TP53* u tumorskim ćelijama (efikasnom eliminacijom nepromenjenog tipa alela), što ukazuje na činjenicu da efikasnost dominantno-negativne inhibicije ne mora biti kompletna i da zasigurno zavisi od prirode početne tačkaste mutacije<sup>18</sup>.

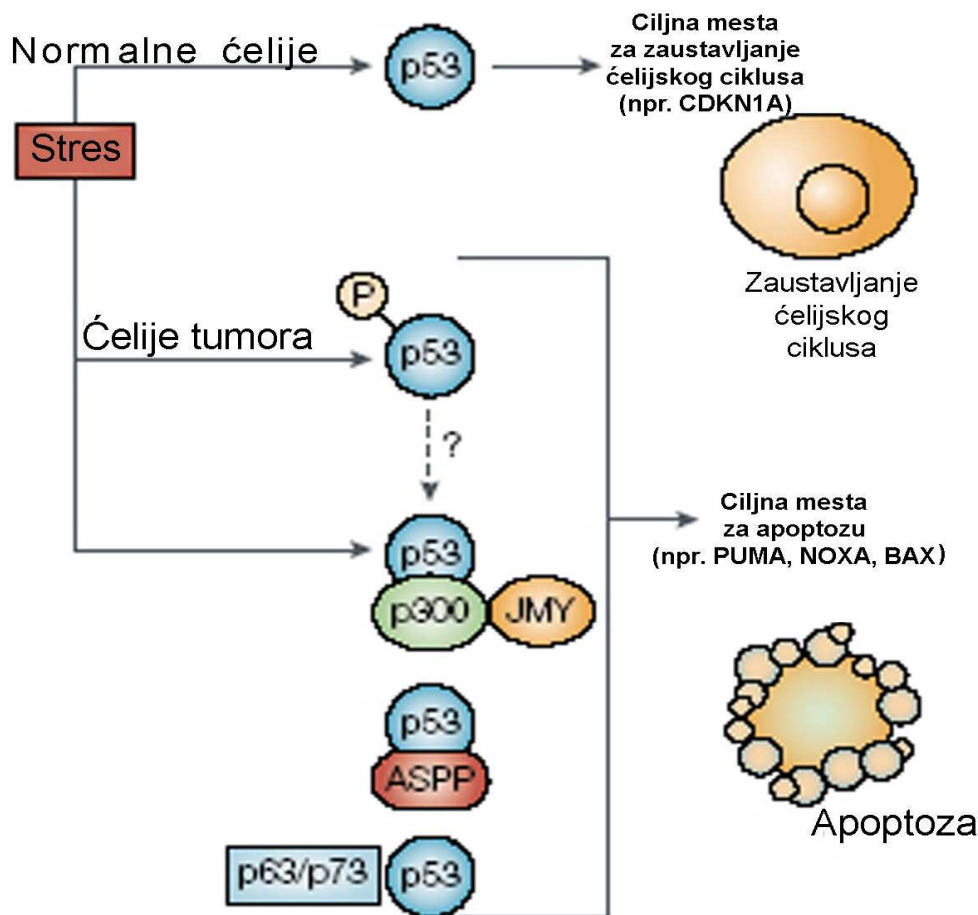
Tumorske promene koje kao odgovor na stres zadržavaju nepromenjeni tip proteina p53 nagomilavaju defekte u putevima koji vode stabilizaciji p53 ili u efektorima apoptotske aktivnosti p53. Proteini koji regulišu aktivnost p53 proteina su MDM2 (engl. *Mouse double minute 2 homolog*) i MDM4 (engl. *Mouse double minute 4*

*homolog*)<sup>22</sup>. Ovi proteini imaju presudnu ulogu u regulaciji aktivnosti p53, omogućavajući normalan rast i razviće. Glavnu ulogu u procesu degradacije mutiranih formi p53 proteina ima MDM2 koji funkcioniše kao ubikvitin-ligaza. Da bi se održala aktivacija i stabilizacija p53 neophodno je da se ostvari inaktivacija MDM2, a defekti u putu zaustavljanja aktivnosti MDM2 su česti u tumorima koji zadržavaju wild type p53<sup>22</sup>.

Biološku ulogu p53 u fiziološkim uslovima nezavisnu od transkripcije mnogo je teže definisati, razumeti i odrediti njen značaj. Zamena wild type p53 mutiranim proteinom p53 (tačkaste mutacije prisutne u domenu za aktiviranje transkripcije) efikasno sputava apoptotsku funkciju ovog proteina u ćelijama. Nezavisno od transkripcije, p53 utiče i na inhibiranje aktivnosti receptora smrti na površini ćelije i aktiviranje kaspaze-8<sup>18,22</sup>.

Bez obzira na činjenicu da p53 može aktivirati ćelijsku smrt, indukcija p53 nije neophodna za započinjanje potpunog apoptotskog odgovora. Fiziološka smrt ćelije tj. apoptoza ne zavisi samo od direktnog puta aktivacije p53 već i od njegove kooperativnosti sa drugim stimulusima ćelijske smrti u cilju prevazilaženja praga osetljivosti za apoptozu. Hipoteza po kojoj je apoptoza proces koji nastaje kao kumulativni odgovor na mnoge signale uključujući i p53 ukazuje nam na to da gubitak nekog od ovih faktora povećava verovatnoću opstanka ćelije putem redukcije apoptotskog opterećenja ispod praga osetljivosti. Inaktivacija bilo kojeg od faktora koji su uključeni u aktivaciju apoptotskog puta koji su u kooperaciji sa p53 može inhibirati apoptotski odgovor bez neposrednog učešća u putu p53<sup>18,52</sup>.

Detaljnije ispitivanje apoptotskog puta rasvetljava i ulogu proteina p53 u ovom procesu, naročito u kontekstu kancerogeneze. Povećana apoptotska osetljivost tumorskih ćelija i identifikacija kofaktora koji doprinose apoptozi indukovanoj p53 proteinom omogućuje nam da jasno sagledamo razloge ćelijske smrti u odgovoru na delovanje p53<sup>52</sup>.



**Shema 2.** Ćelijski odgovor na delovanje proteina p53

Uloga p53 u aktivaciji apoptoze i zaustavljanju ćelijskog ciklusa su aktivnosti koje su nezavisno regulisane, što pruža mogućnost da se p53 reaktivira u toku primene odgovarajuće antitumorske terapije<sup>52</sup>. Najbitniji događaj za progresiju karcinoma dojke predstavlja gubitak apoptotske funkcije p53 kao i mutacije komponenti donjeg dela apoptotskog puta indukovano p53 proteinom (shema 2)<sup>18,52</sup>.

### **I.3.6. PROTOONKOGEN *BCL-2* / PROTEIN *BCL-2* I KARCINOM DOJKE**

Antiapoptotski protein Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma-2*) je otkriven gotovo u isto vreme kada su tri laboratorije nezavisno jedna od druge klonirale hromozomsku translokaciju t (14:18) iz folikularnog centra humanih limfoma B ćelija. Ova translokacija uklanja kodirajući region *Bcl-2* sa mesta normalne regulatorne sekvence

hromozoma 18 i dozvoljava da ekspresiju kontroliše pojačivač gena ( $E\mu$ ) 5' IgH, lokalizovan na hromozomu 14<sup>53</sup>.

Prekomerna ekspresija proteina Bcl-2, čiju sintezu kodira gen *Bcl-2*, može izrazito da poveća rezistentnost na širok spektar citotoksičnih supstanci<sup>53</sup>. Nezavisni signalni putevi koji učestvuju u aktivaciji i pokretanju procesa apoptoze konvergiraju pod uticajem zajedničkih efektornih faktora koji mogu biti antagonizovani sa Bcl-2<sup>53</sup>. Najnovije studije su pokazale da Bcl-2 ima širok spektar dejstava i da obavlja niz dodatnih funkcija pored uloge u inaktivaciji procesa apoptoze<sup>54</sup>. Ranije se smatralo da protein Bcl-2 utiče na apoptozu i na ćelijsku proliferaciju aktiviranjem istog signalnog puta. Međutim, najnovija istraživanja su pokazala da prekomerna ekspresija Bcl-2 dovodi do zaustavlja ponovnog ulaska ćelija iz faze mirovanja ( $G_0$ ) u ćelijski ciklus pod dejstvom mitogenih stimulusa i ubrzava izlazak ćelija iz ćelijskog ciklusa i ulazak u  $G_0$  fazu pod dejstvom stresa. Na osnovu ovih nalaza u početku se mislilo da su ove dve aktivnosti mehanički povezane pošto obe mogu biti smanjene koekspresijom Bax (antagoniste Bcl-2), i poništene pojavom tačkastih mutacija u evolutivno konzerviranim homologim regionima *Bcl-2*<sup>54</sup>.

Protoonkogen Bcl-2 pripada familiji proteina Bcl-2. Ova familija strukturno sličnih proteina obuhvata dve grupe proteina podeljenih na osnovu svoje funkcije na proapoptotske i antiapoptotske proteine. U grupi antiapoptotskih proteina nalaze se: Bcl-2, Bcl-x<sub>l</sub>, Bcl-w, A1, E1B19kD, BHRF1 EBV, LMW5-HL virusi svinjske afričke groznice, KSbcl-2 humanog virusa herpesa, i herpes virus SAIMIRI ORF16. U grupi proapoptotskih faktora svrstani su - bax, bcl-x<sub>s</sub>, (produkt isečene alternativne varijante gena Bcl-x<sub>s</sub>), Bad, Bak, Bik/nbk, Bid i harakiri, i oni ubrzavaju ćelijsku smrt u uslovima stresa<sup>54</sup>.

Četiri segmenta su jako slična kod svih članova Bcl-2 proteinske familije i to su BH1, BH2, BH3 i BH4. Među njima, BH1, BH2 i BH4 su neophodni za funkcionisanje Bcl-2 kao i drugih članova antiapoptotske grupe<sup>55</sup>. Pojedinačni predstavnici proapoptotske grupe Bcl-2 mogu se dalje podeliti na osnovu prisustva homologih regiona. Bcl-x<sub>s</sub> sadrži BH3 i BH4 regione ali mu nedostaju BH1 i BH2, dok bax i bak sadrže BH1, BH2 i BH3 regione ali im nedostaje slabo konzerviran BH4 domen, pri čemu bad sadrži samo BH1 i BH2. Preostali članovi svrstani u drugu podgrupu, uključujući Bik, Bid i harakiri, imaju samo BH3 domen. Članovi proapoptotske grupe

Bcl-2 mogu se vezati putem interakcija koje uključuju BH1, BH2 i/ili BH3 za većinu ali ne i za sve članove antiapoptotske grupe. Takođe je potvrđeno da neki članovi antiapoptotske grupe kao i pojedini članovi proapoptotske grupe mogu stvarati homodimere i vezivati se za druge članove te iste grupe. Na osnovu ovog nalaza postavljena je hipoteza da relativan odnos koncentracija antiapoptotskih prema proapoptotskim članovima familije proteina Bcl-2 određuje kada će ćelija da preživi a kada da podleže procesu apoptoze<sup>56</sup>.

S obzirom da su ispitivanja koja su sprovedena upotrebom konfokalnog mikroskopa ukazala na to da je protein Bcl-2 lokalizovan na unutrašnjoj membrani mitohondrija, potkrepljena je hipoteza da on funkcioniše kao regulator produkcije i/ili potrošnje energije<sup>55</sup>. Međutim, analiza pomoću elektronskog mikroskopa kao i primena biohemijskih metoda ukazala je na lokalizaciju Bcl-2 sa spoljašnje strane nukleusnog ovoja, endoplazmatskog retikuluma i spoljašnje membrane mitohondrija, što omogućava izloženost citosolu najvećeg dela proteina na svim ovim mestima. Protein Bcl-2 štiti ćeliju od izlaganja slobodnim radikalima što je dovelo do postavljanja osnovne hipoteze da su radikali ključni medijatori apoptoze i da Bcl-2 deluje biohemijski u antioksidativnom putu<sup>56</sup>.

Biološke funkcije kao i svi signalni putevi u koje je uključen Bcl-2 nisu u potpunosti poznati. Dokazano je da je protein Bcl-2 odgovoran za inhibiciju apoptotskog puta koji se dešava pokretanjem CD95 (Fas/APO-1) na ćelijskoj membrani putem aktivacije kaspaze 8 (FLICE/MACH/Mch5)<sup>56</sup>. Apoptoza se može uspešno inhibirati delovanjem proteina sličnih Bcl-2, koji podsećaju na proteine aktivirane uz pomoć CD95L ili TNF (to su i proteini koje kontrolišu faktori rasta ili ih aktivira p53)<sup>56</sup>.

Posmatrano u celini, mutacije u genima koji inhibiraju aktiviranje procesa apoptoze mogu biti onkogene a translokacija u Bcl-2 u toku neoplastične transformacije najverovatnije dovodi do produžetka života oštećenih ćelijskih klonova i podsticanja akumulacije drugih onkogenih mutacija. Na osnovu navedenog može se zaključiti da članovi antiapoptotske familije Bcl-2 mogu da funkcionišu kao onkogeni a članovi proapoptotske familije kao tumor-supresor geni<sup>56</sup>.

Najveći broj kliničkih studija je pokazao pozitivnu korelaciju između prekomerne ekspresije proteina Bcl-2 i loše prognoze za izlečenje antitumorskim

lekovima kod hronične mijeloidne leukemije, sitnoćelijskog karcinoma pluća i neuroblastoma <sup>56</sup>. Ipak postoje i druge kliničke studije koje su pokazale negativnu korelaciju kod drugih neoplazija, uključujući i karcinom dojke. Najverovatnije je da u slučaju karcinoma dojke, protein Bcl-2 dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa što može da utiče na povoljan ishod terapije <sup>56</sup>.

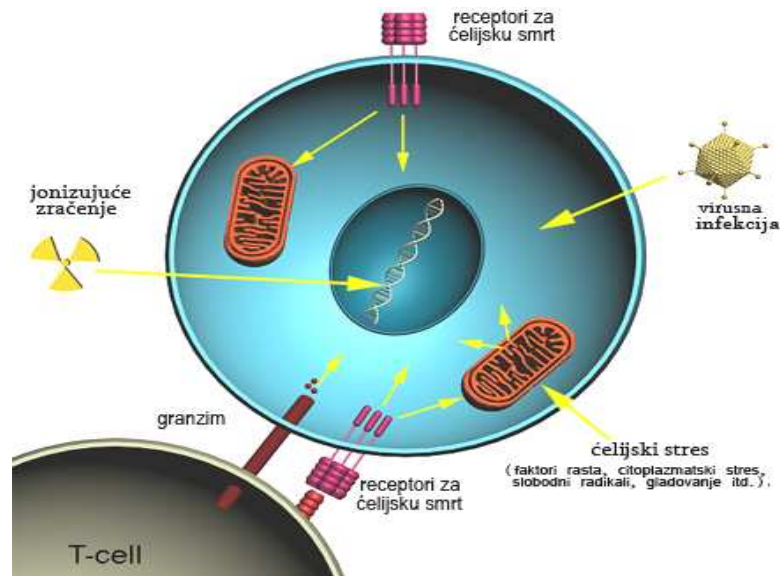
### **I.3.7. APOPTOZA I KARCINOM DOJKE**

Homeostazu tkiva i organa održava ravnoteža između apoptoze i proliferacije koje su blisko povezane. Proteini koji učestvuju u regulaciji ova dva procesa su c-myc, p53, Ras, protein kinaza A (PKA), PKC, Bcl-2, NF-κB, CDK, ciklini i CKI <sup>57</sup>.

Čitav set aktivirajućih i inhibirajućih faktora koji su u dinamičkoj ravnoteži kontroliše procese ćelijskog ciklusa i apoptoze. Programirana ćelijska smrt ili apoptoza nastaje u trenutku kada dođe do narušavanja ravnoteže između ovih faktora kao i usled promene uslova sredine u kojoj se ćelija ili grupa ćelija nalazi usled delovanja raznih patoloških faktora <sup>57</sup>.

Dokazano je da postoji više signalnih puteva koji iniciraju apoptozu uključujući: faktore rasta, poremećaj ćelijskog ciklusa, oštećenje DNK, poremećaj ekstracelularnog matriksa, oksidativni stres, azot oksid, imunološki-posredovane procese i aktivaciju receptora za ćelijsku smrt (shema 3) <sup>58,59</sup>. Ćelijska smrt koja nastupa kao posledica procesa apoptoze dovodi do smanjenja zapremine ćelije, ne izaziva oslobađanje proteina u krvotok i ne indukuje zapaljenski proces <sup>59</sup>.

Pored apoptoze, postoji i drugi tip ćelijske smrti, nekroza, koja se dešava onda kada su ćelije izložene nepovoljnim fiziološkim uslovima ili delovanju ekstremnih fizičko-hemijskih ili mehaničkih uticaja <sup>60</sup>. Ukoliko se ćelija nađe u nepovoljnim uslovima aktiviraće se proces nekroze prilikom koga ćelije bubre, oslobađaju citoplazmatske proteine u krvotok i dovode do pojave zapaljenskih procesa <sup>58</sup>.



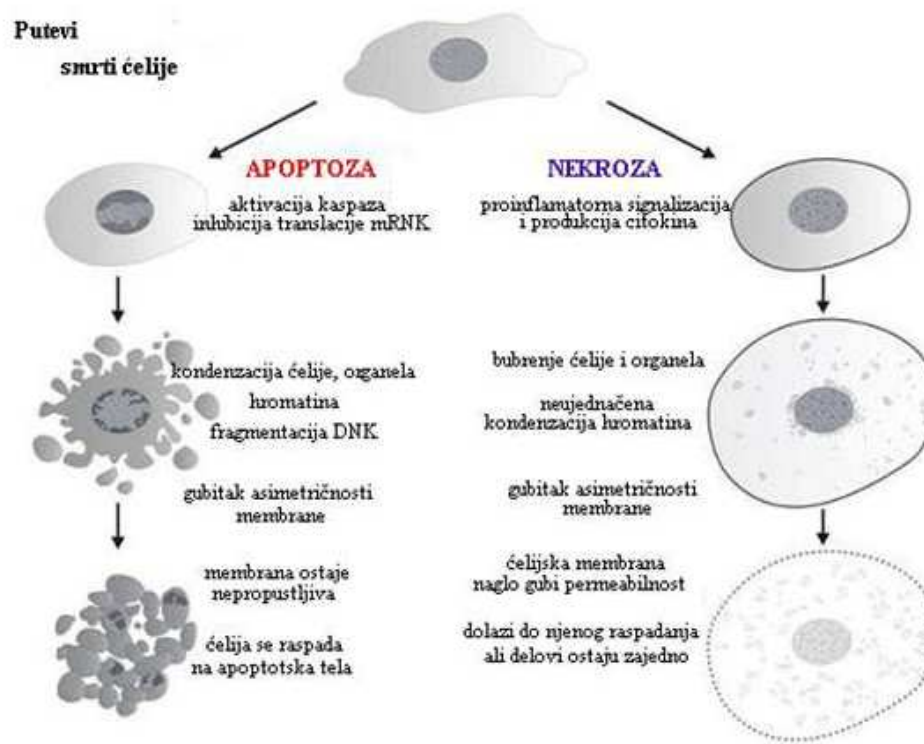
**Shema 3.** Faktori koji indukuju apoptozu

### 1.3.7.1. Strukturne odlike ćelije tokom procesa apoptoze

Svi tipovi ćelija nose u svom genomu „program preživljavanja“ i „program smrti“<sup>58</sup>. Pod dejstvom spoljašnjih ili unutrašnjih faktora u ćeliji se pokreće kaskada biohemijskih događaja kojima se oštećuju struktura i funkcija same ćelije. Tokom adultnog perioda razvoja, apoptoza je uključena u uspostavljanje ravnoteže između ćelijske smrti i ćelijske proliferacije. Tokom apoptoze u ćeliji se dešavaju promene koje se mogu videti pomoću svetlosnog i elektronskog mikroskopa (shema 4)<sup>58</sup>.

Početni događaj prilikom aktiviranja apoptoze predstavlja kondenzacija hromatina u nukleusu. Tip kondenzacija hromatina je različit i varira u zavisnosti od tipa ćelije u kojoj se odvija<sup>58</sup>. Pored promena u nukleusima i nukleolusima, tokom početnog perioda apoptoze menjaju se strukturalna i funkcionalna svojstva ćelijske membrane. Lipidni membranski dvosloj gubi asimetrična svojstva pri čemu dolazi i do premeštanja molekula fosfatidilserina, a menja se i naelektrisanje membrane. Mitohondrije se premeštaju u neposrednu blizinu nukleusa, a ovo kretanje je posredovano molekulima kinezina<sup>58</sup>.





**Shema 4.** Razlike u morfološkim karakteristikama između apoptoze i nekroze

### I.3.7.2. Apoptoza u karcinomu dojke

Prvobitno ispitivanje programirane ćelijske smrti sprovedeno je na ćelijskim linijama karcinoma dojke u *in vivo* i *in vitro* uslovima<sup>57</sup>. Manipulacijom različitim hemijskim agensima i supstancama dolazi do aktivacije apoptoze u ćelijskim linijama uključujući i smanjenje koncentracije estrogena, anti-estrogena, peptidnih faktora rasta, analoga vitamina, protein kinaze C (PKC), poliaminskih analoga i hemoterapijskih agenasa. Bolje razumevanje mehanizma samog apoptotskog procesa pruža dodatne mogućnosti za definisanje novih preventivnih terapijskih agenasa kod pacijentkinja sa karcinomom dojke<sup>57</sup>.

1991. godine, prvi put je potvrđeno da smanjenje koncentracije estrogena koji je dodavan ćelijskoj liniji MCF-7 uvodi ćeliju u apoptozu<sup>57</sup>. Smanjenje indeksa proliferacije, povećanje indeksa apoptoze, oligozomalna DNK fragmentacija i povećanje ekspresije SGP-2 (engl. *sulfated glycoprotein-2*) i TGF- $\beta$ 1 (engl. *Transforming growth factor beta 1*) iRNK su glavne promene koje prate ovu pojavu u ćeliji<sup>57,61</sup>. Slične karakteristike se mogu zabeležiti i u ćelijskim linijama hormon-

zavisnih karcinoma dojke nakon delovanja anti-estrogenske terapije u *in vivo* i *in vitro* uslovima <sup>61</sup>. Rezultati novijih studija su pokazali da ER-R pozitivne MCF-7 ćelije karcinoma dojke kao i ER-R negativne MDA-MB-231 ćelije nakon delovanja 10nM tamoksifena reaguju aktiviranjem apoptoze, fragmentacijom DNK i povećanjem nivoa ekspresije TGF- $\beta$ 1. Tamoksifenom indukovana DNK fragmentacija u obe ćelijske linije može da se inhibira u potpunosti delovanjem TGF- $\beta$ 1 antitela <sup>61</sup>. Značaj delovanja Bcl-2 proteina kod hormon-zavisnih ćelijskih linija karcinoma dojke je takođe ispitivan. Delovanjem 17  $\beta$ -estradiola na MCF-7 ćelijsku liniju dolazi do dozno i vremenski zavisnog povećanja nivoa ekspresije gena *Bcl-2*, dok je nivo ekspresije *Bax* i *Bcl-xl* nepromenjen. U ER-R negativnoj ćelijskoj liniji MDA-MB-231 ovaj efekat delovanja estradiola izostaje. Rezultati *in vitro* studija su pokazali da estrogen smanjuje citotoksični efekat određenih agenasa tipa doksorubicina ili pacitaksela <sup>61</sup>.

Uloga i značaj receptorske familije faktora rasta u ćelijskim linijama karcinoma dojke su posebno interesantni. EGFR i HER-2 su prekomerno ekspimirani i/ili amplifikovani u 30% karcinoma dojke <sup>57,62,63</sup>. Prekomerna ekspresija EGFR je povezana sa lošom prognozom ishoda bolesti i u negativnoj je korelacionoj vezi sa nivoom ekspresije ER-R. Zavisno od uslova u ćeliji, bilo vezivanjem liganda ili antitela koja su specifično sintetisana za ove receptore može da se aktivira proces apoptoze u ćelijama. Na primer, EGF indukuje aktivaciju apoptoze u ER-R negativnim MDA-MB-468 ćelijama karcinoma dojke koje ekspimiraju prekomerno protein EGFR <sup>57</sup>. Takođe je dokazano da bilo vezivanjem liganda, bilo delovanjem antitela na ekstracelularni deo receptora, dolazi do pokretanja procesa apoptoze u ćelijama koje prekomerno ekspimiraju HER-2 receptor. Studija koja je sprovedena na ćelijskoj liniji MCF-7 dokazala je da prekomerna ekspresija HER-2 receptora blokira tamoksifenom indukovanu apoptozu u MCF-7 ćelijskoj liniji karcinoma dojke. Ovaj proces je povezan sa povećanjem ekspresije Bcl-2 i Bcl-xl proteina dok se nivo ekspresije proapoptotskih proteina (Bcl-xs i Bax) ne menja <sup>61</sup>. Ovi nalazi su dodatno potkrepljeni rezultatima kliničkih studija koji su pokazali da ER-R pozitivni karcinomi dojke imaju lošiji i slabiji odgovor na hormonsku terapiju u slučajevima kad postoji istovremeno i prekomerna ekspresija HER-2 receptora. Ekspresija HER-2 receptora može da utiče na modulaciju apoptotskog ciklusa indukujući različit odgovor delovanjem hemoterapije ili hormonske terapije <sup>58</sup>.

Ispitivanje mehanizama uključenih u proces apoptoze proširena su i na IGF-I (insulin sličan faktor rasta I), za koga je dokazano da ima mitogeni i antiapoptotski efekat na karcinomske ćelije dojke<sup>64</sup>. Njegova aktivnost je modulirana vezivanjem za IGFBP-3 (engl. *Insulin-like growth factor-binding protein 3*) nakon čega dolazi do aktivacije apoptoze u *in vitro* uslovima<sup>64</sup>. Anti-estrogen, ICI 182 780, inhibira rast ćelije i aktivira apoptotski proces u MCF-7 ćelijskoj liniji, takođe utiče na povećanje ekspresije IGFBP-3 i smanjuje ekspresiju IGF receptora. IGF-I i njegovi analozi mogu da redukuju ili da potpuno zaustave ICI 182 780 indukciju apoptoze u ćelijama karcinoma<sup>63,64</sup>. IGF-I može da utiče na modulaciju aktivacije procesa apoptoze i nakon delovanja hemoterapijskih agenasa. Studije koje su urađene na HBL100 meć ćelijskoj liniji ukazuju da je IGF signalni put uključen u aktiviranje procesa apoptoze u ćelijama karcinoma dojke<sup>64</sup>.

### **I.3.7.3. Familija Bcl-2 proteina u apoptotskom modelu karcinoma dojke**

Obrazac ekspresije Bcl-2 proteina se veoma razlikuje između normalnog i malignog tkiva dojke<sup>65</sup>. Ekspresija Bax proteina se takođe veoma razlikuje, dok je ekspresija Bcl-x proteina slična, ukoliko se u obzir uzme posmatranje normalnog i tumorski promenjenog tkiva dojke<sup>65</sup>. Tema brojnih studija odnosila se na praćenje i određivanje korelacije između nivoa ekspresije članova Bcl-2 familije proteina i unutarćelijske senzitivnosti na apoptotske stimulse. Na osnovu rezultata studije koja je sprovedena na dve ćelijske linije pokazano je da ekspresija Bax proteina stimuliše apoptozu, kao odgovor na delovanje epirubicina, ali ne stimuliše i ne povećava stopu spontano aktivirane apoptoze u datim ćelijama<sup>65</sup>. Japanska grupa istraživača je pokazala da prekomerna ekspresija Bax proteina u MCF-7 ćelijskoj liniji povećava senzitivnost odgovora na jonizujuće zračenje, smanjuje ćelijsko preživljavanje i dovodi do aktivacije apoptoze<sup>66</sup>. Tumor supresorni protein p53 stimuliše ekspresiju Bax proteina. Na osnovu ovih rezultata postavljena je hipoteza po kojoj inaktivacijom nepromenjenog tipa p53 proteina, dolazi do inhibicije ekspresije Bax proteina i na taj način i do rezistentnosti ćelije na aktiviranje procesa apoptoze<sup>66</sup>.

Prekomerna ekspresija Bcl-xs moduliše senzitivnost ćelijskog odgovora na apoptotske signale u ćeliji<sup>67</sup>. MCF-7 ćelije modifikovane sa Bcl-xs takođe modulišu

ćelijski odgovor na dve vrste terapijskih agenasa, paklitaksel i etopozid. 1995. godine je dokazano da Bcl-xl štiti karcinomske ćelije dojke od p53-posredovanog aktiviranja signalnog apoptotskog puta. Visok nivo ekspresije Bcl-xl proteina detektovan je u ćelijskoj liniji T47D, za koju je poznato da ima mutiranu formu p53<sup>67</sup>. Kada se navedene ćelije modifikuju sa temperaturno osetljivim tipom p53, iste obustavljaju svoj rast ali ne podležu procesu apoptoze na temperaturama koje su specifične za nepromenjeni tip p53 proteina. Hipoteza po kojoj povećana ekspresija Bcl-xl štiti ćeliju od p53 indukovane apoptoze testirana je na mišjim eritroleukemijskim ćelijama koje ne sadrže Bcl-2, Bcl-xl i p53<sup>67</sup>. Modifikacija ćelijske linije sa temperaturno senzitivnom formom p53 rezultira u indukciji ćelijske smrti, dok koekspresija p53 i Bcl-xl rezultuje u prekidanju rasta i deobi ćelije ali ne dovodi i do ćelijske smrti<sup>67</sup>. Tretman MCF-7 ćelijske linije natrijum bituratom smanjuje nivo ekspresije Bcl-2 i stimuliše aktiviranje procesa apoptoze u ćeliji. Prekomerna ekspresija Bcl-2 smanjuje senzitivnost MCF-7 ćelija na natrijum butiratom indukovanu apoptozu<sup>67</sup>. Male doze natrijum butirata koje ne indukuju apoptozu povećavaju senzitivnost ćelija na doksorubicinom indukovanu apoptozu u ćelijama. Modulacijom nivoa ekspresije Bcl-2 proteina, delovanjem različitih agenasa kao što je npr. natrijum butirata, može da se menja i nivo senzitivnosti karcinomskih ćelija na delovanje određenih hemijskih i hemoterapijskih agenasa. Fosforilacijom Bcl-2 protein gubi svoju antiapoptotsku sposobnost. Ovaj proces se najverovatnije ostvaruje modifikacijom njegovog vezujućeg mesta za proapoptotski protein Bax. Posttranslaciona modifikacija Bcl-2 u vidu fosforilacije, kao i njegov ukupni intracelularni nivo može da utiče na senzitivnost ćelije na hemoterapijske agense. Na osnovu ovih postulata, modulacijom nivoa ekspresije Bcl-2 proteina može da se dizajnira posebna kombinacija hemoterapijskih agenasa koji bi doprineli povećanju senzitivnosti tumorskih ćelija<sup>67,68</sup>.

#### **I.3.7.4. Evaluacija indeksa apoptoze u karcinomu dojke**

Apoptoza se javlja spontano u različitim tipovima tumora uključujući i karcinomsko tkivo dojke<sup>57</sup>. Studije koje se najčešće sprovode na ovu temu odnose se na određivanje stepena korelacije između indeksa apoptoze i poznatih histoloških i prognostičkih faktora kod karcinoma dojke. Takođe, često se ispituje i ekspresija

markera koji su povezani sa procesom apoptoze, p53, p21 i Bcl-2. Istraživanja su uglavnom fokusirana na ispitivanje njihovog prognostičkog i prediktivnog značaja kod karcinoma dojke <sup>57</sup>. S obzirom da većina hemoterapijskih agenasa deluje putem indukcije apoptoze u ćeliji, većina studija se fokusirala na verovatnoću da defekti i poremećaji u indukciji apoptotskog procesa mogu doprineti povećanju senzitivnosti na određeni vid hemoterapijske kombinacije. Većina studija je pokazala da visok indeks apoptoze korelira sa visokim gradusom tumora, aneuploidijom, visokim indeksom mitoze, negativnom ekspresijom ER-R i PR-R, tumorskom nekrozom i infiltracijom regionalnih limfnih nodusa <sup>57,59</sup>. Visok indeks apoptoze značajno je povezan sa smanjenjem preživljavanja i kod pacijentkinja sa prisutnom i kod grupe bez prisustva infiltracije tumorskih ćelija u regionalne limfne noduse. Pozitivna korelacija je zabeležena i između indeksa proliferacije i indeksa apoptoze u infiltrativnim karcinomima *in situ* <sup>69</sup>. Visok indeks proliferacije u tumorskim ćelijama dovodi do povećanja akumulacije mutacija u genskom materijalu koje uslovljavaju nove promene u navedenim ćelijama i tkivima <sup>69</sup>.

### **I.3.8. PROLIFERATIVNI MARKER (KI-67) I KARCINOM DOJKE**

#### **I.3.8.1. Struktura i funkcija Ki67 proteina**

Protein Ki67 je identifikovan od strane Gerdesa i saradnika ranih osamdesetih godina prošlog veka, upotrebom mišjeg monoklonskog antitela protiv nukleusnog antigena iz ćelijskih linija porekla Hočkinovog limfoma <sup>70</sup>. Ovaj nehistski protein je dobio ime po lokaciji Instituta u kojem je otkriven i opisan (Ki – Kiel University, Germany) i broju 67 koji se odnosi na lokaciju komorice 96-komorne ploče <sup>70</sup>.

Kompletan genski lokus Ki67 proteina čine 74 bazna para na 5' regionu i 264 bazna para na 3' regionu koji su sekvencionirani i povezani u jedinstvenu celinu od 29.965 baznih parova koji su locirani na hromozomu 10q25-ter. Gen je organizovan u 15 egzona veličine od 67 do 6845 baznih parova i 14 introna veličine od 87 do 3569 baznih parova. Tri introna sadrže homologe kopije Alu-ponovaka. Egzon 13, koji se nalazi u centru gena, sadrži 16 homologih sekvenci od 366 baznih parova (tzv. Ki67 ponovci), od kojih svaki sadrži visokokonzervirani motiv dužine 66 baznih parova

(Ki67 motiv). Do sada su identifikovane dve proteinske izoforme od 345 i 395 kD <sup>70</sup>. Protein se uglavnom nalazi u gustim fibrilarnim komponentama nukleolusa za vreme interfaze ćelijskog ciklusa, dok se za vreme mitoze povezuje sa periferno lociranim kondenzovanim hromozomima <sup>70</sup>. Aktivni poluživot proteina iznosi 1 do 1.5 h u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa u kojoj se ćelija nalazi. Ekspresija Ki67 proteina varira u toku različitih faza ćelijskog ciklusa. Ekspresija proteina je potvrđena tokom G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> i M faza ćelijskog ciklusa, ali ne i za vreme G<sub>0</sub> faze. Najmanji stepen ekspresije Ki67 javlja se tokom G<sub>1</sub> i ranog perioda S faze, dok se maksimalna ekspresija javlja za vreme G<sub>2</sub> i kasne S faze ćelijskog ciklusa <sup>71</sup>.

### **I.3.8.2. Ki67 i karcinom dojke**

U zdravom, tumorski nepromenjenom tkivu dojke, ekspresija Ki67 proteina je jako niska tako da je nizak i indeks proliferacije (manje od 3%). Nekoliko studija je pokazalo da je ekspresija Ki67 proteina u zdravom, tumorski nepromenjenom tkivu dojke, ograničena na ćelije u kojima nedostaje pozitivna ekspresija ER-R. ER-R imunoreaktivne ćelije normalnog tkiva dojke ne proliferišu i ne ekspimiraju Ki67 protein <sup>71</sup>. Ova razlika između indeksa proliferacije i steroidnih receptora se ne odnosi i na tumorski promenjeno tkivo dojke <sup>70,71</sup>.

Prema rezultatima ranijih studija ekspresija Ki67 proteina se smanjuje nakon dodavanja letrozole, koji se dodaje zajedno sa zamenom za hormonsku terapiju kod žena sa visokorizičnim oblicima karcinoma dojke <sup>71</sup>. Kod pacijentkinja sa duktalnim karcinomom dojke *in situ* (DCIS), oko 40% ispitanica karakteriše visok indeks proliferacije. Visok nivo ekspresije Ki67 proteina povezan je sa visokim histološkim gradusom, komedo tipom nekroze tkiva, kao i prisustvom mikroinvazija <sup>71</sup>. Na osnovu navedenog Ki67 se smatra lošim prediktorom ishoda bolesti kod pacijentkinja sa DCIS. Najnovija WHO klasifikacija zasniva se na opisu 16 retkih novih epitelnih tipova karcinoma dojke. Ekspresija Ki67 predstavlja jedan od ključnih parametara za karakterizaciju imunoprofila ovih tipova karcinoma dojke. Karcinomi dojke koji su bogati lipidima imaju visok nivo ekspresije Ki67 proteina. Invazivni lobularni karcinomi, koji čine 5% do 15% svih invazivnih karcinoma dojke, obično pokazuju nizak nivo indeksa proliferacije <sup>70,71</sup>.

### I.3.8.3. Prognostički značaj Ki67

Mnoge studije bavile su se ispitivanjem potencijalnog značaja Ki67 kao prognostičkog markera u karcinomu dojke. Grupa istraživača je ispitala ekspresiju ER-R, PR-R, HER-2 i Ki67 proteina na osnovu kojih je podeljena grupa luminalnih karcinoma dojke na luminalni A i B tip karcinoma. Luminalni tip karcinoma dojke koga je karakterisao visok indeks proliferacije, veći od 14%, odnosio se na luminalni B tip i ukazivao je na lošiju prognozu ishoda bolesti i kraće preživljavanje u odnosu na luminalni A tip karcinoma dojke kod koga je indeks proliferacije bio ispod 14% <sup>70,71</sup>. Desetogodišnji period praćenja pokazao je da su pacijentkinje sa luminalnim A tipom karcinoma dojke imale najbolji ishod bolesti jer je kod 92% zabeleženo preživljavanje bez pojave metastaze i recidiva bolesti. Stopa preživljavanja je nešto manja kod pacijentkinja sa luminalnim B tipom (79%) i luminalnim/HER-2 pozitivnim tipom (78%) karcinoma dojke <sup>70,71</sup>.

Tri velike studije su se bavile analizom postojećih podataka koji se odnose na prognostički značaj Ki67 proteina u karcinomu dojke. Colozza je sa svojim saradnicima uradio metaanalizu 15 studija koje su obuhvatile ukupno 5137 pacijentkinja sa karcinomom dojke <sup>72</sup>. Međutim, zaključci dobijeni na osnovu ovih rezultata su ograničeni s obzirom na mali broj podataka koji su objavljeni iz ovih studija. Naime, najveći broj njih se odnosio na ispitivanje III i IV faze kliničkih studija, bez podataka o početnim stadijumima bolesti <sup>72</sup>.

Najnovija metaanaliza koju su uradili Azambuja i njegova grupa saradnika odnosio se na ispitivanje veze između ekspresije Ki67 i dužine preživljavanja kod pacijentkinja obuhvaćenih u 29 studija <sup>73</sup>. Rezultati zasnovani na podacima ove metaanalize ukazuju na činjenicu da visok indeks proliferacije ukazuje na lošiji ishod same bolesti i kraće preživljavanje kod pacijentkinja sa karcinomom dojke <sup>73</sup>.

Znatno lošiju prognozu ishoda bolesti imale su pacijentkinje sa visokim indeksom proliferacije i negativnim statusom regionalnih limfnih nodusa u odnosu na pacijentkinje sa prisutnom tumorskom infiltracijom limfnih nodusa <sup>73</sup>.

Poslednja metaanaliza sprovedena je na ukupno 15.790 pacijentkinja <sup>74</sup>. Najmanje sto studija bavilo se ispitivanjem odnosa između indeksa proliferacije tumorskih ćelija i stope preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom dojke. Ove

studije su takođe potvrdile da veći indeks proliferacije ukazuje na lošiji ishod bolesti i kraći period preživljavanja. Međutim, bez obzira na celokupnost informacije koja se dobija određivanjem indeksa proliferacije, Ki67 protein ipak nema status nezavisnog prognostičkog markera kod pacijentkinja sa karcinomom dojke<sup>71,74</sup>.

#### **I.3.8.4. Prediktivni značaj Ki67**

Podaci koji se odnose na značaj određivanja ekspresije Ki67 proteina kao prediktivnog markera u karcinomu dojke su jako retki i kontroverzni. Osnovni nedostatak studija koje su se bavile određivanjem prediktivnog značaja Ki67 proteina u karcinomu dojke odnosi se na različite laboratorijske metode i statističke modele koji su u njima primenjeni. Tri centralna pitanja koja se postavljaju i na koja treba dati odgovore jesu: 1. da li Ki67 može da služi kao poseban marker koji će ukazivati na poseban benefit pacijentkinja nakon primene određene hemoterapije ili endokrine terapije; 2. da li Ki67 može da posluži kao marker koji ukazuje da će određena grupa pacijentkinja imati dobar odgovor na delovanje pojedinačnih terapijskih agenasa; i 3. može li Ki67 da posluži kao marker koji specifično predviđa odgovor na delovanje posebnih, pojedinačnih endokrinih terapijskih agenasa<sup>71</sup>.

Ispitivanje na ovu temu sprovedeno je u oko 22 studije, 14 studija se odnosilo na ispitivanje delovanja nespecifične terapije, 5 na delovanje specifičnih terapija dok su se tri kliničke studije odnosile na ispitivanje veze između indeksa proliferacije i pojave metastaza<sup>75</sup>. Nijedna studija nije pokazala statistički značajnu interakciju između nivoa ekspresije Ki67 proteina i prosečnog perioda preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom dojke<sup>75</sup>. Tokom IX ciklusa kliničke studije ispitivanje je sprovedeno na 923 pacijentkinje koje su bile u periodu menopauze i koje su primile terapiju tamoksifena ili kombinaciju tamoksifena i CMF. Kod pacijentkinja koje su tretirane samo endokrinom terapijom, visok proliferativni indeks ukazivao je na lošiju prediktivnu vezu sa ishodom bolesti<sup>76</sup>.

Da bi se ispitao jasan prognostički značaj Ki67 proteina prilikom delovanja specifičnih formi hemoterapijskih agenasa sprovedeno je nekoliko studija<sup>77-80</sup>. U jednoj od studija, PACS01, ispitivano je 699 pacijentkinja i određivana je veza između ekspresije Ki67 i prediktivnog benefita nakon šest ciklusa fluorouracila, epirubicina i



ciklofosfamida i tri ciklusa FEC koji su praćeni sa tri ciklusa docetaksela. Rezultati ove studije su pokazali da povećana ekspresija Ki67 proteina kod ER-R pozitivnih karcinoma dojke ukazuje na budući dobar odgovor na terapiju docetakselom. Studija BR9601 je sprovedena na 374 premenopauzних i postmenopauzних pacijentkinja koje su podvrgnute standardnoj terapiji koja se sastoji od osam ciklusa CMF ili kombinacije epirubicin-CMF<sup>77</sup>. Terapija je primenjivana u toku 21 dana. Na osnovu svih rezultata došlo se do zaključka da Ki67 nije prediktor dobrog odgovora na terapiju antraciklinima<sup>77-80</sup>.

Bez obzira na opsežnost istraživanja, studije koje su ispitivale prediktivni značaj indeksa proliferacije kod pacijentkinja tokom i nakon delovanja hemoterapijskih i endokrinih terapijskih agenasa, kao i njihovih kombinacija, nisu pokazale da se protein Ki67 može smatrati samostalnim prediktorom odgovora na terapiju<sup>71</sup>. Generalno, podaci ukazuju na to da pacijentkinje sa visokim indeksom proliferacije imaju bolji odgovor na delovanje taksana u odnosu na netaksansku terapiju, kao i na delovanje terapije letrozolom u odnosu na tamoksifen<sup>71</sup>.

#### **I.3.8.5. Prediktivni značaj Ki67-neoadjuvantni tretman**

Potencijalni značaj Ki67 proteina u predviđanju odgovora na terapiju i određivanje prosečne dužine preživljavanja ispitivan je praćenjem pretretmanskog i posttretmanskog indeksa proliferacije prilikom delovanja neoadjuvantnih hemoterapijskih i antihormonskih agenasa<sup>71</sup>. Ova metaanaliza je zasnovana na 12 kliničkih studija koje su obuhvatile pacijentkinje sa primenjenom hemoterapijom i kombinacijom hemoterapijskih agenasa i tamoksifena. Sedam kliničkih studija je pokazalo da je Ki67 značajan prediktivni marker i u slučaju kliničkog i u slučaju patološkog odgovora na primenjenu terapijsku kombinaciju<sup>71</sup>. Četiri studije su čak pokazale da Ki67 predstavlja nezavisni prediktivni marker primenom multivarijantne analize. Jedna od studija je pokazala da povećan indeks proliferacije ima uticaja i na kompletan klinički odgovor kao i na patohistološku sliku tumora kod ispitanica. Međutim, ni ovi rezultati nisu opravdali Ki67 kao nezavisni prediktivni marker kod pacijentkinja sa karcinomom dojke. Nekoliko studija je potvrdilo da pacijentkinje sa većim proliferativnim indeksom imaju značajnije promene u patohistološkoj slici

tumora u odnosu na pacijentkinje sa manjim indeksom proliferacije <sup>74</sup>. Pored ove studije, poređenjem rezultata dobijenih nakon delovanja neoadjuvantnih hemoterapijskih agenasa nije pronađena pozitivna korelacija između ekspresije Ki67 i odgovora na terapiju <sup>71,80</sup>. Na osnovu svih sprovedenih studija nije utvrđeno da nivo ekspresije proliferativnog markera Ki67 može da ukaže na benefit specifičnog terapijskog protokola ili pojedinačnih terapijskih agenasa.

Generalno, kod neoadjuvantnih terapijskih protokola, Ki67 može da ukazuje na značajan odgovor prilikom delovanja određenih kombinacija hemoterapijskih agenasa. Većina studija je pokazala da pacijentkinje sa niskim indeksom proliferacije imaju bolji odgovor na delovanje antihormonskih terapijskih agenasa u odnosu na one sa visokim proliferativnim indeksom. Međutim, na osnovu sumiranja svih poznatih rezultata ne može se reći da Ki67 može biti individualni prediktivni marker primene ni jednog posebnog tipa ili terapijske kombinacije kod pacijentkinja sa karcinomom dojke <sup>71</sup>.

Slično kao i pri određivanju stepena ekspresije steroidnih receptora ili HER-2 receptora, različite grupe istraživača pridržavale su se različitih kriterijuma kod određivanja stepena ekspresije Ki67 što stvara dodatne probleme prilikom sumiranja rezultata i sprovođenja metaanaliza. U studijama koje se bave ispitivanjem prediktivnog značaja markera Ki67 neophodno je usaglašavanje podataka i kriterijuma za cut-off ekspresiju ovog markera čime bi se napravio ujednačen sistem sa mogućnošću međusobnog poređenja velikog broja uzoraka i studija. Prema opšteprihvaćenom mišljenju postoji jako velika verovatnoća da se proliferativni indeks može smatrati prediktivnim markerom za odgovor na terapiju što je posebno izraženo kod pacijentkinja sa visokim indeksom proliferacije. Ovakve pacijentkinje imaju dobar odgovor na hemoterapiju. Takođe postoji mali broj studija koje ukazuju na to da se nivo ekspresije markera proliferacije može dovesti u vezu sa odgovorom na poseban tip terapijskih agenasa. Dokazano značajnu prediktivnu i prognostičku ulogu kod karcinoma dojke do sada imaju steroidni receptori i HER-2 receptor <sup>81</sup>. Ki67 za sada ima značajnu ulogu kao prognostički marker kod pacijentkinja u ranim stadijumima razvoja samog karcinoma dojke <sup>81</sup>.

## I.4. BRCA1 PROTEIN I KARCINOM DOJKE

Geni *BRCA1/2* (engl. **BREAST CANCER 1/2**) odgovorni su za pojavu 20% familijarnih karcinoma dojke i ovarijuma. Danas znamo da se mutacije gena *BRCA* javljaju u frekvenciji od 1:250 žena<sup>82</sup>.

### I.4.1. Gen BRCA1

Gen *BRCA1* lokalizovan je na hromozomu 17q21. Ovaj gen se sastoji od 5592 nukleotida raspoređenih u 24 egzona (22 kodirajuća; alternativni 5'UTR egzon, 1a&1b) koji se prostiru na hromozomskom regionu od 81 kb<sup>82,83</sup>. Gen kodira transkript veličine 81 kb sa 22 egzona. Gen se transkribuje u svim tkivima, a njegov produkt je protein koji se sastoji od 1863 aminokiseline. Egzon 11 *BRCA1* gena odgovoran je za kodiranje 61% aminokiselina proteina BRCA1. Identifikovano je više od 600 različitih mutacija u genu *BRCA1* od kojih više od trećine nema klinički značaj, pa se smatra da se radi o normalnim alelnim varijantama<sup>82,84</sup>.

### I.4.2. Protein BRCA1

Gen *BRCA1* kodira sintezu proteina od 220 kD, koji je građen od 1836 aminokiselina. Protein BRCA1 se normalno nalazi u jedru i sadrži fosforilisane rezidue. On sadrži samo dva prepoznatljiva proteinska motiva–RING prstasti domen u blizini N–terminalnog kraja i 2 BRCT domena na C–terminalnom kraju<sup>82,84</sup>. Nedavno je pokazano da RING prstasti region može da intereaguje sa N-terminalnim regionom drugog proteina i da formira heterodimer, u kome su prstasti izraštaji spojeni, a koji ima ulogu u transkripciji DNK. Drugi vezujući protein je nazvan BARD1 (engl. *BRCA1-associated RING Domain Protein 1*). Vezivanje RING domena za BARD1 podstiče aktivnost ubikvitin-ligaze. Blizu C-terminalnog kraja oba proteina poseduju BRCT domen, uključujući i dve verzije „core motif“. Mutacije nastale kao rezultat zamene cisteina glicinom na mestu 61 ili 64 u RING domena su tumorogene. Na delu proteina između 200-300. aminokiselinske sekvence nalaze se tzv. nukleusno lokalizujući signali (NLSs) sposobni za vezivanje proteina za p53, MYC, RB (engl. *retinoblastoma protein*)

i ZNF350 (engl. *Zinc finger protein 350*). DNK-vezujući domen na BRCA1 nalazi se između 452. i 1079. aminokiseline. Ovaj centralni deo primarne strukture proteina interreaguje sa proteinima Rad51 i BASC (engl. *BRCA1-associated genome surveillance complex*) i odgovoran je za reparaciju i rekombinaciju DNK. Naime, Rad51 je ključna komponenta homologne rekombinacije i reparacije prekinutog duplog lanca DNK. Poznata je još jedna centralna sekvenca proteina između 1280. i 1524. aminokiseline označena kao SCD (engl. *BRCA1 serine cluster domain*). Ona je odgovorna za vezivanje BRCA1 za ATM (engl. *ATM kinases activated by DNA damage*), CHK2 i CDK2 (engl. *Cyclin dependent kinase 2*). Dva regiona na C-terminalnom kraju označena su kao BRCT domeni. Oni su sastavljeni od 110 aminokiselina i zauzimaju poziciju između 1646. i 1859. aminokiseline. BRCT domeni su prisutni u nekoliko proteina uključenih u reparaciju DNK. Preko ovih domena BRCA1 se vezuje za više proteina među kojima su RNK polimeraza II, p300, BACH1, histon-deacetilaze (HDAC) 1 i 2, p53, CtIP (engl. *chymotrypsin-like proteinase 5B precursor*) i RB<sup>82-84</sup>. Funkcija BRCA1 nije do kraja rastumačena, ali verovatno ima važnu ulogu u reparaciji DNK, aktivaciji transkripcije, apoptozi i zaustavljanju ćelijskog ciklusa.

#### **I.4.3. Fenotipske karakteristike karcinoma dojke s mutacijama gena *BRCA1***

BRCA1 pozitivni karcinomi dojke su obično infiltrativni duktalni karcinomi koje odlikuje visok histološki gradus, ili atipični medularni karcinomi<sup>85</sup>. Ovi karcinomi pokazuju tzv. bazalni fenotip. Čelije ovih tumora ekspimiraju citokeratin 5/6 i citokeratin 14, obično ne ekspimiraju ER-R i HER-2, dok je akumulacija proteina p53 izrazita<sup>85</sup>. Ovi karcinomi su češće p53 pozitivni (77%) u odnosu na sporadične tumore (35%) i tumore nastale kao posledica mutacije gena *BRCA2* (45%). Karcinomi dojke nastali kod žena nosioca mutacija gena *BRCA1/BRCA2* imaju nepromenjen nivo ekspresije Bcl-2 u odnosu na zdrave ispitanice, uprkost postojanju visokog proliferativnog potencijala i frekventnim mutacijama p53<sup>85</sup>. Takođe BRCA1 pozitivni karcinomi prekomerno ekspimiraju ciklin E i pokazuju smanjenu ekspresiju p27<sup>86,87</sup>. Progresija naslednih karcinoma dojke sa *BRCA1* mutacijama je različita od progresije sporadičnih karcinoma dojke najmanje iz dva razloga<sup>88</sup>. Prvo, utvrđeno je da kod ovih

pacijentkinja postoji slaba veza između veličine primarnog tumora i broja zahvaćenih limfnih nodusa. I pored toga, ove pacijentkinje imaju lošiju prognozu ishoda bolesti u odnosu na žene sa sporadičnim karcinomima dojke. Drugo, ovi tumori iako ne ekspimiraju ER-R, mogu da pruže, po nekim autorima, dobar odgovor na antiestrogensku terapiju tamoksifenom <sup>86</sup>. Ooforektomija redukuje incidencu pojave prvog i drugog primarnog tumora, a primena tamoksifena je efikasna u prevenciji pojave drugog primarnog tumora kod nosilaca mutacije u genu *BRCA1* <sup>89,90</sup>.

## II CILJ ISTRAŽIVANJA

Stepen proteinske i genske ekspresije HER-2 i TOP2A kod oboljelih od karcinoma dojke predstavlja najvažniji prognostički i prediktivni faktor za ovo oboljenje. Najlošiji ishod bolesti imaju pacijentkinje kod kojih postoji prekomerna ekspresija oba ova markera, pa je moguće da ta grupa tumora ispoljava specifični i još nedovoljno istražen fenotip. S druge strane, i pored toga što postoji dobra podudarnost između proteinske ekspresije navedenih bioloških markera, dokazane imunohistohemijskim metodama, i genske amplifikacije, dokazane FISH metodom, određeni broj pacijentkinja ispoljava gensku amplifikaciju bez prekomerne ekspresije proteina i *vice versa*.

Polazeći od gore navedenih saznanja cilj ove studije je bio da se u karcinomima dojke koji su na osnovu stepena ekspresije ER-R, PR-R i HER-2 receptora svrstani u četiri molekularna tipa odrede:

1. osnovne histološke i makroskopske karakteristike infiltrativnih karcinoma dojke;
2. učestalost pojave i intenzitet ekspresije ER-R, PR-R, tumor supresornog proteina p53, HER-2, Bcl-2, Ki67, BRCA1, TOP2A i apoptotskog indeksa;
3. učestalost amplifikacije gena *HER-2* u tumorskim ćelijama;
4. učestalost amplifikacije i delecije gena *TOP2A* u tumorskim ćelijama;
5. korelacija između ekspresije ispitivanih bioloških markera u odnosu na starost ispitanica;
6. korelacija između genskih modifikacija za *HER-2* i *TOP2A* sa proteinskom ekspresijom ostalih ispitivanih bioloških markera.

### III MATERIJAL I METODE

#### III.1. ISPITANICI

Studijom je obuhvaćeno 60 pacijentkinja sa infiltrativnim duktalnim karcinomom dojke koje su lečene u periodu između januara 2009. i februara 2013. godine u Kliničkom centru Užice, OJ Opšta bolnica Užice.

Prosečno životno doba ispitanica iznosilo je  $64.79 \pm 21$  godinu. Najmlađa ispitanica bila je stara 38, a najstarija 87 godina.

Kompletna dijagnostika bolesti, uključujući i patohistološku dijagnozu, izvršena je u gorenavedenom kliničko-bolničkom centru, tj. u Službi za patohistologiju Kliničkog centra Užice. U Laboratoriji za imunohistohemiju i elektronsku mikroskopiju, Grupe za neuroendokrinologiju, Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, izvršeno je imunohistohemijsko bojenje na HER-2, ER-R, PR-R, p53, Bcl-2, Ki67, BRCA1, TOP2A i ssDNA, kao i FISH bojenje na prisustvo i stepen genske amplifikacije za gene koji kodiraju *HER-2* i *TOP2A*, urađena je fotodokumentacija i obrađeni su kompletni rezultati ove studije.

#### III.2. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke

Na osnovu ekspresije ER-R, PR-R i HER-2 receptora tumorske promene su podeljene u četiri molekularna tipa: luminalni A tip (ER-R<sup>+</sup> i/ili PR-R<sup>+</sup> i HER-2<sup>-</sup>), luminalni B tip (ER-R<sup>+</sup> i /ili PR-R<sup>+</sup> i HER-2<sup>+</sup>), tripl ili trostruko negativni tip karcinoma (ER-R<sup>-</sup>, PR-R<sup>-</sup> i HER-2<sup>-</sup>) i HER-2 pozitivni tip (ER-R<sup>-</sup>, PR-R<sup>-</sup> i HER-2<sup>+</sup>)<sup>26</sup>. Prvu grupu čini takozvani luminalni A tip karcinoma dojke koju karakteriše molekularni fenotip sa ER-R i/ili PR-R pozitivnom ekspresijom, a negativnom ekspresijom HER-2 receptora<sup>26</sup>. Drugu grupu čini luminalni B tip karcinoma dojke koji je vrlo sličan po svom molekularnom fenotipu luminalnom A tipu karcinoma dojke od koga se razlikuje samo po pozitivnoj ekspresiji HER-2 receptora. Trostruko negativni tumori, koji su ER-R, PR-R i HER-2 receptor negativni, svrstani su u treću molekularnu kategoriju karcinoma dojke<sup>26</sup>. Četvrtu grupu čine HER-2 pozitivni karcinomi dojke kod kojih postoji pozitivna ekspresija HER-2 receptora, kao i amplifikacija gena za HER-2<sup>26</sup>. Raspodela pacijentkinja u četiri molekularna tipa prikazana je u tabeli 3.

**Tabela 3.** Prikaz karcinoma ispitivanih pacijentkinja raspoređenih u četiri molekularna tipa

<b>Molekularni tip karcinoma dojke</b>	<b>Broj ispitivanih karcinoma</b>
<b>Luminalni A tip</b>	24/60 (40%)
<b>Luminalni B tip</b>	26/60 (43.4%)
<b>Trostruko negativni tip</b>	4/60 (6.6%)
<b>HER-2 pozitivni tip</b>	6/60 (10%)
<b>Ukupno</b>	60 100%)

### **III.3. PATOHISTOLOŠKA ANALIZA**

#### **III.3.1. Priprema uzoraka za rutinski patohistološki pregled, imunohistochemijska i FISH ispitivanja**

Uzorci tumorskog tkiva dojke su fiksirani u 4% rastvoru puferisanog formalina 24 h na sobnoj temperaturi. Po završetku fiksacije uzorci tkiva su dehidratirani provođenjem kroz seriju alkohola rastuće koncentracije (70%, 96%, 100%), prosvetljivani u ksilolu i kalupljeni u parafinu. Za rutinski patohistološki pregled uzorci su bojeni hematoksilin-eozinom na standardni način.

U cilju imunohistochemijskih i FISH ispitivanja rezovi debljine 5  $\mu\text{m}$  su montirani na posebne visokoadherentne pločice (*SuperFrost*) i sušeni na temperaturi od 56<sup>0</sup>C u toku jednog sata.

#### **III.3.2. Rutinski makroskopski i patohistološki pregled**

Postavljanje patohistološke dijagnoze karcinoma dojke vršeno je u skladu sa kriterijumima WHO.

### **III.4. IMUNOHISTOHEMIJSKA ISPITIVANJA**

U ovoj studiji, na svim tkivnim uzorcima ispitivanih infiltrativnih karcinoma dojke, izvršena su imunohistochemijska bojenja u cilju dokazivanja ekspresije proteina HER-2, ER-R, PR-R, Ki67, p53, Bcl-2, TOP2A, BRCA1 i ssDNA. Primenjena je indirektna trostepena streptavidin-biotin imunohistochemijska metoda detekcije



(LSAB<sup>+</sup>/HRP kit, DAKO, Danska), u kojoj je streptavidin obeležen peroksidazom rena. Takođe je na svim tkivnim uzorcima vršeno ispitivanje prisustva i stepena genske amplifikacije za *HER-2* i *TOP2A*.

Pregled primarnih i sekundarnih antitela korišćenih u ovim istraživanjima dat je u tabeli 4.

#### **III.4.1. Princip primenjene imunohistoemijske metode LSAB<sup>+</sup>/HRP**

Među indirektnim imunohistoehmijskim metodama u širokoj upotrebi je trostepena avidin-biotin kompleksna metoda. Danas se primenjuju dve varijante ove metode: standardna avidin-biotin kompleksna metoda (ABC) i obeležena avidin-biotin tehnika (LAB). Obe metode zahtevaju biotinizirano antitelo kao vezujuće antitelo. Biotinizacija je diskretan proces u toku koga se biotin kovalentno vezuje za antitelo. Otvorena mesta na avidinu iz kompleksa avidin-biotin ili enzimom obeleženog avidina, vezuju se za biotin na vezujućem antitelu. Biotinizirano antitelo se ne dodaje u višku pošto za vezivanje nisu potrebna slobodna Fab mesta. Peroksidaza rena ili alkalna fosfataza su enzimi koji se najčešće koriste za obeležavanje u ovim procedurama<sup>91</sup>.

DAKO LSAB<sup>+</sup> kit obeležen peroksidazom bazira se na SAB (streptavidin-biotin) metodi, ali koristi visoko rafiniranu avidin-biotin tehniku u kojoj biotinizirano sekundarno antitelo reaguje sa nekoliko streptavidinskih molekula konjugovanih peroksidazom. Na avidinu se nalaze 4 vezujuća mesta za biotin. Međutim, zbog molekularne orijentacije biotin-vezujućih mesta, stvarno se vezuje manje od 4 molekula biotina.

#### **III.4.2. Protokol imunohistoemijske metode LSAB<sup>+</sup>/HRP**

Bojenje je vršeno na tkivnim presecima debljine 5µm, koji su sušeni 60 minuta na temperaturi od 56°C. Preseci su deparafinisani u ksilolu i rehidratirani kroz seriju alkohola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%).

**Tabela 4.** Pregled primarnih i sekundarnih antitela korišćenih u imunohistochemijskim ispitivanjima

Primarno antitelo (At)/klon	Proizvođač/kataloški broj	Razblaženje primarnog At	Sekundarno antitelo	Vizuelizaciona metoda
<b>HER-2</b> (po zečiji anti-humani c-erb-2 onkoprotein)	DAKO-Glostrup, Danska Cat# A0485	1:250	Biotinizirani anti-mišji, anti-zečji i anti-kozji Ig	LSAB <sup>+</sup> /HRP
<b>ER-R</b> (mo mišji anti-humani estrogenski receptor, klon TE-111)	Oncogene Research Products, San Diego, Kalifornija Cat#GR17	1:50	Biotinizirani anti-mišji, anti-zečji i anti-kozji Ig	LSAB <sup>+</sup> /HRP
<b>PR-R</b> (mo mišji anti-humani progesteronski receptor, klon PR4-12)	Oncogene Research Products, San Diego, Kalifornija Cat#GR18	1:50	Biotinizirani anti-mišji, anti-zečji i anti-kozji Ig	LSAB <sup>+</sup> /HRP
<b>p53</b> (mo mišiji anti-humani tumor supresorski protein p53, klon DO-7)	DAKO-Glostrup, Danska Cat# M7001	1:50	Biotinizirani anti-mišji, anti-zečji i anti-kozji Ig	LSAB <sup>+</sup> /HRP
<b>Bcl-2</b> (mo mišiji anti-humani onkoprotein bcl-2, klon 124)	DAKO-Glostrup, Danska Cat# M 0887	1:10	Biotinizirani anti-mišji, anti-zečji i anti-kozji Ig	LSAB <sup>+</sup> /HRP
<b>BRCA1</b> (mo mišiji anti-humani protein BRCA1, klon MS 110)	Oncogene Research Products, Diego, Kalifornija Cat#OP92.	1:50	Biotinizirani anti-mišji, anti-zečji i anti-kozji Ig*	LSAB <sup>+</sup> /HRP
<b>TOP2A</b> (mo mišiji anti-humani protein TOP2A, klon 3F6)	Novocastra Lab., UK NCL-TOPOIIA	1:100	Biotinizirani anti-mišji, anti-zečji i anti-kozji Ig*	LSAB <sup>+</sup> /HRP
<b>Ki67</b> (mo mišji anti-humani protein, klon MM1)	DAKO-Glostrup, Danska Cat#M7187	1:50	Biotinizirani anti-mišji, anti-zečji i anti-kozji Ig	LSAB <sup>+</sup> /HRP
<b>ssDNA</b> (mo mišji anti-humani protein, klon F7-26)	Abcam plc 332, Velika Britanija ab79439	1:100	Biotinizirani anti-mišji, anti-zečji i anti-kozji Ig	LSAB <sup>+</sup> /HRP

\*mo-monoklonski; po-poliklonski; Ig-immunoglobulini; LSAB-obeležen streptavidin-biotin (engl. labeling streptavidin-biotin); HRP- peroksidaza rena (engl. horse redish peroxidase)

### III.4.2.1. Demaskiranje antigena

Formaldehid u toku fiksacije, kao i parafin u toku kalupljenja, izazivaju steričke promene proteina u tkivu formiranjem intermolekularnih veza. Dugotrajna formalinska fiksacija može da maskira antigene i umanjuje efekat specifičnog imunohistohemijskog bojenja. Stoga se postupkom demaskiranja antigena postiže obnavljanje primarne sterične konfiguracije antigena uklanjanjem neželjenih intermolekularnih veza, putem njihovog kidanja i uklanjanjem  $\text{Ca}^{++}$  uz pomoć citrata <sup>91</sup>.

Demaskiranje antigena u ovoj studiji sprovedeno je u skladu sa protokolom za primenu svakog antitela ponaosob na presecima tkiva fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafin. Demaskiranje antigena sprovedeno je nakon uobičajene deparafinizacije preparata. U cilju demaskiranja proteina HER-2, TOP2A, BRCA1 i ssDNA, tkivni preseci potopljeni su u komercijalni citratni pufer pH 6 (Target Retrieval Solution, Code No. S 1700, DAKO, Danska) izlagani su mikrotalasnim zracima (pri jačini od 560W) u toku 21 min, dok je za demaskiranje antigena Bcl-2 i p53 korišćena jačina zraka od 800W u trajanju od 21 min. Za detekciju ER-R, PR-R i Ki67 proteina tkivni preseci potopljeni u citratni pufer izlagani su visokoj temperaturi pod pritiskom u toku 2 minuta, upotrebom ekspres lonca.

### III.4.2.2. Postupak bojenja

Nakon izvršene deparafinizacije i postupka demaskiranja antigena, blokirana je endogena peroksidaza 3% vodenim rastvorom  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim su tkivni preseci inkubirani sa primarnim antitelom u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h.

Nakon toga vršena je inkubacija sa biotiniziranim anti-mišjim, anti-kozjim i anti-zečjim imunoglobulinima 30 minuta na sobnoj temperaturi. U sledećoj etapi preseci su tretirani streptavidinskim konjugatom na peroksidazu rena, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Na kraju preseci su inkubirani u rastvoru supstrat-hromogena (3,3'-diamino-benzidin tetrahidrohlorid i  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), upotrebom  $\text{DAB}^+$ /kita (Code No. K3468, DAKO, Danska) u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Za rastvaranje primarnih antiseruma korišćen je komercijalni rastvarač (Cat. No. SO809, DAKO,

Danska), a za ispiranje u toku imunohistohemijskog bojenja, 0.01 M fosfatni pufer pH 7.4. Preparati su kontrastirani Mayer-ovim hematoksilinom i montirani u vodeni medijum (Aquatex-OC 261903, Merck, Nemačka).

#### **III.4.2.3. Kontrola kvaliteta i specifičnosti imunohistohemijskog bojenja**

Imunohistohemijska bojenja izvršena su uz kontrolu kvaliteta i specifičnosti bojenja primenom pozitivnih i negativnih kontrola prema propozicijama UK NEQAS (engl. *UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry*).

Kao pozitivni kontrolni uzorci korišćeni su poznati uzorci karcinoma dojke kod kojih je ekspresija bioloških markera već ranije dokazana. Naime, svi pozitivni kontrolni uzorci ranije su višestruko testirani i dokazano sadrže ispitivane antigene, a primenjeni su na isti način kao i ispitivani uzorci u ovim istraživanjima.

Kao negativna kontrola u toku imunohistohemijskog bojenja služili su tkivni uzorci ispitivanih tumora koji su bojeni paralelno sa uzorcima na kojima se dokazuje ekspresija bioloških markera, ali su u toku procedure bojenja tretirani neimunim serumom umesto primarnog antitela.

#### **III.5. SEMIKVANTITATIVNA PROCENA EKSPRESIJE PROTEINA HER-2, ER-R, PR-R, p53, Bcl-2, BRCA1 i TOP2A, KAO I KVANTITATIVNO ISPITIVANJE INDEKSA PROLIFERACIJE (KI67) I INDEKSA APOPTOZE (ssDNA)**

Procena ekspresije proteina HER-2, ER-R, PR-R, p53, Bcl-2, BRCA1 i TOP2A vršena je semikvantitativnom metodom sa preparata obojenih imunohistohemijskim metodama za dokazivanje prisustva navedenih antigena. Broj ćelija u proliferaciji izražavan je kao indeks proliferacije, a određen je kao broj Ki-67-imunoreaktivnih ćelija na 100 tumorskih ćelija brojanih u tri različite reprezentativne zone tumora, dok je broj ćelija u apoptozi izražavan kao indeks apoptoze, a određivan je kao broj ssDNA imunoreaktivnih ćelija na 1000 tumorskih ćelija brojanih u tri različite reprezentativne zone tumora.

### III.5.1. Semikvantitativna procena ekspresije HER-2 proteina

Semikvantitativno određivanje ekspresije HER-2 vršeno je procenom intenziteta i procenta zastupljenosti membranskog bojenja tumorskih ćelija. Ukoliko se tumorske ćelije ne boje ili je bojenje prisutno u manje od 10% tumorskih ćelija procenjuje se da ne postoji ekspresija HER-2, tj. bojenje je negativno (bod 0). Negativnim bojenjem se smatra i kada je prisutno slabo, parcijalno membransko bojenje u više od 10% tumorskih ćelija (bod 1). Slabo pozitivno bojenje (bod 2) postoji u slučaju slabog do umereno kompletnog membranskog bojenja u više od 10% tumorskih ćelija. Jako pozitivno bojenje (bod 3) postoji u slučaju izrazito jakog kompletnog membranskog bojenja koje postoji u više od 10% tumorskih ćelija (tabela 5)<sup>92,93</sup>.

**Tabela 5.** Procena ekspresije proteina HER-2 u tumorskim ćelijama

Histološka slika	Bod	Interpretacija ekspresije proteina HER-2
Nema bojenja ili je membransko bojenje prisutno u manje od 10% tumorskih ćelija	<b>0</b>	HER-2 se ne eksprimira ( <b>negativno</b> )
Slabo/jedva vidljivo parcijalno membransko bojenje prisutno je u više od 10% tumorskih ćelija	<b>1+</b>	HER-2 se ne eksprimira ( <b>negativno</b> )
Postoji slabo/umereno kompletno membransko bojenje u više od 10% tumorskih ćelija	<b>2+</b>	HER-2 je slabo eksprimiran ( <b>slaba pozitivnost</b> )
Jako, kompletno membransko bojenje prisutno je u više od 10% tumorskih ćelija	<b>3+</b>	HER-2 se izrazito eksprimira ( <b>jaka pozitivnost</b> )

### III.5.2. Semikvantitativna procena ekspresije ER-R i PR-R

Semikvantitativna procena ekspresije ER-R i PR-R vršena je u skladu sa tzv. jednostavnim bod sistemom preporučenim od strane *Leake* i saradnika (2000), uz

odgovarajuću kontrolu kvaliteta imunohistohemijske reakcije. Određivanje intenziteta imunoreaktivnosti kod ER-R i PR-R vršeno je sabiranjem intenziteta imunoreaktivnosti bojenja i procenta obojenih nukleusa tumorskih ćelija. Maksimalni bod za procenu ekspresije receptora svakog ponaosob (ER-R ili PR-R), koji se dobija sabiranjem boda za procenat imunoreaktivnih jedara i intenziteta imunoreaktivnog bojenja, iznosi 8 (tabela 6). Vrednosti ekspresije ER-R i PR-R označene vrednošću 0 i 2 su smatrane negativnim nalazom, dok je u svim ostalim slučajevima, kada je ekspresija iznosila 3 i više, nalaz smatran pozitivnim <sup>94</sup>.

**Tabela 6.** Određivanje intenziteta imunoreaktivnog bojenja na ER-R i PR-R

Bod za procenu broja imunoreaktivnih jedara	Bod za intenzitet imunoreaktivnog bojenja
1 = manje od 1% obojenih nukleusa	0 = nema nukleusnog bojenja
2 = 1–10% obojenih nukleusa	1 = slab intenzitet nukleusnog bojenja
3 = 11–33% obojenih nukleusa	2 = umeren intenzitet nukleusnog bojenja
4 = 34–66% obojenih nukleusa	3 = veoma intenzivno nukleusno bojenje
5 = 67–100% obojenih nukleusa	

### III.5.3. Semikvantitativna procena nukleusne akumulacije tumor supresorskog proteina p53

Semikvantitativna procena nukleusne akumulacije onkoproteina p53 vršena je na osnovu određivanja procenta imunoreaktivnih jedara tumorskih ćelija. U slučajevima kada je imunohistohemijsko bojenje prisutno u manje od 1% ćelija reakcija se smatra negativnom. Nukleusna akumulacija proteina p53 je prisutna (pozitivna reakcija) ukoliko je protein ekspimiran u više od 1% tumorskih ćelija. Stepenu pozitivne, nukleusne akumulacije proteina p53 procenjivan je u tri stepena: 1-10% tumorskih ćelija ekspirimira p53 što je označavano sa 1, od 10-50% tumorskih ćelija ekspirimira p53 što je označavano sa 2 i preko 50% tumorskih ćelija ekspirimira p53 što je označavano sa 3 <sup>95</sup>.

### III.5.4. Semikvantitativna procena ekspresije proteina Bcl-2

Semikvantitativna procene ekspresije proteina Bcl-2 vršena je na osnovu detektovanja citoplazmatskog bojenja tumorskih ćelija. Pozitivna tj. očuvana ekspresija proteina Bcl-2 zabeležena je u slučajevima kada se protein eksprimirao u opsegu od 1 - 10% tumorskih ćelija (pozitivno bojenje) što je označavano sa 1. Ukoliko je obojeno 10 - 50% tumorskih ćelija nalaz se takođe smatrao pozitivnim, a njegova vrednost je u bod sistemu označena sa 2. Maksimalan stepen ekspresije Bcl-2 proteina označen je sa 3 i zabeležen u slučajevima gde je više od 50% tumorskih ćelija pokazalo izrazito citoplazmatsko bojenje <sup>96</sup>. Kada je obojeno manje od 1% tumorskih ćelija bojenje je smatrano negativnim, tj. postoji redukovana akumulacija ovog proteina <sup>96</sup>.

### **III.5.5. Semikvantitativna procena ekspresije proteina BRCA1**

Semikvantitativna procena ekspresije proteina BRCA1 vršena je određivanjem procenta imunoreaktivnih jedara tumorskih ćelija. Ukoliko je nukleusna ekspresija prisutna u više u 25% tumorskih ćelija smatra se da je BRCA1 eksprimiran (pozitivna reakcija), a ako se imunohistohemijski oboji manje od 25% ćelija, BRCA1 se ne eksprimira (negativna reakcija) <sup>97,98</sup>.

### **III.5.6. Semikvantitativna procena ekspresije proteina TOP2A**

Semikvantitativna procena ekspresije proteina TOP2A vršena je određivanjem procenta imunoreaktivnih tumorskih ćelija. Ukoliko je pozitivna ekspresija prisutna u više u 15% tumorskih ćelija smatra se da je TOP2A proteina pozitivno eksprimiran, a ako se imunohistohemijski oboji manje od 15% tumorskih ćelija, TOP2A se ne eksprimira (negativna reakcija) <sup>99</sup>.

### **III.5.7. Određivanje indeksa proliferacije - Ki67**

Kvantifikacija ćelija koje eksprimiraju Ki67 vršena je kompjuterskim sistemom (Analysis Pro 3.2). Broj ćelija u proliferaciji izražavan je kao indeks proliferacije, a određen je kao broj Ki-67-imunoreaktivnih ćelija na 100 tumorskih ćelija brojanih u tri različite reprezentativne zone tumora. Skala indeksa proliferacije je podeljena na tri

dela, pri čemu se prvi deo odnosi na grupu pacijentkinja kod kojih je imunoreaktivnost na Ki67 zabeležena u manje od 10% ( $< 0.1$ ) nukleusa tumorskih ćelija (vrednost 1), drugi deo se odnosi na one sa nešto većim procentom Ki67 imunoreaktivnih ćelija (od 10-50 % ili 0.1–0.5, vrednost 2), dok su preostale pacijentkinje sa indeksom proliferacije  $\geq 50\%$  ( $\geq 0.5$ ) svrstane u treći deo skale (vrednost 3).

### **III.5.8. Određivanje indeksa apoptoze - ssDNA**

Kvantifikacija ćelija koje se nalaze u procesu apoptoze vršena je kompjuterskim sistemom (Analysis Pro 3.2). Apoptotski indeks je izračunat kao broj apoptotskih ćelija na 1000 tumorskih ćelija, brojanih u tri različite reprezentativne zone tumora. Skala indeksa apoptoze je podeljena na tri dela, pri čemu se prvi deo odnosi na one slučajeve koji su imali nizak apoptotski indeks manji od 0.1 (vrednost 1), središnji deo skale se odnosio na pacijentkinje čiji se apoptotski indeks kretao u rasponu od 0.1-0.5 (vrednost 2) i treći deo, označen vrednošću 3, se odnosio na onu kategoriju pacijentkinja kod kojih je apoptotski indeks bio veći od 0.5<sup>57,68</sup>.

### **III.6. FISH ISPITIVANJA**

Na svim tkivnim uzorcima ispitivanih infiltrativnih karcinoma dojke izvršena su FISH bojenja u cilju dokazivanja prisustva i stepena genske amplifikacije za *HER-2* i *TOP2A*. Primenjeni su komercijalni kitovi za direktnu metodu fluorescentne *in situ* hibridizacije za kvantitativno određivanje amplifikacije gena *HER-2* i *TOP2A* u uzorcima karcinoma dojke fiksiranim u formalinu i ukalupljenim u parafinu. Kitovi su napravljeni u cilju izdvajanja pacijentkinja kod kojih je indikovana upotreba Herceptina i antraciklina.

#### **III.6.1. Princip primenjene FISH metode**

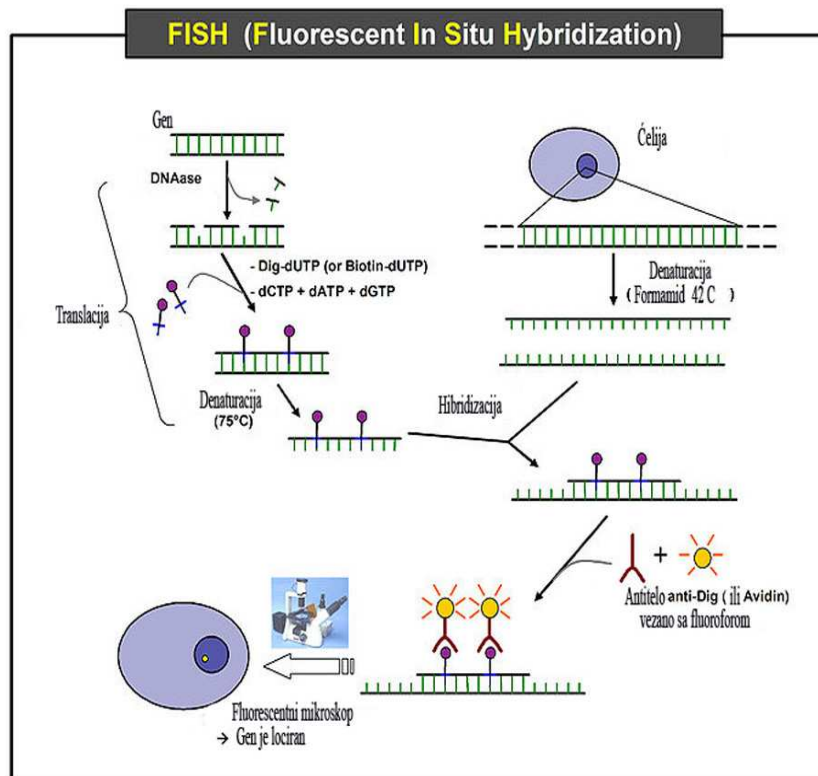
FISH metoda se zasniva na procesu hibridizacije između specifične DNK probe koja sadrži sekvencu komplementarnu genu za *HER-2* i *TOP2A* (shema 5). FISH proba je zasnovana na kombinaciji PNA (engl. *peptide-nucleid acid*, PNA) i DNK. Ova proba sadrži DNK obeleženu taksas-crvenim koja pokriva region od 218 kb koji uključuje gen



*HER-2* na hromozomu 17 i PNA obeležen fluoresceinom koja obeležava centromerični region na hromozomu 17 (CEN-17) (*HER-2 FISH pharmDx<sup>tm</sup> Kit*, Code No. K 5332, DakoCytomation, Danska). Za određivanje genske amplifikacije *TOP2A* gena upotrebljavana je proba koja sadrži DNK obeleženu teksas-crvenim koja pokriva region od 230 kb koji uključuje gen za *TOP2A* na hromozomu 17 i PNA probu obeleženu fluoresceinom koja obeležava centromerični region na hromozomu 17 (CEN-17) (*TOP2A FISH pharmDx<sup>tm</sup> Kit*, Code No. K 5333, DakoCytomation, Danska). Upotrebom fluorescentnog mikroskopa i specijalnih filtera prvo su locirane tumorske ćelije a zatim su prebrojani crveni (*HER-2*, *TOP2A*) i zeleni (CEN 17) signali. Nakon toga određivan je odnos *HER-2/CEN-17* i *TOP2A/CEN-17*. Ukoliko je u ćeliji prisutno više od dve genske kopije na hromozomu broj 17 može se reći da se radi o genskoj amplifikaciji.

### **III.6.2. Protokol primenjene FISH metode**

Nakon deparafinizacije i rehidratacije tkivni uzorci se zagrevaju u rastvoru za pretretman u toku 10 minuta. Sledeća stepenica predstavlja proces proteolitičke digestije upotrebom pepsina, na sobnoj temperaturi u toku 15 minuta. Nakon zagrevanja i proteolitičkog tretmana na preparate se nanosi FISH proba. Specifična hibridizacija na ova dva ciljna mesta dovodi do stvaranja različitih crvenih fluorescentnih signala na svakom lokusu gena *HER-2* i *TOP2A* različitih zelenih fluorescentnih signala na svakoj centromeri hromozoma 17. Da bi se ublažilo nespecifično bojenje probe takođe sadrže neobeležene blokirajuće probe PNA. Nakon primene specijalnog ispiraća preparati se montiraju u medijum za fluorescencu koji sadrži DAPI. Upotrebom fluorescentnog mikroskopa i specijalnih filtera prvo se lociraju tumorske ćelije a zatim se broje crveni (*HER-2* i *TOP2A*) i zeleni (CEN 17) signali. Nakon toga određuje se odnos *HER-2/CEN-17* i *TOP2A/CEN-17* signala. Normalne ćelije u analiziranim tkivnim presecima služe kao unutrašnja pozitivna kontrola za procenu pretretmana i uspešnosti hibridizacije.



Shema 5. Princip FISH metode

### III.6.3. Kvantifikacija signala

Na osnovu H&E bojenja prvo je lokalizovana infiltrativna zona tumorskog tkiva i odabrana su polja za evaluaciju koja su kasnije korišćena za procenjivanje genske amplifikacije na preparatima obojenim FISH metodom. Birano je nekoliko polja sa tumorskim ćelijama zbog eventualne heterogenosti tumora. Brojanje signala je vršeno u 60 nukleusa radi izbegavanja eventualne heterogenosti rezultata.

Nakon toga odnos *HER-2/CEN-17* i *TOP2A/CEN-17* se dobijao podelom ukupnog broja crvenih *HER-2* i *TOP2A* signala sa ukupnim brojem zelenih CEN-17 signala.

U slučajevima kada je odnos između *HER-2/CEN-17* i *TOP2A/CEN-17* procenjen između 0.8 i 1.5 nalaz je smatran nepromenjenim (neamplifikovanim). Oni uzorci kod kojih je odnos *HER-2/CEN-17* i *TOP2A/CEN-17* procenjen između 1.5 do 2 okarakterisani su kao uzorci sa niskim stepenom amplifikacije, dok su oni kod kojih je odnos bio veći od 2 označeni kao uzorci sa visokim stepenom genske amplifikacije.

Ukoliko je odnos *TOP2A/CEN-17* signala bio manji od 0.8 uzorci su označeni kao deletirani, tj. oni kod kojih postoji delecija gena.

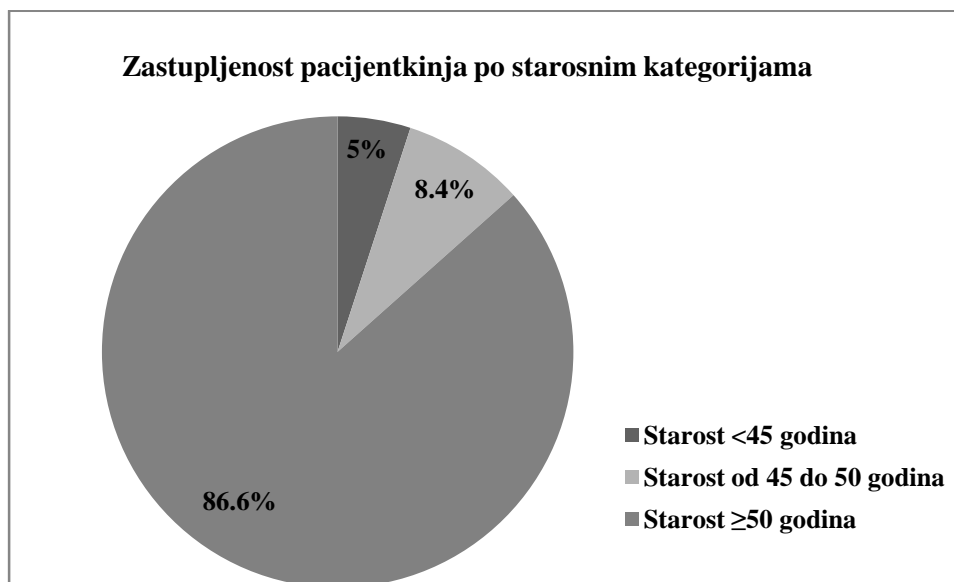
### **III.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA**

Rezultati u tekstu, tabelama i grafikonima prikazani su kao procentualna vrednost pojedinih kategorija u odnosu na ukupan broj ispitanika, kao i srednja vrednost  $\pm$  SD. Poređenje distribucije frekvencija između pojedinih molekularnih grupa vršeno je primenom testa sume rangova tj. Mann–Whitney testom i testom Pearsonove korelacije. Utvrđena su tri nivoa statističke značajnosti:  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  i  $p < 0.001$ . Obrada podataka izvršena je pomoću komercijalnog statističkog softvera (SPSS 10) za računare.

## IV REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### IV.1. REZULTATI KLINIČKIH ISPITIVANJA

Prosečno životno doba ispitanica iznosilo je  $64.79 \pm 21$  godinu. Najmlađa ispitanica bila je stara 38 a najstarija 87 godina. Raspodela ispitanica u odnosu na životno doba, koja uvažava reproduktivni period života (do 45 godina), premenopauzu i menopauzu (od 45-50 godina) i period života posle menopauze (posle 50 godina), data je u grafikonu 2. Najveći broj ispitanica, njih 86.6%, imao je preko 50 godina (52/60). U kategoriji starosti ispitanica između 45-50 godina nalazilo se njih 8.4% (5/60), a u starosnoj kategoriji do 45 godina života nalazilo se 5% ispitanica (3/60).



**Grafikon 2.** Raspodela pacijentkinja prema životnom dobu

#### IV.1.1. Kliničko-patološka ispitivanja karcinoma dojke

Makroskopske i histološke karakteristike tumora prikazane su u tabeli 7. Veličina tumora je bila poznata kod 48 (80%) ispitanica obuhvaćenih ovom studijom, dok za 12 (20%) ispitanica nismo imali podatke o veličini tumora. Najveći broj ispitanica sa infiltrativnim karcinomom dojke obuhvaćenih ovom studijom, 37.5% (18/48), imao je tumor čija je veličina bila ispod 2 cm u prečniku (pT1). Deset ispitanica (20.8%) je imalo tumor veličine između 2 cm i 5 cm (pT2), sedam ispitanica (14.6%)

imalo je tumor veličine preko 5 cm (pT3), dok je tumore koji direktno zahvataju zid grudnog koša ili kožu bilo koje veličine (pT4), imalo 9 ispitanica (18.7%). Tumori dijametra manjeg od 10 mm (minimalni invazivni karcinomi, pT0) registrovani su kod dve ispitanice (4.2%). Takođe, kod dve ispitanice (4.2%) veličinu tumora nije bilo moguće odrediti (pTx).

Najveći broj tumora luminalnog A (9/24, 37.5%) i B (8/26, 30.8%) tipa karcinoma dojke karakterisala je izuzetno mala veličina, svega do 2 cm u dijametru. Tumore trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke karakterisao je prosečno veći dijametar (pT2), i to tumor jedne pacijentkinje trostruko negativnog (25%) i dve pacijentkinje HER-2 pozitivnog tipa (33.3%). Tumore trostruko negativnog tipa karcinoma dojke je takođe karakterisala i direktna invazija zida grudnog koša ili kože a bili su različite veličine (pT4) (3/4, 75%). Slična situacija je zabeležena i u grupi luminalnog B tipa karcinoma dojke u kojoj su tumori četiri pacijentkinje (15.4%) po svojim karakteristikama pripadali ovoj grupi (pT4) (tabela 7).

Poznat histološki gradus imali smo za 48 (80%) tumorskih promena obuhvaćenih ovom studijom. Najveći broj infiltrativnih karcinoma dojke, 52.1% (25/48), imao je umereno diferentovan tumor histološkog gradusa G2, dok su histološki gradus G1 (dobro diferentovan tumor) (6/48, 12.5%) i G3 (slabo diferentovan tumor) (17/48, 35.4%) bili zastupljeni u nešto manjem procentu. Po tri pacijentkinje iz grupe luminalnog A i B tipa karcinoma dojke imalo je dobro diferentovane tumore histološkog gradusa G1, dok je po šest pacijentkinja iz obe grupe imalo slabo diferentovane tumore histološkog gradusa G3. Prosečno najveći broj pacijentkinja iz oba navedena tipa imao je umereno diferentovane tumore histološkog gradusa G2. Trostruko negativni i HER-2 pozitivni tip karcinoma dojke karakterisao se odsustvom dobro diferentovanih tumora histološkog gradusa G1. Od četiri pacijentkinje sa trostruko negativnim tipom karcinoma dojke tri su imale slabo diferentovani tip tumora histološkog gradusa G3 (tabela 7). Četiri pacijentkinje sa HER-2 pozitivnim tipom karcinoma dojke imale su umereno diferentovane tumore histološkog gradusa G2, dok su dve pacijentkinje imale slabo diferentovane tumore histološkog gradusa G3 (tabela 7).

Poznate podatke o prisustvu i stepenu zahvaćenosti aksilarnih limfnih nodusa imali smo za 48 (80%) tumorskih promena. Kod dve ispitanice (2/48, 4.1%), limfni nodusi su bili odstranjeni (pNx). Najveći broj tumora, njih 24 (50%) nije infiltrirao

aksilarne limfne noduse, dok je infiltraciju u ipsilateralnim limfnim nodusima (pN1) kao i infiltraciju u ipsilateralnim limfnim nodusima međusobno povezanim sa drugim strukturama (pN2) imalo po deset ispitanica (tabela 7). Dve pacijentkinje (4.1%) su okarakterisane prisustvom tumorske infiltracije u ipsilateralnim internim limfnim nodusima (pN3). Najveći broj pacijentkinja luminalnog A (50%) i B (38.6%) tipa karcinoma dojke nije karakterisala infiltracija tumorskih ćelija u aksilarne limfne noduse. Kod pacijentkinja trostruko negativnog tipa karcinoma dojke podjednako su bili zastupljeni svi tipovi infiltracije regionalnih limfnih nodusa (tabela 7).

Poznat status o prisustvu udaljenih metastaza odnosio se na 46 (76.7%) pacijentkinja, dok za njih 14 (23.3%) nismo imali podatke. Daleko veći broj ispitanica, njih 39 (84.8%), nije imao prisutne metastaze, kako u trenutku postavljanja dijagnoze, tako i nakon četvorogodišnjeg praćenja. Sedam ispitanica (15.2%) je imalo prisutnu metastazu, od toga je kod tri pacijentkinje tumor metastazirao na pluća, kod dve na jetru dok je kod dve preostale pacijentkinje tumor metastazirao na mozak i kosti (tabela 7). Od ukupno sedam pacijentkinja kod kojih su prisutne metastaze, četiri pacijentkinje su imale karcinom koji je pripadao luminalnom B tipu, dok je po jedna pacijentkinja iz tri preostala molekularna tipa takođe imala zabeleženu metastazu (tabela 7).

Terapijski protokoli koji su primenjivani kod pacijentkinja obuhvaćenih ovom studijom sastojali su se od kombinacije hemoterapijskih agenasa, hormonske terapije, terapije zračenjem i posebnog vida terapije humanizovanim monoklonskim antitelom transtuzumabom tj. Herceptinom koji se primenjivao kod pacijentkinja sa prekomernom ekspresijom HER-2 receptora. Kod većine pacijentkinja luminalnog A i B tipa karcinoma dojke primenjena je kombinacija hemoterapijskih agenasa (AC, CMF), hormonska terapija (tamoksifen, nolvadeks) i terapija zračenjem.

Kombinacija hemoterapijskih agenasa je poslužila i kao osnovni terapijski protokol kod pacijentkinja sa trostruko negativnim i HER-2 pozitivnim tipom karcinoma dojke. Herceptin je primenjen kod šest pacijentkinja iz grupe luminalnog B tipa i kod dve pacijentkinje iz grupe HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke (tabela 7).

Tokom četvorogodišnje studije praćenja od ukupno 60 pacijentkinja, smrtni ishod koji je nastupio kao posledica ove bolesti zabeležen je kod dve pacijentkinje luminalnog A tipa karcinoma dojke (2/24, 8.4%). Preživljavanje bez znakova recidiva

**Tabela 7.** Makroskopske i histološke karakteristike tumora

<b>Kliničko-patološki parametri</b>	<b>Luminalni A tip</b>	<b>Luminalni B tip</b>	<b>Trostruko negativni tip</b>	<b>HER-2 pozitivni tip</b>
<b><i>Veličina tumora</i></b>				
pTx	0	2 (7.7%)	0	0
pT0	1 (4.2%)	1 (3.8%)	0	0
pT1	9 (37.5%)	8 (30.8%)	0	1 (16.68%)
pT2	5 (20.8%)	2 (7.7%)	1 (25%)	2 (33.3%)
pT3	2 (8.3%)	4 (15.4%)	0	1 (16.68%)
pT4a	0	0	0	0
pT4b	1 (4.2%)	2 (7.7%)	2 (50%)	1 (16.68%)
pT4c	0	2 (7.7%)	1 (25%)	0
Nepoznata	6 (25%)	5 (19.2%)	0	1 (16.68%)
<b><i>Histološki gradus</i></b>				
G1	3 (12.5%)	3 (11.5%)	0	0
G2	9 (37.5%)	11 (42.3%)	1 (25%)	4 (66.7%)
G3	6 (25%)	6 (23.1%)	3 (75%)	2 (33.3%)
Nepoznat	6 (25%)	6 (23.1%)	0	
<b><i>Zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa</i></b>				
Nx	0	2 (7.7%)	0	0
N0	12 (50%)	10 (38.6%)	1 (25%)	1 (16.68%)
N1	4 (16.7%)	3 (11.5%)	1 (25%)	2 (33.3%)
N2	2 (8.3%)	5 (19.2%)	1 (25%)	2 (33.3%)
N3	0	1 (3.8%)	1 (25%)	0
Nepoznata	6 (25%)	5 (19.2%)	0	1 (16.68%)
<b><i>Prisustvo metastaze</i></b>				
Mx	0	0	0	0
M0	17 (70.8%)	16 (61.5 %)	3 (75 %)	3 (50 %)
M1	1 (4.2%)	4 (15.4 %)	1 (25 %)	1 (16.7 %)
Nepoznato	6 (25%)	6 (23.1%)	0	2 (33.3%)
<b><i>Preživljavanje</i></b>				
Bez recidiva	17 (70.8%)	16 (61.5%)	3 (75%)	3 (50%)
Metastaza	1 (4.2%)	4 (15.4%)	1 (25%)	1 (16.7%)
Smrtni ishod	2 (8.4%)	0	0	0
Nepoznato	4 (16.6%)	6 (23.1%)	0	2 (33.3%)
<b><i>Hemoterapija</i></b>				
Da	17 (70.8%)	18 (69.2%)	4 (100%)	6 (100%)
Ne	4 (16.7%)	4 (15.4%)	0	0
Nepoznato	3 (12.5%)	4 (15.4%)	0	0
<b><i>Tamoksifen (Nolvadex)</i></b>				
Da	20 (83.4%)	19 (73.1%)	0	1 (16.7%)
Ne	1 (4.2%)	3 (11.5%)	0	5 (83.3%)
Nepoznato	3 (12.5%)	4 (15.4%)	0	0
<b><i>Terapija zračenjem</i></b>				
Da	5 (20.8%)	3 (11.5%)	2 (50%)	1 (16.7%)
Ne	16 (66.7%)	19 (73.1%)	2 (50%)	5 (83.3%)
Nepoznato	3 (12.5%)	4 (15.4%)	0	0
<b><i>Heceptin/Transtuzumab</i></b>				
Da	0	6 (23.1%)	0	2 (33.3%)
Ne	21 (87.5%)	16 (61.5%)	0	4 (66.7%)
Nepoznato	3 (12.5%)	4 (15.4%)	0	0

bolesti zabeleženo je kod 39 ispitanica (65%) i to 17 ispitanica luminalnog A, 16 luminalnog B i po tri ispitanice trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog tipa (tabela 7). 16 ispitanica sa luminalnim B tipom karcinoma dojke imalo je uredan nalaz bez znakova recidiva ili pojave metastaze, dok je kod jedne pacijentkinje detektovana suspektna osteoliza, kod druge metastaza u jetri i kod dve su metastaze prisutne u plućima. Metastaza je detektovana kod jedne ispitanice trostruko negativnog molekularnog tipa i bila je prisutna u plućima. Tri pacijentkinja sa HER-2 pozitivnim tipom karcinoma dojke imale su uredan nalaz bez pojave recidiva ili metastaza, dok je kod jedne ispitanice detektovana metastaza.

Vremenski period preživljavanja bez pojave recidiva bolesti je bio najduži kod pacijentkinja iz grupe HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke i iznosio je  $44.8 \pm 10.2$  meseca, dok je najkraći period preživljavanja karakterisao pacijentkinje sa trostruko negativnim tipom karcinoma dojke,  $19.5 \pm 18$  meseci. Pacijentkinje iz grupe luminalnog A i luminalnog B tipa karcinoma dojke karakterisao je približno isti vremenski period preživljavanja koji je iznosio  $36.5 \pm 17$  meseci, odnosno  $32.4 \pm 19$  meseci, respektivno.

## **IV.2. REZULTATI ISPITIVANJA EKSPRESIJE BIOLOŠKIH MARKERA**

Ekspresija bioloških markera kod svih ispitanica kao i njihov odnos između četiri navedena molekularna tipa prikazan je u daljem tekstu.

### **IV.2.1. Rezultati ispitivanja ekspresije ER-R i PR-R**

Pored ekspresije u tumorskom tkivu ER-R i PR-R se ekspimiraju i u normalnom, tumorski nepromenjenom tkivu dojke, uključujući epitelne ćelije duktusa i tubuloalveolarnih žlezda. S obzirom da se ekspresija ER-R i PR-R, procenjena jednostavnim bod sistemom sa 0 i 2 smatra negativnom, na osnovu naših rezultata proizilazi da je pozitivna ekspresija ER-R prisutna kod 83.4% karcinoma dojke, a pozitivna ekspresija PR-R kod 70% karcinoma (tabela 8).

Veliki broj karcinoma, 58.4%, uključenih u ovu studiju, karakterisala je maksimalna ekspresija ER-R procenjena jednostavnim bod sistemom sa 8 (tabela 8). Maksimalna ekspresija PR-R zastupljena je kod 28.3% karcinoma (tabela 8). Statistička



analiza nije pokazala da postoji značajna razlika između nivoa ekspresije ER-R i PR-R receptora između luminalnog A i B tipa karcinoma dojke (grafikoni 3 i 4).

**Tabela 8.** Ekspresija ER-R i PR-R kod svih 60 karcinoma dojke

Stepen ekspresije ER-R i PR-R		Infiltrativni duktalni karcinomi dojke
<b>ER-R</b>		
0		10/60 (16.6%)
2		0/60 (0%)
3		1/60 (1.6%)
4		2/60 (3.4%)
5		3/60 (5%)
6		2/60 (3.3%)
7		7/60 (11.7%)
8		35/60 (58.4%)
<b>PR-R</b>		
0		13/60 (21.6%)
2		5/60 (8.4%)
3		1/60 (1.7%)
4		3/60 (5%)
5		7/60 (11.7%)
6		6/60 (10%)
7		8/60 (13.3%)
8		17/60 (28.3%)
<b>ER-R</b>	-	10/60 (16.6%)
	+	50/60 (83.4%)
<b>PR-R</b>	-	18/60 (30%)
	+	42/60 (70%)

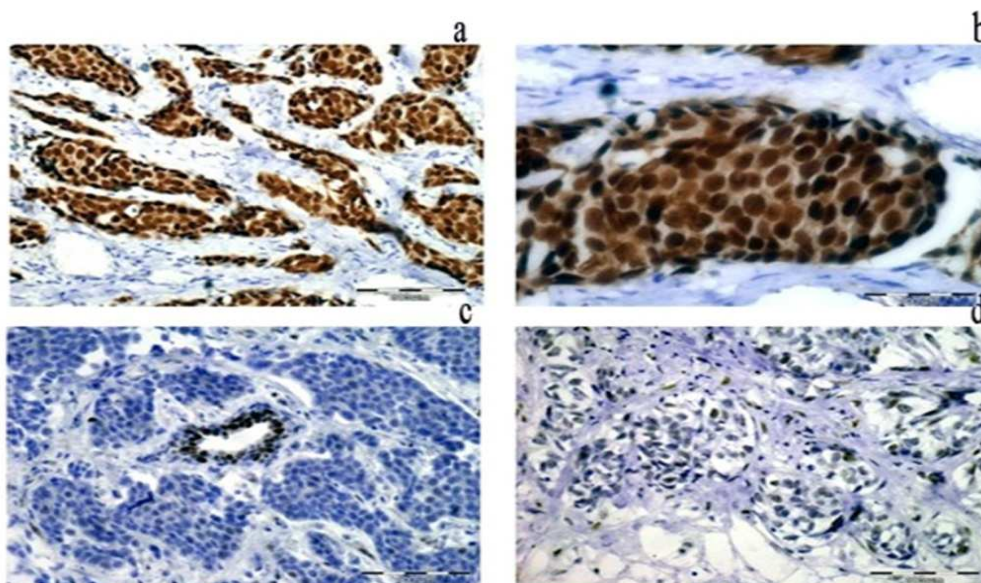
Učestalost pozitivne i negativne ekspresije ER-R i PR-R u tumorima četiri molekularna tipa predstavljena u tabelama 9 i 10.

**Tabela 9.** Raspodela ekspresije ER-R kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

Molekularni tip karcinoma dojke	STEPEN EKSPRESIJE ER-R	
	ER-R <sup>-</sup>	ER-R <sup>+</sup>
Luminalni A tip	0	24 (100%)
Luminalni B tip	0	26 (100%)
Trostruko negativni tip	4 (100%)	0
HER-2 pozitivni tip	6 (100%)	0
Ukupno	10 (16.6%)	50 (83.4%)

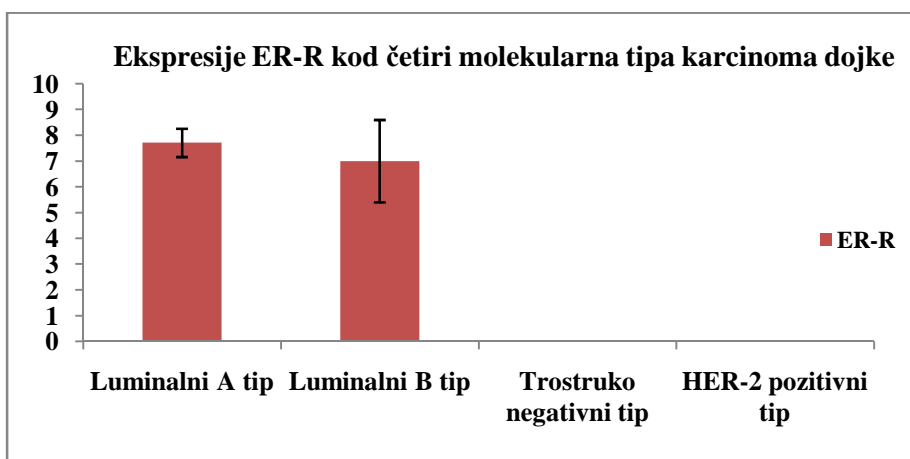
**Tabela 10.** Raspodela ekspresije PR-R kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

Molekularni tip karcinoma dojke	STEPEN EKSPRESIJE PR-R	
	PR-R <sup>-</sup>	PR-R <sup>+</sup>
Luminalni A tip	2 (8.3%)	22 (91.7%)
Luminalni B tip	6 (23.1%)	20 (76.9%)
Trostruko negativni tip	4 (100%)	0
HER-2 pozitivni tip	6 (100%)	0
Ukupno	18 (30%)	42 (70%)

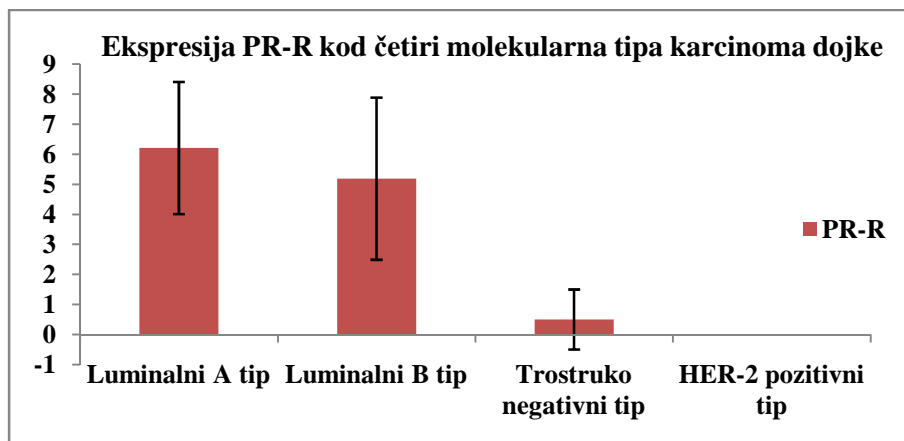


**Slika 1.** Ekspresija ER-R u nukleusima tumorskih ćelija kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke (a, c, d x20; b x40)

a - luminalni A tip karcinoma dojke-izrazito jaka imunoreaktivnost ER-R prisutna u više od 90% nukleusa tumorskih ćelija. b - luminalni B tip karcinoma dojke-izrazito jaka imunoreaktivnost u više od 90% nukleusa tumorskih ćelija. c – ekspresija ER-R u nukleusima duktalnih ćelija dojke-pozitivna unutrašnja kontrola. d – pojedinačne, ER-R pozitivne tumorske ćelije kod HER-2 pozitivnog molekularnog tipa karcinoma dojke.

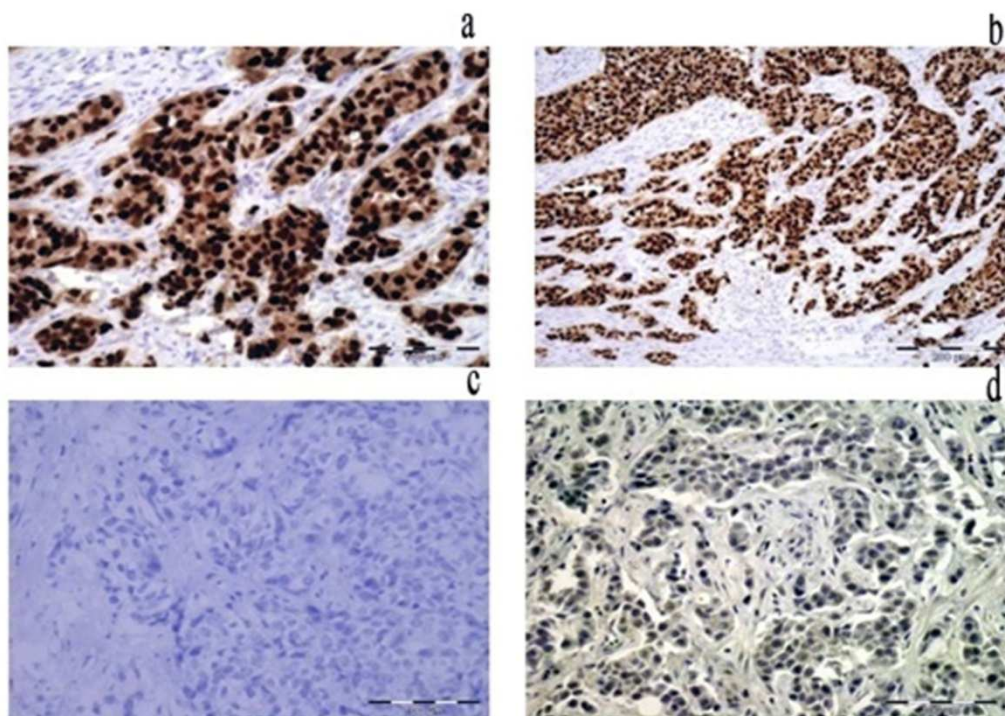


**Grafikon 3.** Ekspresija ER-R kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke



**Grafikon 4.** Ekspresija PR-R kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

Tip ekspresije ER-R i PR-R kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke prikazan je na slikama 1 i 2.

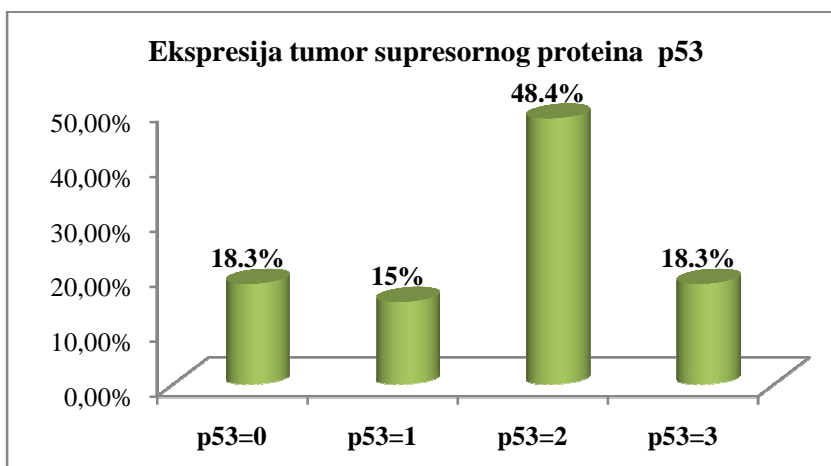


**Slika 2.** Ekspresija PR-R u nukleusima tumorskih ćelija kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke (a, c, d x20; b x10)

a - luminalni A tip karcinoma dojke-izrazito jaka imunoreaktivnost u nukleusima tumorskih ćelija prisutna u više od 90% tumorskih ćelija. b - luminalni B tip karcinoma dojke-izrazito jaka ekspresija PR-R u više od 90% nukleusa tumorskih ćelija. c – potpuno odsustvo ekspresije PR-R kod pacijentkinje sa trostruko negativnim molekularnim tipom karcinoma dojke. d – pojedinačne, PR-R pozitivne tumorske ćelije kod HER-2 pozitivnog molekularnog tipa karcinoma dojke.

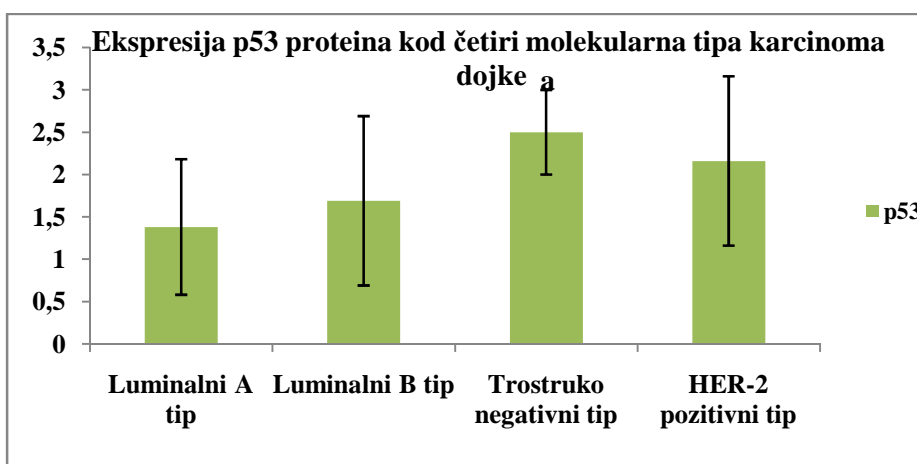
#### IV.2.2. Rezultati ispitivanja ekspresije tumor supresornog proteina p53

Prisutna akumulacija tumor supresornog proteina p53 (pozitivna ekspresija) registrovana je kod 81.7% tumorskih promena ispitanica sa infiltrativnim karcinomima dojke. Najniži stepen pozitivne ekspresije 1 (1-10% tumorskih ćelija ekspirimira p53) registrovan je kod 15% karcinoma, dok je veći stepen ekspresije 2 (10-50% tumorskih ćelija akumulira p53) zabeležen kod 48.4% tumorskih promena (grafikon 5). Najveći stepen ekspresije, obeležen sa 3, zastupljen je kod 18.3% karcinoma dojke.



**Grafikon 5.** Ekspresija tumor supresornog proteina p53

Pozitivna ekspresija tumor supresornog proteina p53 daleko je više zastupljena u tumorskim promenama pacijentkinja trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke u odnosu na luminalne tipove karcinoma dojke.



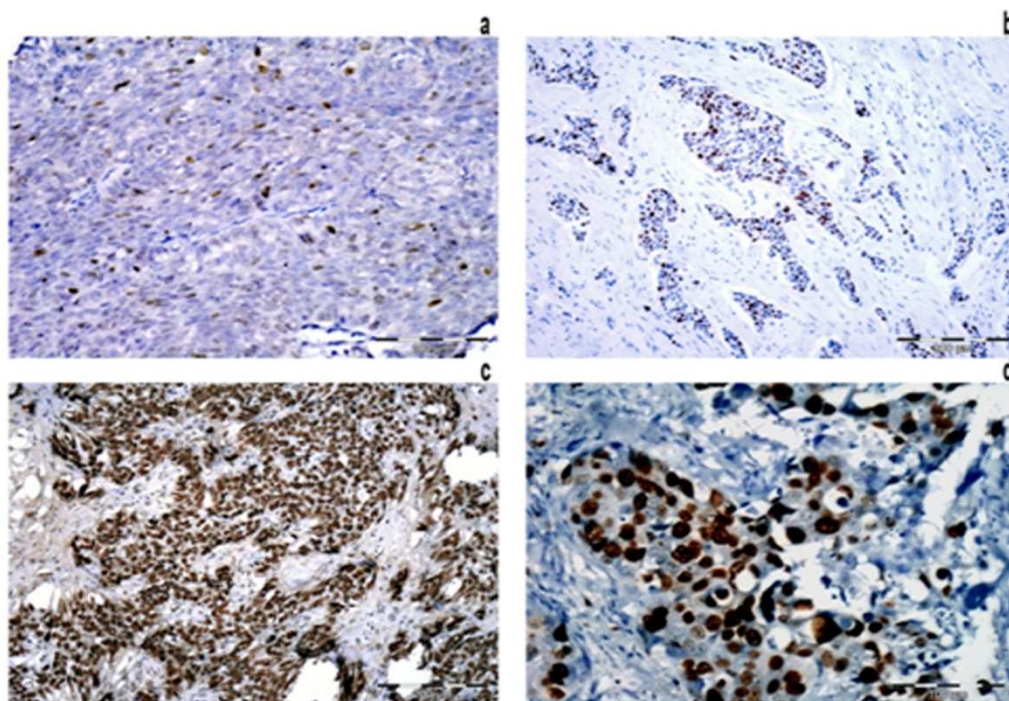
**Grafikon 6.** Ekspresija proteina p53 kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

a - luminalni A i trostruko negativni tip:  $p < 0.05$ .



Prilikom poređenja ekspresije proteina p53 kod različitih molekularnih tipova infiltrativnih karcinoma neparametrijskim Mann–Whitney testom nije uočena statistički značajna razlika između molekularnih tipova karcinoma dojke u akumulaciji ekspresije proteina izražene semikvantitativnim pokazateljima, izuzev u slučaju luminalnog A i trostruko negativnog tipa karcinoma dojke ( $p < 0.05$ ). Naime, uočava se da značajno veću učestalost nukleusne akumulacije onkoproteina p53 srećemo u grupi trostruko negativnih tumora u odnosu na tumorske promene luminalnog A tipa karcinoma dojke i ta razlika je statistički značajna (grafikon 6).

Tkivna ekspresija tumor supresornog proteina p53 kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke prikazana je na slici 3.



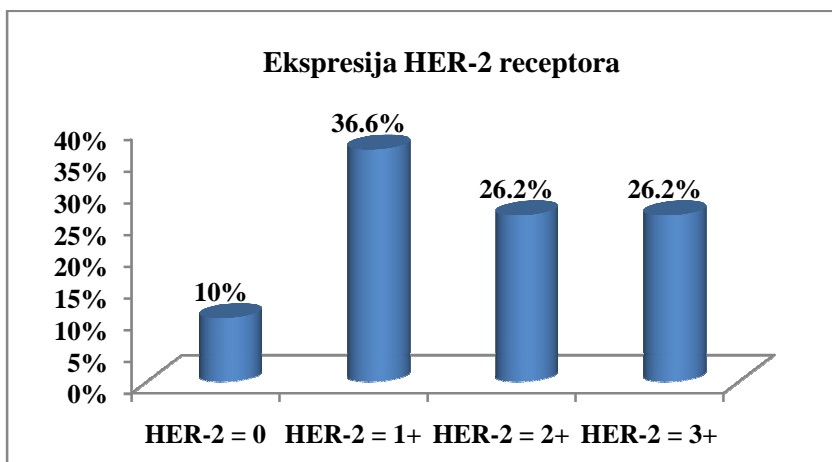
**Slika 3.** Ekspresija tumor supresornog proteina p53 u nukleusima tumorskih ćelija kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke (a, c x20; b x10; d x40)

a, b - nukleusna akumulacija proteina p53 u tumorskim ćelijama luminalnog A (a) i luminalnog B (b) tipa karcinoma dojke. c, d - izrazito jako imunoreaktivno bojenje prisutno u nukleusima tumorskih ćelija trostruko negativnog tipa (c) i HER-2 pozitivnog tipa (d) karcinoma dojke.

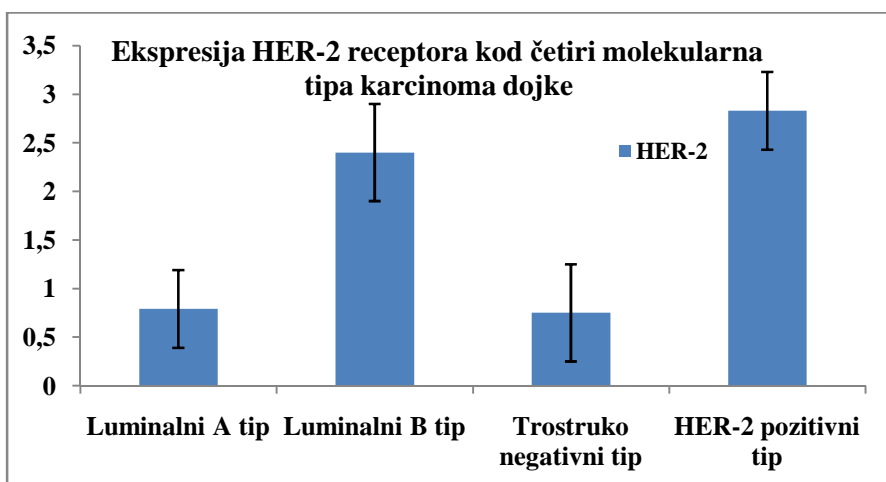
#### IV.2.3. Rezultati ekspresije receptora HER-2

Pozitivna ekspresija proteina HER-2, procenjena semikvantitativno bod sistemom 2 i 3, registrovana je kod 52.4% infiltrativnih karcinoma dojke, pri čemu je

podjednak broj bio zastupljen u obe grupe (16/60, 26.2%), grafikon 7. Negativna ekspresija proteinskog receptora HER-2 označena bod sistemom 1 prisutna je u 22/60 (36.6%) tumorske promene, dok je potpuno odsustvo ekspresije zabeleženo kod 6/60 (10%) karcinoma dojke.

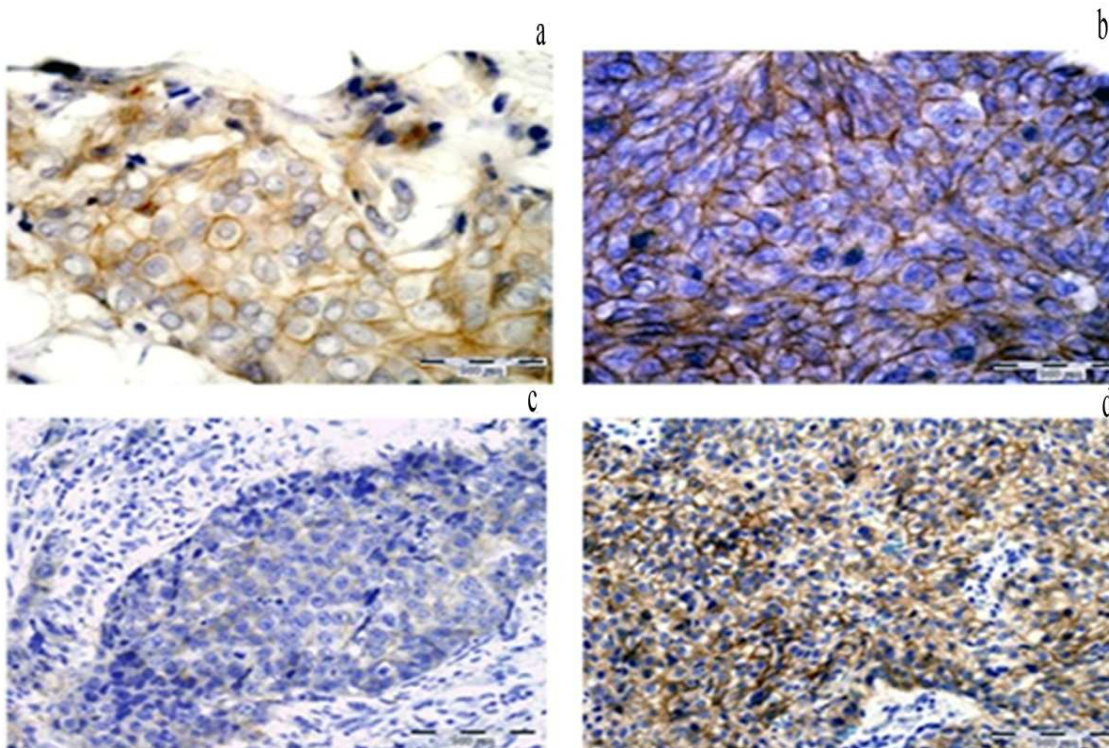


**Grafikon 7.** Ekspresija HER-2 receptora



**Grafikon 8.** Ekspresija HER-2 receptora kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

Tip ekspresije HER-2 receptora kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke prikazan je na slici 4.



**Slika 4.** Ekspresija receptora HER-2 na membranama tumorskih ćelija kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke (a, b x40; c, d x20)

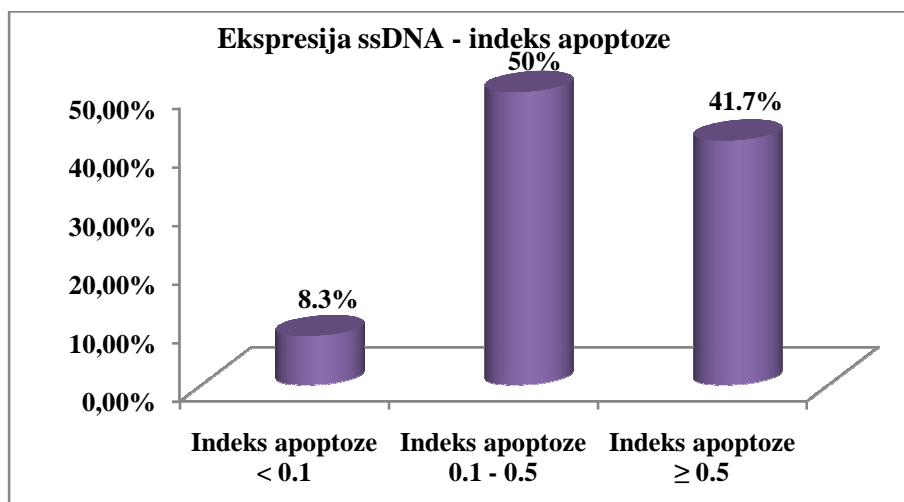
a – slabo, nekompletno membransko bojenje prisutno u manje od 30% tumorskih ćelija luminalnog A tipa karcinoma dojke. b - izrazito jako, kompletno membransko bojenje prisutno u više od 30% tumorskih ćelija, kod luminalnog B (b) tipa karcinoma dojke. c - slabo, nekompletno, membransko bojenje prisutno u manje od 30% tumorskih ćelija kod trostruko negativnog tipa karcinoma dojke. d - kompletno membransko bojenje, izrazito velikog intenziteta, prisutno u više od 90% tumorskih ćelija kod HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke.

Pozitivna ekspresija HER-2 receptora karakterisala je tumorske promene svih pacijentkinja sa luminalnim B i HER-2 pozitivnim tipom karcinoma dojke, dok su tumorske promene svih ispitanica iz grupe luminalnog A i trostruko negativnog tipa imale negativnu ekspresiju ovog receptora (grafikon 8). S obzirom da je nivo ekspresije HER-2 receptora poslužio kao osnovni kriterijum za podelu molekularnih tipova karcinoma dojke statistička analiza nije primenjena u odnosu na različite molekularne tipova karcinoma dojke.

#### IV.2.4. Rezultati ispitivanja indeksa apoptoze - ssDNA

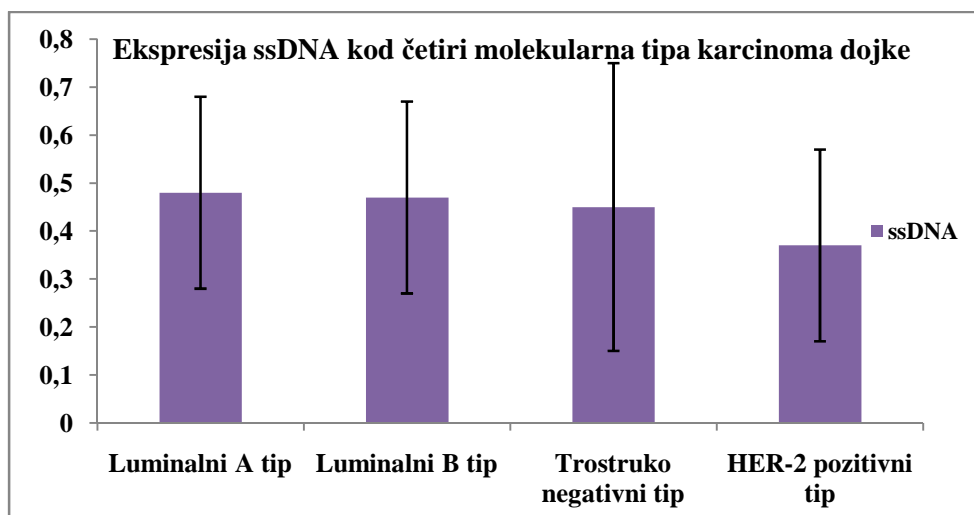
Indeks apoptoze procenjivan po bod sistemu u tri kategorije ( $< 0.1$ ;  $0.1-0.5$ ;  $\geq 0.5$ ) prikazan je na grafikonu 9. Rezultati naše studije su pokazali da se umereno izražena vrednost indeksa apoptoze zapaža u 50% infiltrativnih karcinoma dojke (grafikon 9). Skoro isti broj karcinoma (41.7%) imao je i maksimalno izražen indeks apoptoze, dok je daleko manji procenat (8.3%) imao minimalnu vrednost indeksa apoptoze. Statistička analiza primenom Mann–Whitney testa nije pokazala da postoji statistički značajna razlika u apoptotskom indeksu između posmatranih molekularnih tipova karcinoma dojke (grafikon 10).

Međutim, bez obzira na odsustvo statističke značajnosti, karcinomi pacijentkinja sa luminalnim A tipom ( $0.48 \pm 0.2$ ) imali su nešto veću srednju vrednost apoptotskog indeksa u odnosu na karcinome pacijentkinja iz grupe luminalnog B ( $0.46 \pm 0.2$ ), trostruko negativnog ( $0.45 \pm 0.3$ ) i HER-2 pozitivnog ( $0.37 \pm 0.2$ ) tipa karcinoma dojke. Specifičan tip ekspresije ssDNA u tumorskim ćelijama karcinoma dojke kod četiri molekularna tipa prikazan je na slici 5.

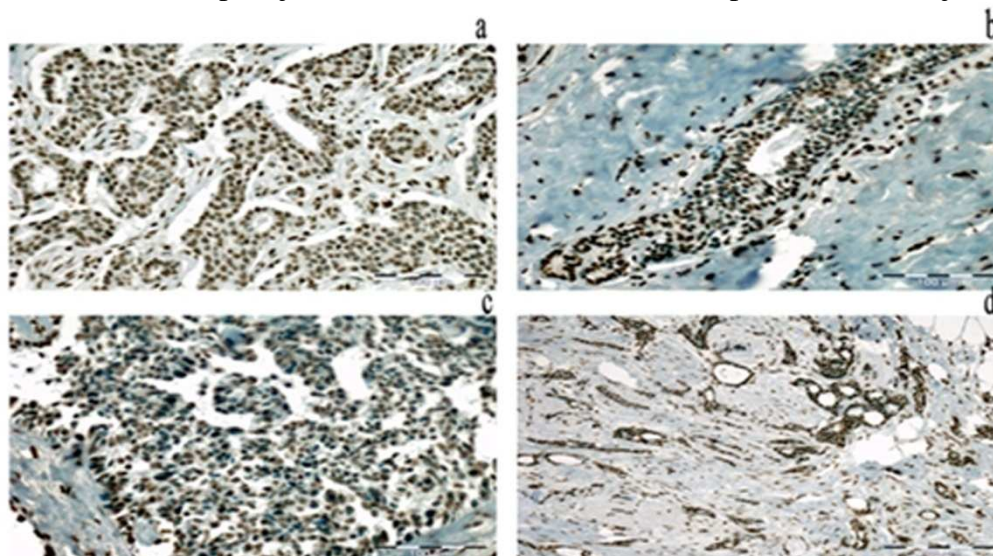


**Grafikon 9.** Ekspresija ssDNA - indeks apoptoze kod infiltrativnog duktalnog karcinoma dojke





**Grafikon 10.** Ekspresija ssDNA kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke



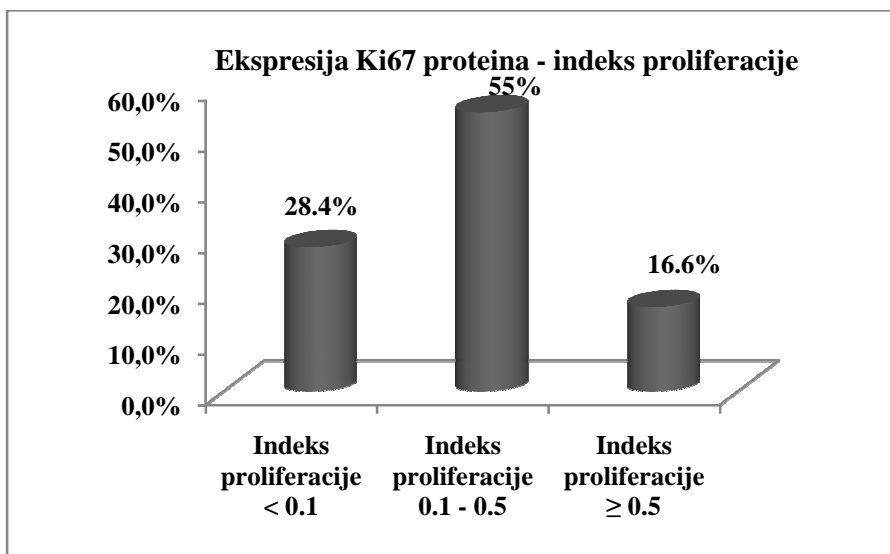
**Slika 5.** Ekspresija ssDNA u tumorskim ćelijama četiri molekularna tipa karcinoma dojke

Izrazito jako nukleusno imunoreaktivno bojenje na ssDNA prisutno u tumorskim ćelijama pacijentkinja četiri molekularna tipa karcinoma dojke. a - najveći broj ssDNA imunoreaktivnih ćelija prisutan je u grupi luminalnog A tipa karcinoma dojke (x20). b - prosečno, nešto manji broj ssDNA imunoreaktivnih ćelija nalazi se u tumorskim ćelijama kod luminalnog B (x20), c - trostruko negativnog (x20) i d - HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke (x10).

#### IV.2.5. Rezultati ispitivanja indeksa proliferacije – Ki67

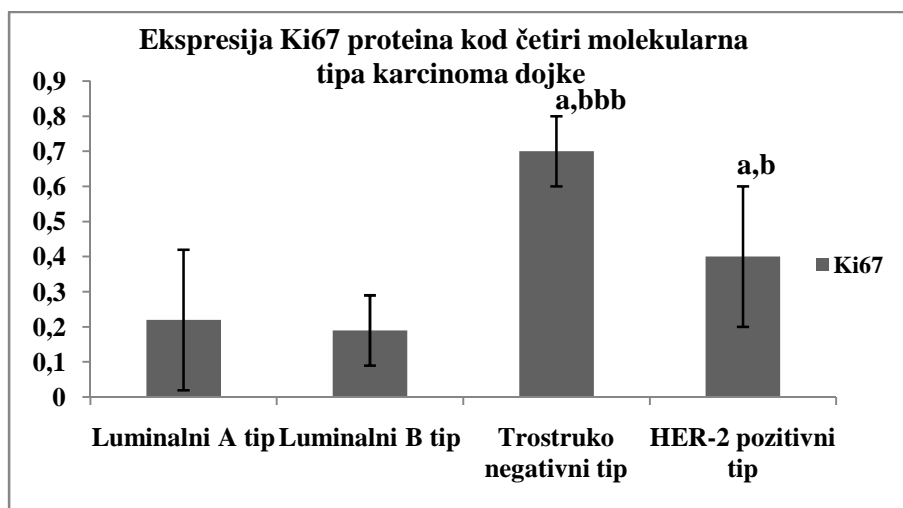
Izrazita nukleusna ekspresija Ki67 proteina registrovana je u 16.6% infiltrativnih karcinoma dojke. Minimalni nivo ekspresije (koji postoji ukoliko 1-10% tumorskih ćelija eksprimira Ki67) registrovan je u 28.4% karcinoma, dok je umeren stepen

ekspresije (kada 10-50% tumorskih ćelija akumulira Ki67) zabeležen u 55% tumorskih promena ([grafikon 11](#)).



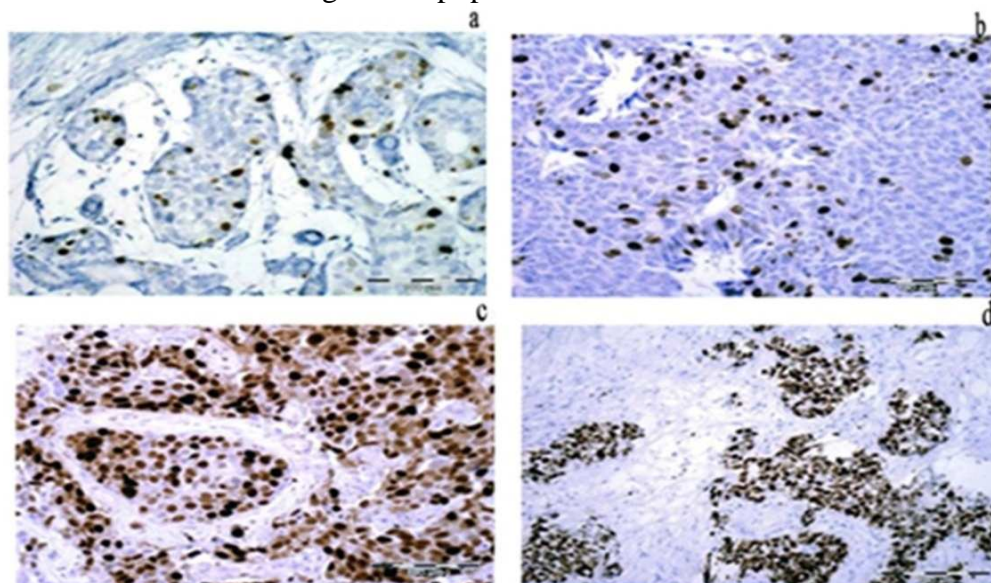
**Grafikon 11.** Ekspresija Ki67 proteina - indeks proliferacije kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke

Kada se uporedi ekspresija proteina Ki67 kod različitih molekularnih tipova karcinoma dojke obuhvaćenih ovom studijom, Mann–Whitney statističkim testom uočena je statistički značajna razlika u nivoima ekspresije između navedenih molekularnih tipova ([grafikon 12](#)). Tumore trostruko negativnog tipa odlikovao je visoko statistički značajno veći indeks proliferacije u odnosu na tumorske promene luminalnog B tipa ( $p < 0.001$ ). Takođe, statistički značajno veći indeks proliferacije karakterisao je tumore trostruko negativnog u odnosu na tumore luminalnog A tipa karcinoma dojke ( $p < 0.05$ ). Tumorske promene HER-2 pozitivnog tipa takođe je odlikovao statistički značajno veći indeks proliferacije u odnosu na tumore luminalnog A ( $p < 0.05$ ) i luminalnog B tipa ( $p < 0.05$ ) ([grafikon 12](#)). Tip ekspresije proteina Ki67 kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke prikazan je na [slici 6](#).



**Grafikon 12.** Ekspresija Ki67 proteina-indeks proliferacije kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

a - luminalni A i trostruko negativni tip:  $p < 0.05$ ; a - luminalni A i HER-2 pozitivni tip:  $p < 0.05$ ; b - luminalni B i HER-2 pozitivni tip:  $p < 0.05$ ; bbb - luminalni B i trostruko negativni tip:  $p < 0.001$

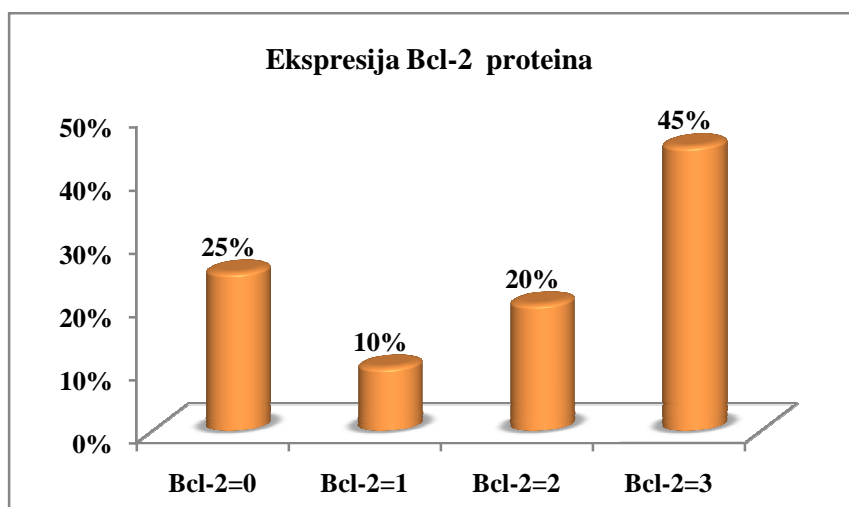


**Slika 6.** Ekspresija proteina Ki67 u nukleusima tumorskih ćelija kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke (a, b, c x20; d x10)

a - imunoreaktivno bojenje na Ki67 u karcinomu pacijentkinje sa luminalnim A tipom karcinoma dojke, prisutno u nešto manjem broju nukleusa tumorskih ćelija u odnosu na luminalni B tip karcinoma dojke. b - izrazito jako imunoreaktivno bojenja na Ki67 prisutno u nukleusima tumorskih ćelija pacijentkinje sa luminalnim B tipom karcinoma dojke. c, d - intenzivno imunoreaktivno bojenje prisutno u više od 90% nukleusa tumorskih ćelija kod pacijentkinje iz grupe trostruko negativnog (c) tipa karcinoma dojke kao i kod pacijentkinje iz HER-2 pozitivnog tipa (d) karcinoma dojke.

#### IV.2.6. Rezultati ekspresije proteina Bcl-2

Tumore prosečno najvećeg broja ispitanica (27/60, 45%) karakterisao je izrazito visok nivo ekspresije Bcl-2 proteina označen u bod sistemu sa 3. Karcinomi kod kojih je ekspresija proteina Bcl-2 označena sa 2 (12/60, 20%) i 0 (15/60, 25%) bio je približno jednak, dok je najslabiju očuvanu ekspresiju imalo šest (10%) karcinoma. Stepenn ekspresije proteina Bcl-2 u karcinomima svih ispitanica koje je obuhvatila naša studija prikazan je na grafikonu 13.

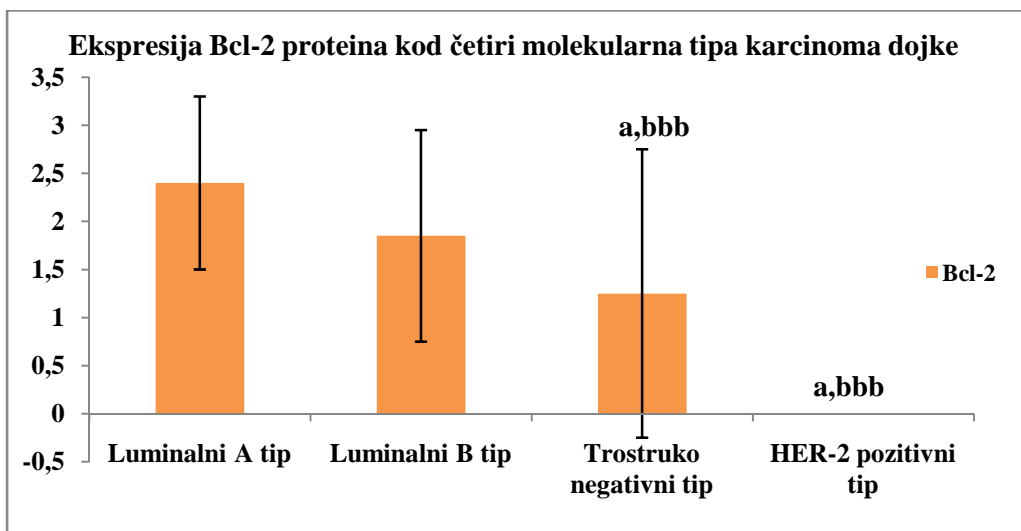


**Grafikon 13.** Ekspresija Bcl-2 proteina kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke

Statističkom analizom ekspresije Bcl-2 proteina kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke uočena je značajna razlika u nivou ekspresije ovog proteina između luminalnog A i B tipa u odnosu na trostruko negativne i HER-2 pozitivne karcinome dojke. Tumorske promene ispitanica iz grupe luminalnog A i B tipa karakterisala je umereno i izrazito očuvana ekspresija proteina Bcl-2, dok su tumorske promene trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke imale uglavnom negativnu ekspresiju proteina Bcl-2 (50% i 100%). Primenom Mann-Whitney testa utvrđen je statistički značajno veći nivo očuvane ekspresije proteina Bcl-2 u luminalnom A tipu karcinoma dojke u odnosu na trostruko negativni ( $p < 0.05$ ), kao i HER-2 pozitivni ( $p < 0.05$ ) tip karcinoma dojke. Visoko statistički značajno veći nivo očuvane ekspresije proteina Bcl-2 odlikovao je tumorske promene luminalnog B tipa



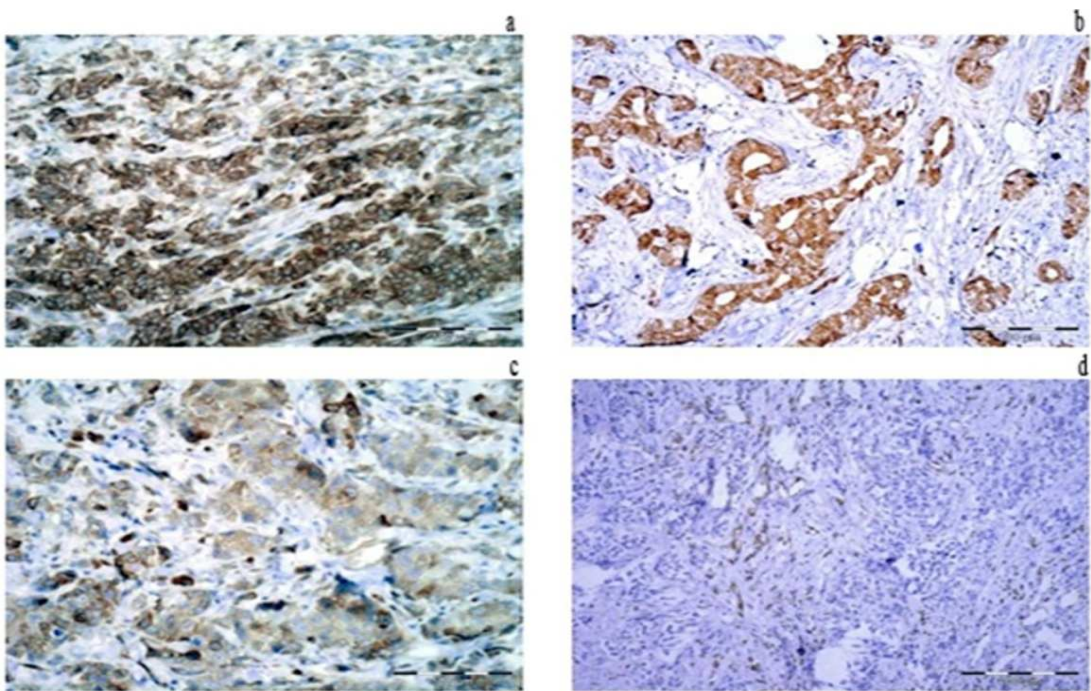
karcinoma dojke kako u odnosu na trostruko negativni ( $p < 0.001$ ), tako i u odnosu na HER-2 pozitivni ( $p < 0.001$ ) tip karcinoma dojke (grafikon 14).



**Grafikon 14.** Ekspresija Bcl-2 proteina kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

a - luminalni A i trostruko negativni tip:  $p < 0.05$ ; a - luminalni A i HER-2 pozitivni tip:  $p < 0.05$ ; bbb - luminalni B i HER-2 pozitivni tip:  $p < 0.001$ ; bbb - luminalni B i trostruko negativni tip:  $p < 0.001$ .

Tumori svih ispitanica HER-2 pozitivnog tipa imali su redukovanu ekspresiju Bcl-2 proteina označenu sa 0. Tip ekspresije Bcl-2 proteina kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke prikazan je na slici 7.

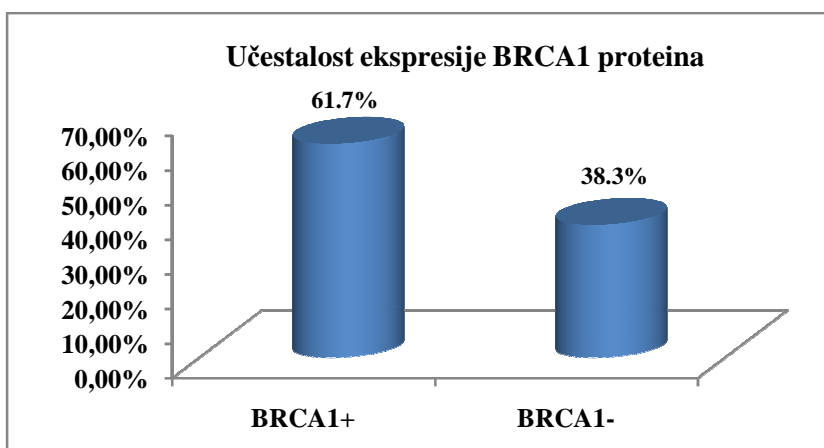


**Slika 7.** Ekspresija Bcl-2 proteina u citoplazmi tumorskih ćelija kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke (a, b, c x20; d x10)

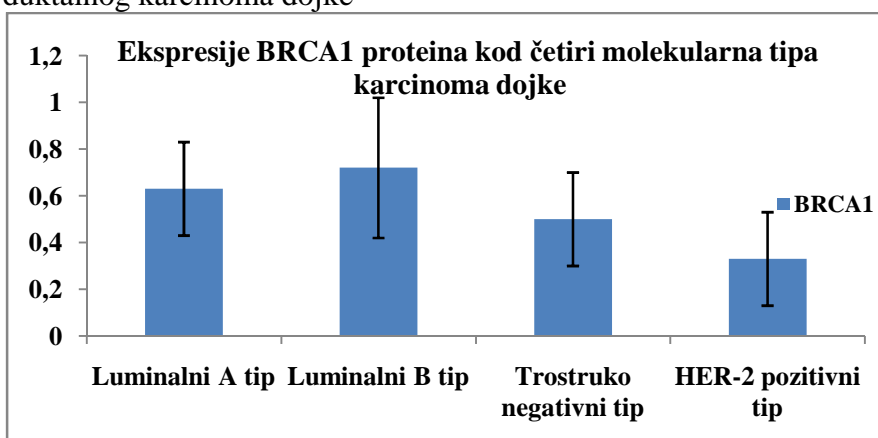
a, b - izrazito citoplazmatsko bojenje proteina Bcl-2 u tumorskim ćelijama luminalnog A (a) i luminalnog B (b) tipa karcinoma dojke. c - slabo imunoreaktivno bojenje Bcl-2 proteina u citoplazmi tumorskih ćelija trostruko negativnih karcinoma dojke. d - potpuno odsustvo pozitivne ekspresije Bcl-2 proteina u tumoru HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke.

#### IV.2.7. Rezultati ekspresije BRCA1 proteina

Pozitivna ekspresija proteina BRCA1 registrovana je kod 37 (61.7%) karcinoma dojke (grafikon 15). U pogledu ekspresije proteina BRCA1, Mann-Whitney testom nije uočena statistički značajna razlika između različitih molekularnih tipova infiltrativnih karcinoma dojke (grafikon 16).

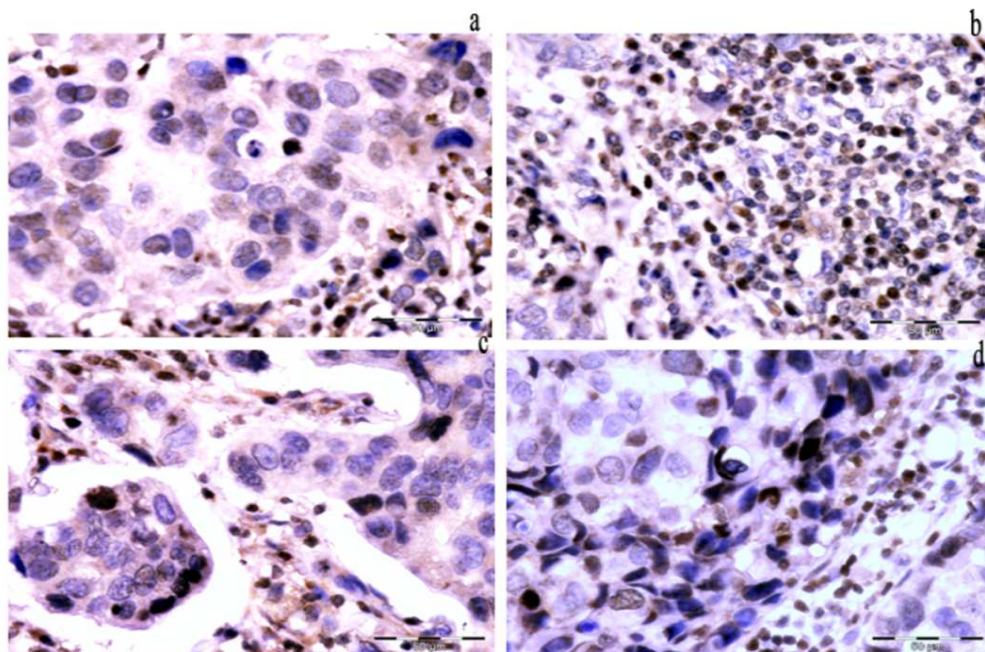


**Grafikon 15.** Učestalost ekspresije BRCA1 proteina kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke



**Grafikon 16.** Ekspresija BRCA1 proteina kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

Specifičan tip ekspresije BRCA1 proteina u tumorskim ćelijama četiri molekularna tipa karcinoma dojke prikazan je na slici 8.

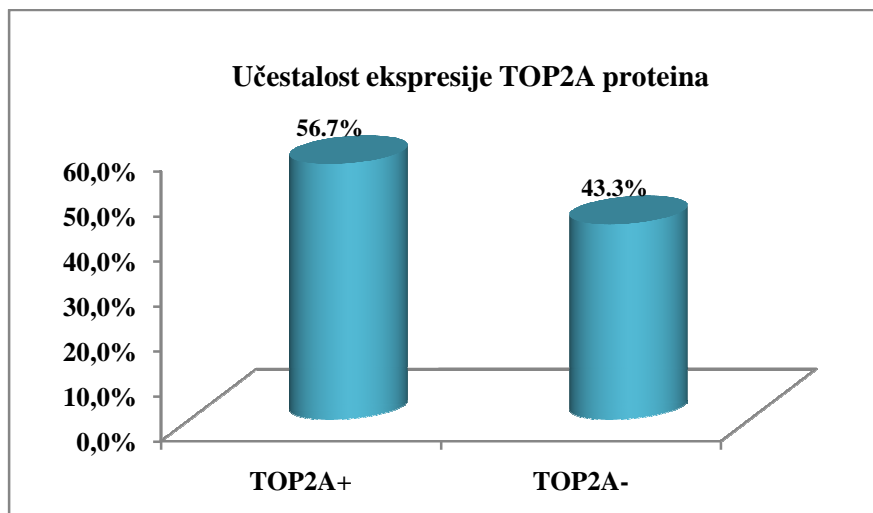


**Slika 8.** Ekspresija BRCA1 proteina u tumorskim ćelijama četiri molekularna tipa karcinoma dojke (a, c, d x40; b x20)

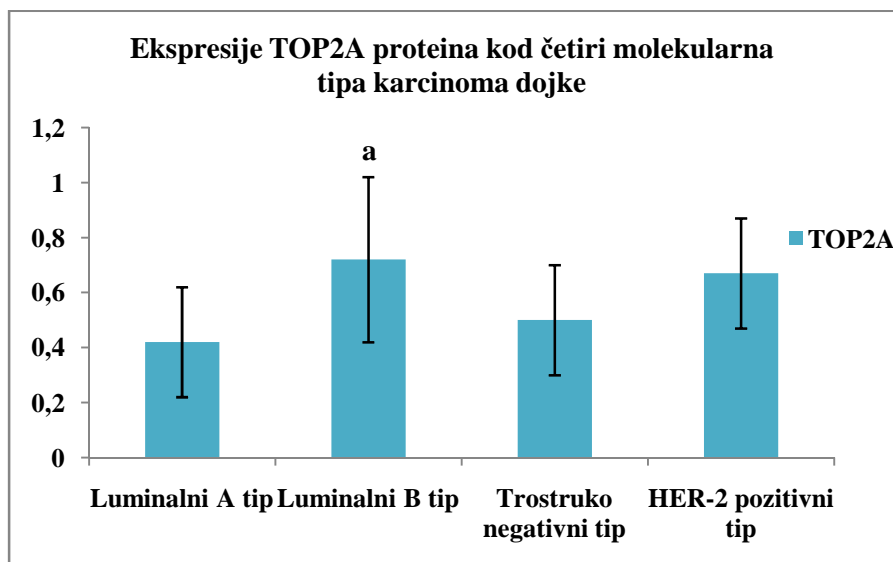
a, b - izrazito jako imunoreaktivno bojenje proteina BRCA1 u tumorskim ćelijama luminalnog A (a) i luminalnog B (b) tipa karcinoma dojke. c - jako imunoreaktivno bojenje BRCA1 proteina u tumorskim ćelijama trostruko negativnog karcinoma dojke. d - pozitivna ekspresije BRCA1 proteina u tumoru HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke.

#### IV.2.8. Rezultati ekspresije TOP2A proteina

Pozitivna ekspresija proteina TOP2A registrovana je kod 34 (56.7%) infiltrativna karcinoma dojke (grafikon 17). U pogledu ekspresije proteina TOP2A, Mann-Whitney testom uočena je statistički značajna razlika između nivoa ekspresija u karcinomima luminalnog A i luminalnog B tipa (grafikon 18). U svim ostalim slučajevima razlika u nivoima ekspresije između različitih molekularnih tipova nije bila statistički značajna. Pozitivna ekspresija proteina TOP2A je registrovana kod 18 karcinoma luminalnog B (18/26, 69.2%), deset tumora luminalnog A tipa (10/24, 41.7%), dva tumora trostruko negativnog (2/4, 50%) i četiri karcinoma HER-2 pozitivnog tipa (4/6, 66.7%).



**Grafikon 17.** Učestalost ekspresije TOP2A proteina kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke

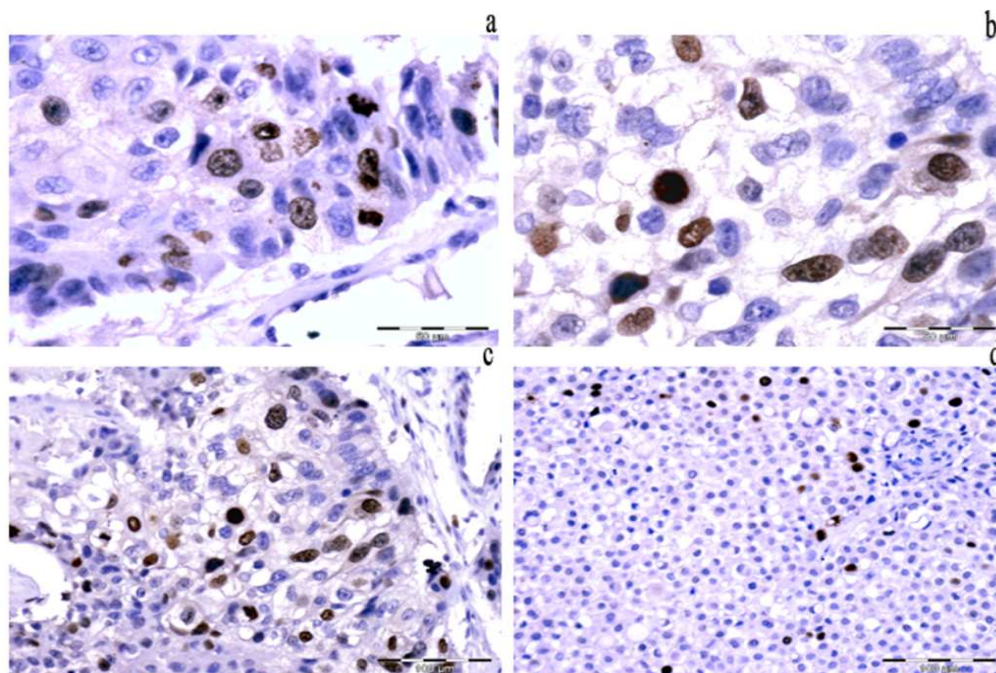


**Grafikon 18.** Ekspresija TOP2A proteina kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

a – luminalni A i luminalni B tip ( $p < 0.05$ )

Specifičan tip ekspresije TOP2A proteina u tumorskim ćelijama četiri molekularna tipa karcinoma dojke prikazan je na [slici 9](#).





**Slika 9.** Ekspresija TOP2A proteina u tumorskim ćelijama četiri molekularna tipa karcinoma dojke (a, b x40; c x20; d x10)

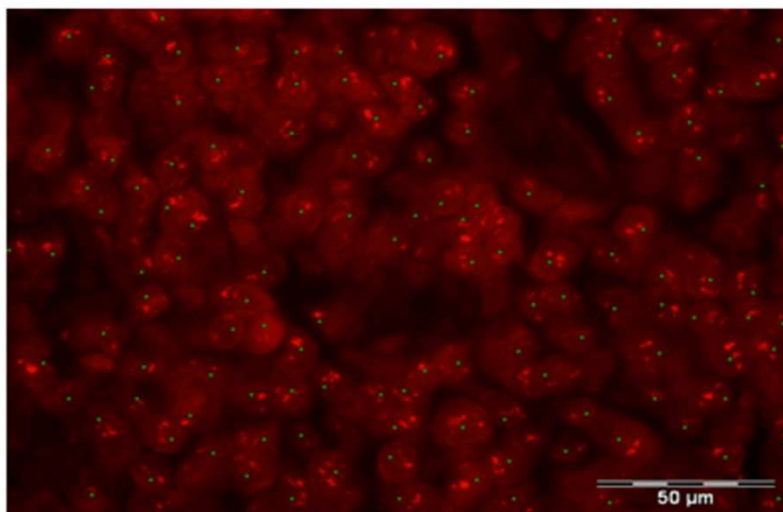
a, b – pozitivno imunoreaktivno bojenje proteina TOP2A u tumorskim ćelijama luminalnog A (a) i luminalnog B (b) tipa karcinoma dojke. c – izrazito jako nukleusno bojenje TOP2A proteina u tumorskim ćelijama trostruko negativnog tipa karcinoma dojke. d - ekspresije TOP2A proteina u tumorskim ćelijama HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke.

#### IV.2.9. Rezultati ispitivanja *HER-2* genskog statusa

Nizak nivo amplifikacije gena koji kodira sintezu HER-2 receptora zabeležen je u sedam tumorskih promena 7/60 (11.7%), dok je visok nivo amplifikacije zabeležen kod 10 tumorskih promena (10/60, 16.6%) (slike 10, 11 i 12). U svim ostalim tumorskim promenama (43/60, 71.7%) zabeležen je nepromenjen nivo ekspresije gena koji kodira sintezu HER-2 receptora.

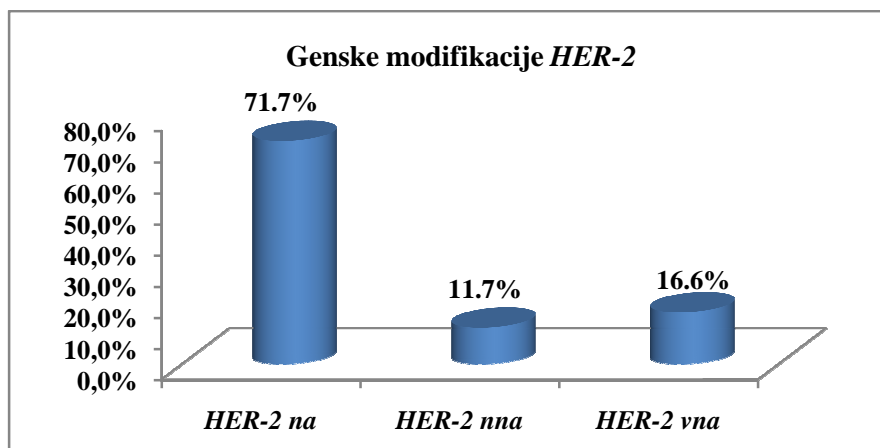
Primenom Mann–Whitney testa potvrđena je visoka statistički značajna razlika u *HER-2* genskom statusu između četiri molekularna tipa karcinoma dojke (grafikon 19). Genski status *HER-2* u tumorima luminalnog A tipa bio je značajno veći u odnosu na *HER-2* genski status karcinoma trostruko negativnog tipa ( $p < 0.05$ ). Visoko statistički značajna razlika karakterisala je odnos između *HER-2* genskog statusa luminalnog A i HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke ( $p < 0.001$ ). Naime, genski status *HER-2* u

tumorima HER-2 pozitivnog tipa bio je značajno veći u odnosu na *HER-2* genski status tumorima luminalnog A tipa ( $p < 0.001$ ).



**Slika 10.** Visok nivo amplifikacije gena *HER-2* ( $\geq 2$ ) kod luminalnog B tipa karcinoma dojke (x 40).

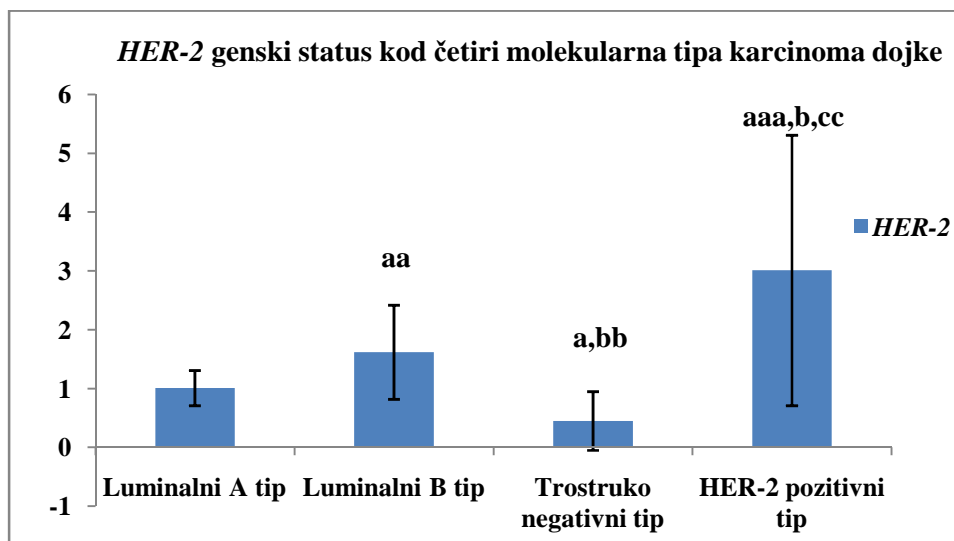
U svakoj pojedinačnoj tumorskoj ćeliji nalazi se između 7 i 20 crvenih signala koji se odnose na broj kopija *HER-2* gena. Broj zelenih signala koji se odnose na centromeričke regione hromozoma 17 na kome se nalazi gen za *HER-2* predstavljen je pojedinačnim signalima (zelenim) u svakoj tumorskoj ćeliji. Odnos između broja crvenih signala *HER-2*, i zelenih signala CEN17, je veći od 2 što demonstrira visoku amplifikaciju *HER-2* gena.



**Grafikon 19.** Genske modifikacije *HER-2* kod infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke

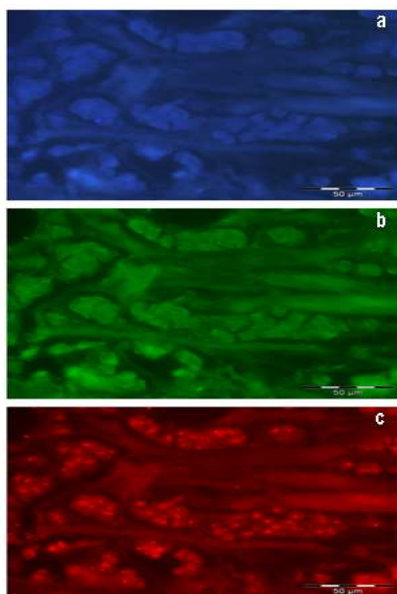
Naime, visok nivo *HER-2* genske amplifikacije predstavlja dominantan način genske modifikacije prisutan u karcinomima *HER-2* pozitivnog tipa (4/6, 66.6%) za razliku od luminalnog A tipa kod koga je uglavnom prisutan neamplifikovan nivo *HER-*

2 gena (23/24, 95.8%). *HER-2* genski status statistički se značajno razlikovao i između karcinoma luminalnog B i trostruko negativnog ( $p < 0.01$ ) odnosno *HER-2* pozitivnog ( $p < 0.05$ ) tipa. U prvom slučaju *HER-2* genski status bio je značajno veći kod tumora luminalnog B tipa u odnosu na trostruko negativni, dok je odnos između luminalnog B i *HER-2* pozitivnog tipa karakterisao veći indeks *HER-2* genskih modifikacija u *HER-2* pozitivnom tipu karcinoma dojke. Genski status *HER-2* značajno je bio veći u *HER-2* pozitivnom u odnosu na trostruko negativni tip karcinoma dojke ( $p < 0.01$ ) (grafikon 20).



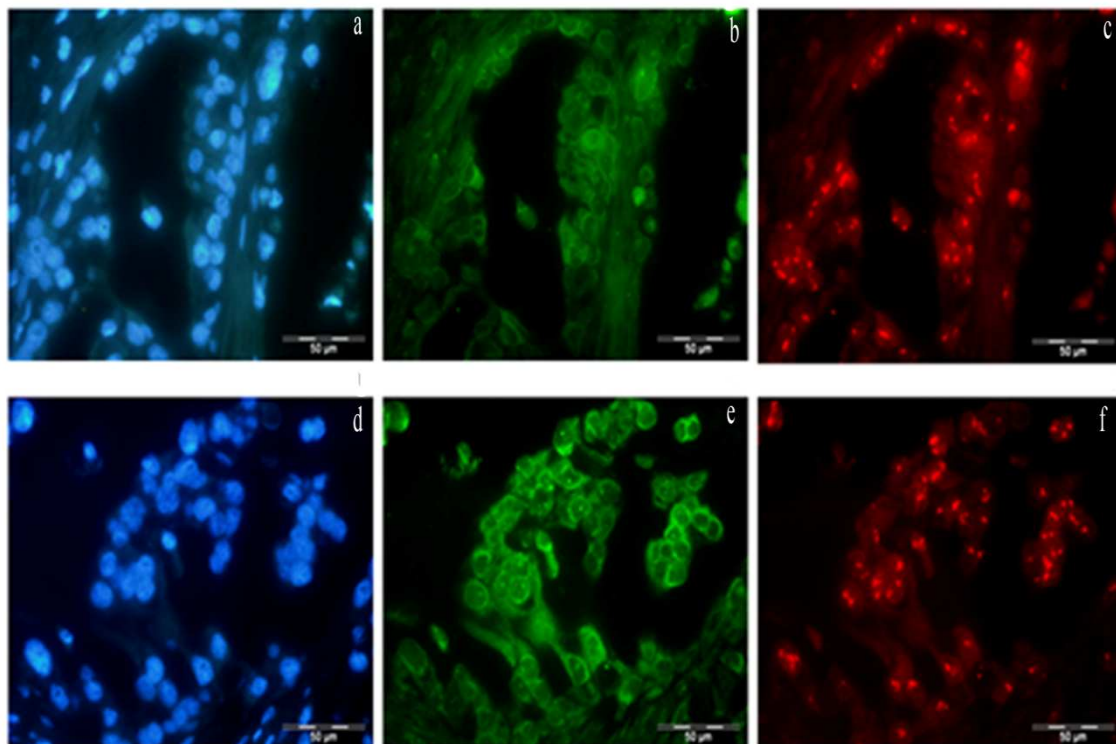
**Grafikon 20.** Genski status *HER-2* kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

aa - luminalni A i luminalni B tip:  $p < 0.01$ ; a - luminalni A i trostruko negativni tip:  $p < 0.05$ ; aaa - luminalni A i *HER-2* pozitivni tip:  $p < 0.001$ ; bb - luminalni B i trostruko negativni tip:  $p < 0.01$ ; b - luminalni B i *HER-2* pozitivni tip:  $p < 0.05$ ; cc - trostruko negativni i *HER-2* pozitivni tip:  $p < 0.01$ .



**Slika 11.** Visok nivo amplifikacije *HER-2* gena u karcinomu dojke *HER-2* pozitivnog tipa koji se odlikuje i prekomernom ekspresijom *HER-2* receptora ( $3^+$ ) (a,b,c x 40)

a – nukleusi tumorskih ćelija detektovani u infiltrativnoj tumorskoj zoni tkiva dojke pomoću DAPI filtera. b – zeleni signali se odnose na centromerične regione hromozoma 17 CEN 17. c – crveni signali se odnose na broj kopija gena *HER-2* obeleženi u crvenom delu fluorescentnog spektra.



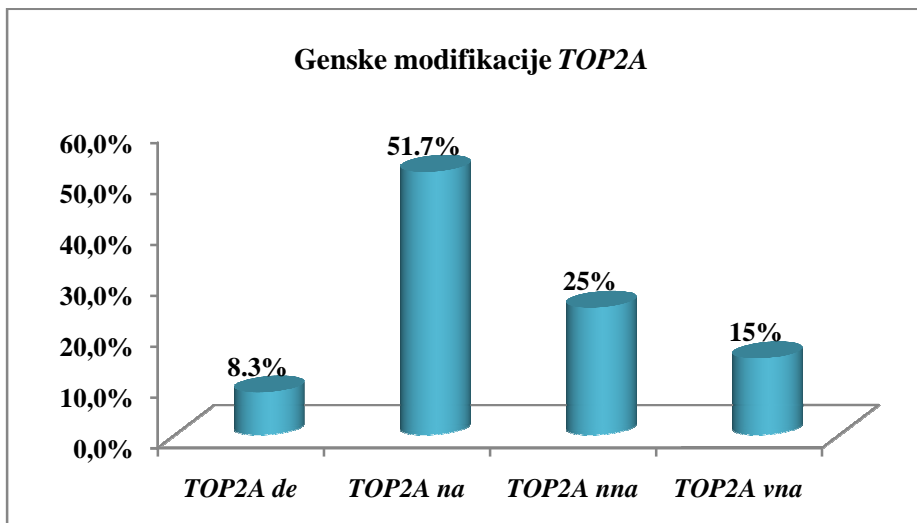
**Slika 12.** Visok nivo amplifikacije gena *HER-2* u luminalnom B tipu karcinoma dojke udružen sa prekomernom ekspresijom *HER-2* receptora (a - f x 40)

a, d – infiltrativne zone tumora čiji su nukleusi obeleženi primenom DAPI filtera koji pokriva plavi deo spektra. b, e – na slikama b i e su prikazani pojedinačni nukleusi sa zelenim fluorescentnim signalima koji označavaju centromere hromozoma 17 na kojima se nalazi gen *HER-2*. c, f – crveni signali na slikama c i f se odnose na broj kopija gena koji kodira sintezu *HER-2* receptora, čiji je broj u ovom slučaju visoko amplifikovan i po jednom nukleusu iznosi i više od 10.

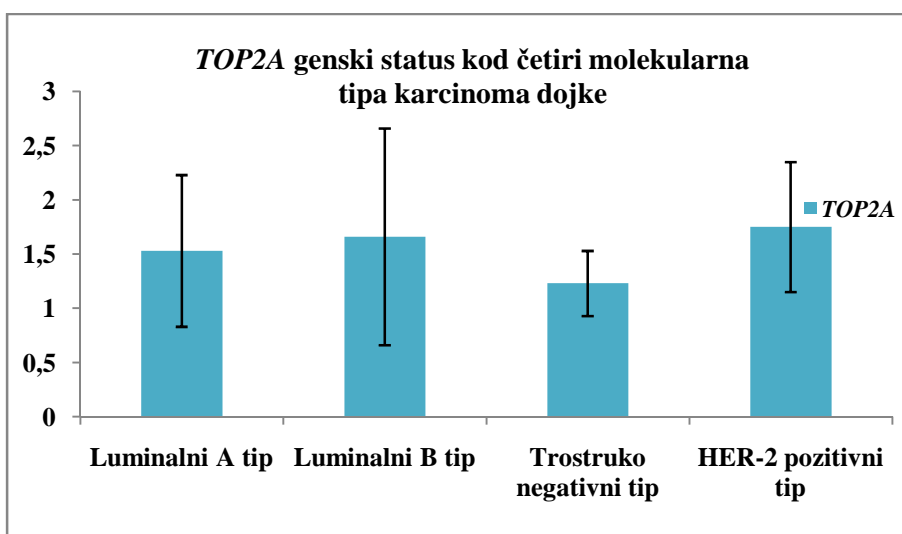
#### IV.2.10. Rezultati praćenja *TOP2A* genskog statusa

Od ukupno 60 uzoraka tumora koje je obuhvatila naša studija kod njih 15 (25%) zabeležen je nizak nivo amplifikacije gena *TOP2A* od 1.5 do 2, dok je visok nivo amplifikacije bio zastupljen kod nešto manjeg broja, 9 (15%). Delecija, kao poseban vid genske modifikacije, zabeležena je u 5 tumorskih promena (8.3%) (grafikon 21). Nemodifikovan status *TOP2A* gena karakterisao je 31 (51.7%) tumorsku promenu

obuhvaćenu ovom studijom. Primenom Mann–Whitney testa nije potvrđena statistički značajna razlika u stepenu genskih aberacija *TOP2A* između četiri molekularna tipa karcinoma dojke (grafikon 22).



**Grafikon 21.** Genske modifikacije *TOP2A* kod infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke

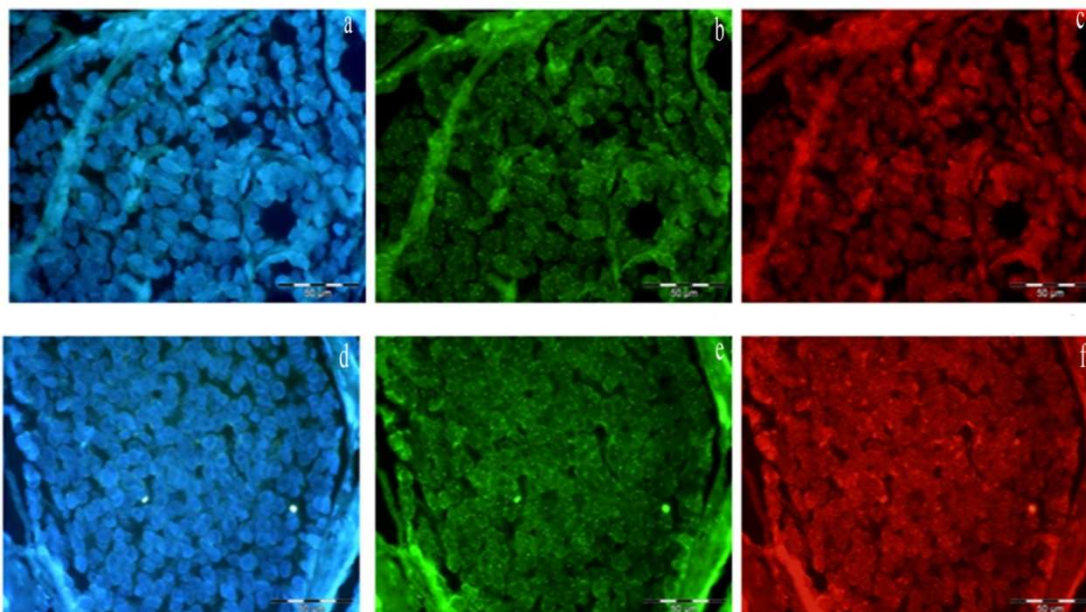


**Grafikon 22.** Genske modifikacije *TOP2A* kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

Genski status *TOP2A* imao je više vrednosti u tumorima luminalnog B i HER-2 pozitivnog tipa u odnosu na genski status luminalnog A i trostruko negativnog tipa (grafikon 22). Ova razlika nije bila statistički značajna. Nepromenjen genski status

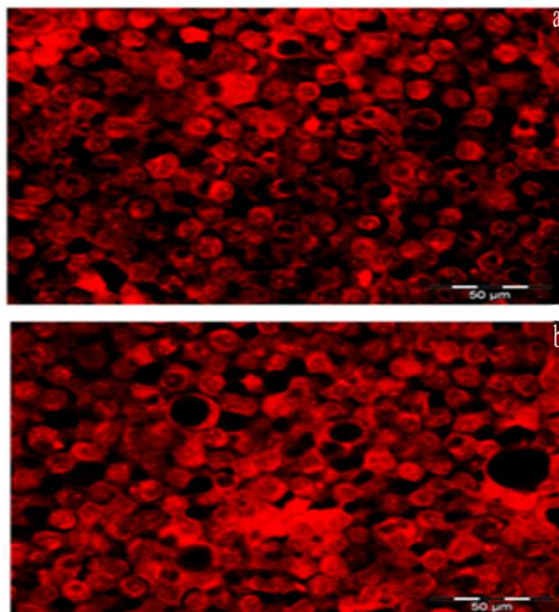


*TOP2A* karakteriše većinu tumora luminalnog A tipa karcinoma dojke (slika 13). Prosečno najveći broj tumorskih promena koje po svojim karakteristikama odgovaraju luminalnom B i HER-2 pozitivnom tipu karcinoma dojke imaju zabeležene genske modifikacije *TOP2A*. Visok nivo amplifikacije *TOP2A* gena u karcinomskom tkivu luminalnog B tipa prikazan je na slici 14.



**Slika 13.** Odsustvo genskih modifikacija *TOP2A* u luminalnom A tipu karcinoma dojke (a - f x 40)

a, d – nukleusi tumorskih ćelija u infiltrativnoj zoni tumorskog tkiva dojke obeleženi u plavom delu spektra (DAPI filter). b, e – u svakom nukleusu se nalazi po jedan ili dva zelena signala koji se odnose na centromerični region hromozoma 17 CEN17. c, f – u prikazanoj infiltrativnoj zoni tumora nalazi se po dva crvena signala koji se odnose na broj gena koji kodiraju sintezu *TOP2A* enzima.



**Slika 14.** Visok nivo amplifikacije gena *TOP2A* u luminalnom B tipu karcinoma dojke (a, b x 40)

a, b – notirati da se u nukleusima tumorskih ćelija nalazi između 5 i 7 signala koji se odnose na broj gena koji kodiraju sintezu TOP2A enzima.

### **IV.3. REZULTATI POREĐENJA EKSPRESIJE BIOLOŠKIH MARKERA KARCINOMA DOJKE SA KLINIČKO - PATOLOŠKIM PARAMETRIMA**

#### **IV.3.1. Ekspresija bioloških markera karcinoma dojke u odnosu na životno doba ispitanica**

Učestalost ekspresije bioloških markera u odnosu na životno doba svih 60 pacijentkinja sa infiltrativnim karcinomom dojke prikazana je u [tabeli 11](#).

Statističkom analizom (Mann-Whitney test) ekspresije pojedinačnih markera u odnosu na starosne kategorije ispitanica nije uočena statistički značajna razlika. U pogledu ekspresije ER-R i PR-R postoji ujednačen odnos različitog stepena ekspresije kod ispitanica u starijoj i mlađoj uzrasnoj kategoriji ([tabela 11](#)). Slična zastupljenost pozitivne ekspresije ispitivanih bioloških markera zapažena je i u slučaju HER-2 receptora, tumor supresornog proteina p53, Bcl-2 proteina, TOP2A enzima, BRCA1 proteina, indeksa proliferacije-Ki67 kao i indeksa apoptoze (AI) ([tabela 11](#)) kod dve starosne kategorije ispitanica. Visok nivo amplifikacije *HER-2* i *TOP2A* gena su bili zastupljeniji u starijoj uzrasnoj kategoriji ispitanica u odnosu na mlađu grupu ispitanica,

dok je nizak nivo amplifikacije oba gena zastupljeniji u grupi ispitanica mlađoj od 50 godina u odnosu na stariju grupu, ali ova razlika nije bila statistički značajna (tabela 11).

**Tabela 11.** Učestalost ekspresije bioloških markera kod 60 karcinoma dojke u odnosu na životno doba ispitanica

BIOLOŠKI MARKERI	60 karcinoma dojke	
	< 50 (N=8/60)	≥50 (N=52/60)
ER-R -(N=10) +(N=50) $\bar{X}$ SD	1/8 (12.5%) 7/7 (87.5%) 6.13 2	9/52 (17.3%) 43/52 (82.7%) 6.11 3
PR-R -(N=18) +(N=42) $\bar{X}$ SD	2/8 (25%) 6/8 (75%) 5.25 3	16/52 (30.8%) 36/52 (69.2%) 4.69 2
HER-2 <sup>-</sup> (0 i 1) (N=28) HER-2 <sup>+</sup> (2 i 3) (N=32) $\bar{X}$ SD	4/8 (50%) 4/8 (50%) 1.75 0.8	24/52 (46.2%) 28/52 (53.8%) 1.69 0.9
p53=0 (N=11) p53=1 (N=9) p53=2 (N=29) p53=3 (N=11) $\bar{X}$ SD	2/8 (25%) 2/8 (25%) 2/8 (25%) 2/8 (25%) 1.5 0.5	9/52 (17.3%) 7/52 (13.5%) 27/52 (51.9%) 9/52 (17.3%) 1.69 0.9
Bcl-2=0 (N=15) Bcl-2=1 (N=6) Bcl-2=2 (N=12) Bcl-2=3 (N=27) $\bar{X}$ SD	0 1/8 (12.5%) 2/8 (25%) 5/8 (62.5%) 2.5 0.7	15/52 (28.8%) 5/52 (9.6%) 10/52 (19.3%) 22/52 (42.3%) 1.75 0.5
Ki67 < 0.1 (N=16) 0.1–0.5 (N=35) ≥ 0.5 (N=9) $\bar{X}$ SD	4/8 (50%) 3/8 (37.5%) 1/8 (12.5%) 0.23 0.1	12/52 (23.1%) 32/52 (61.5%) 8/52 (15.4%) 0.26 0.2
ssDNA < 0.1 (N=5) 0.1–0.5 (N=30) ≥ 0.5 (N=25) $\bar{X}$ SD	0 6/8 (75%) 2/8 (25%) 0.45 0.2	5/52 (9.6%) 24/52 (46.2%) 23/52 (44.2%) 0.46 0.2



BRCA1	-(N=23) +(N=37) $\bar{X}$ SD	3/8 (37.5%) 5/8 (62.5%) 0.63 0.2	20/52 (38.5%) 32/52 (61.5%) 0.62 0.2
TOP2A	-(N=26) +(N=34) $\bar{X}$ SD	3/8 (37.5%) 5/8 (62.5%) 0.63 0.1	23/52 (44.2%) 29/52 (55.8%) 0.54 0.1
HER-2 na HER-2 mna HER-2 vna	(N=43) (N=7) (N=10) $\bar{X}$ SD	6/8 (75%) 2/8 (25%) 0 1.3 0.3	37/52 (71.2%) 5/52 (9.6%) 10/52 (19.2%) 1.5 0.7
TOP2A de TOP2A na TOP2A mna TOP2A vna	(N=5) (N=31) (N=15) (N=9) $\bar{X}$ SD	1/8 (12.5%) 4/8 (50%) 3/8 (37.5%) 0 1.25 0.4	4/52 (7.7%) 27/52 (51.9%) 12/52 (23.1%) 9/52 (17.3%) 1.64 0.8

Kada se uzme u obzir ekspresija bioloških markera kod različitih molekularnih tipova karcinoma dojke takođe nije zabeležena statistički značajna razlika u nivou ekspresije ispitivanih bioloških markera: ER-R, PR-R, HER-2, p53, Bcl-2, Ki67, ssDNA, TOP2A, BRCA1, TOP2A i HER-2 u grupi ispitanica sa luminalnim A ([tabela 12](#)) i luminalnim B ([tabela 13](#)) tipom karcinoma dojke u odnosu na ispitivane starosne kategorije. U grupi ispitanica trostruko negativnog tipa ([tabela 14](#)) samo je jedna ispitanica pripadala mlađoj grupi ispod 50 godina starosti, dok su sve ispitanice HER-2 pozitivnog tipa ([tabela 15](#)) bile starije od 50 godina. Ekspresija Bcl-2 proteina prosečno je veća u grupi ispitanica starijoj od 50 godina u odnosu na mlađu grupu ispitanica luminalnog A tipa karcinoma dojke, ali ova razlika nije statistički značajna ([tabela 12](#)).

**Tabela 12.** Učestalost ekspresije bioloških markera kod luminalnog A tipa karcinoma dojke u odnosu na životno doba ispitanica

BIOLOŠKI MARKERI	Luminalni A tip karcinoma dojke	
	< 50 (N=3/24)	≥50 (N=21/24)
ER-R -(N=0) +(N=24) $\bar{X}$ SD	0 3/3 (100%) 7.33 0.57	0/21 21/21 (100%) 7.76 0.53
PR-R -(N=2) +(N=22) $\bar{X}$ SD	0 3/3 (100%) 6.66 1.52	2/21 (9.5%) 19/21 (90.5%) 6.14 2.39
HER-2 <sup>-</sup> (0 i 1) (N=24) HER-2 <sup>+</sup> (2 i 3) (N=0) $\bar{X}$ SD	3/3 (100%) 0 1 0	21/21 (100%) 0 0.76 0.43
p53=0 (N=5) p53=1 (N=6) p53=2 (N=12) p53=3 (N=1) $\bar{X}$ SD	1/3 (33.33%) 1/3 (33.33%) 1/3 (33.33%) 0 1 0.5	4/21 (19%) 5/21 (23.8%) 11/21 (52.4%) 1/21 (4.8%) 1.43 0.7
Bcl-2=0 (N=2) Bcl-2=1 (N=2) Bcl-2=2 (N=4) Bcl-2=3 (N=16) $\bar{X}$ SD	0 0 1/3 (33.3%) 2/3 (66.7%) 2.67 0.5	2/21 (9.5%) 2/21 (9.5%) 3/21 (14.3%) 14/21 (66.7%) 2.38 0.6
Ki67 < 0.1 (N=10) 0.1–0.5 (N=11) ≥ 0.5 (N=3) $\bar{X}$ SD	2/3 (66.7%) 1/3 (33.3%) 0 0.12 0.09	8/21 (38.1%) 10/21 (47.6%) 3/21 (14.3%) 0.23 0.1
ssDNA < 0.1 (N=3) 0.1–0.5 (N=11) ≥0.5 (N=10) $\bar{X}$ SD	0 2/3 (66.7%) 1/3 (33.3%) 0.47 0.1	3/21 (14.3%) 9/21 (42.89%) 9/21 (42.89%) 0.48 0.3

BRCA1	-(N=9) +(N=15) $\bar{X}$ SD	1/3 (33.3%) 2/3 (66.7%) 0.67 0.1	8/21 (38.1%) 13/21 (61.9%) 0.62 0.4
TOP2A	-(N=14) +(N=10) $\bar{X}$ SD	1/3 (33.3%) 2/3 (66.7%) 0.67 0.1	13/21 (61.9%) 8/21 (38.1%) 0.38 0.1
<i>HER-2</i> na <i>HER-2</i> nna <i>HER-2</i> vna	(N=23) (N=1) (N=0) $\bar{X}$ SD	3/3 (100%) 0 0 1.1 0	20/21 (95.3%) 1/21 (4.7%) 0 1 0.4
<i>TOP2A</i> de <i>TOP2A</i> na <i>TOP2A</i> nna <i>TOP2A</i> vna	(N=1) (N=15) (N=5) (N=3) $\bar{X}$ SD	1/3 (33.33%) 1/3 (33.33%) 1/3 (33.33%) 0 0.47 0.1	0 14/21 (66.7%) 4/21 (19%) 3/21 (14.3%) 1.59 0.7

**Tabela 13.** Učestalost ekspresije bioloških markera kod luminalnog B tipa karcinoma dojke u odnosu na životno doba ispitanica

BIOLOŠKI MARKERI	Luminalni B tip karcinoma dojke	
	< 50 (N=4/26)	≥ 50 (N=22/26)
ER-R -(N=0) +(N=26) $\bar{X}$ SD	0 4/4 (100%) 6.8 1	0/22 22/22 (100%) 7.1 1.5
PR-R -(N=6) +(N=20) $\bar{X}$ SD	1/4 (25%) 3/4 (75%) 5.5 1	5/22 (22.7%) 17/22 (77.3%) 5.14 2.6
HER-2 <sup>-</sup> (0 i 1) (N=0) HER-2 <sup>+</sup> (2 i 3) (N=26) $\bar{X}$ SD	0 4/4 (100%) 2.5 0.5	0 22/22 (100%) 2.4 0.5
p53=0 (N=5) p53=1 (N=3) p53=2 (N=13) p53=3 (N=5) $\bar{X}$ SD	1/4 (25%) 1/4 (25%) 1/4 (25%) 1/4 (25%) 1.5 0.1	4/22 (18.2%) 2/22 (9.1%) 12/22 (54.5%) 4/22 (18.2%) 1.73 0.9
Bcl-2=0 (N=5) Bcl-2=1 (N=4) Bcl-2=2 (N=7) Bcl-2=3 (N=10) $\bar{X}$ SD	0 1/4 (25%) 1/4 (25%) 2/4 (50%) 2.25 0.8	5/22 (22.7%) 3/22 (13.6%) 6/22 (27.3%) 8/22 (36.4%) 1.77 1.1
Ki67 < 0.1 (N=7) 0.1–0.5 (N=17) ≥ 0.5 (N=2) $\bar{X}$ SD	2/4 (50%) 2/4 (50%) 0 0.15 0.04	5/22 (22.7%) 15/22 (68.2%) 2/22 (9.1%) 0.21 0.1
ssDNA < 0.1 (N=1) 0.1–0.5 (N=14) ≥ 0.5 (N=11) $\bar{X}$ SD	0 3/4 (75%) 1/4 (25%) 0.46 0.2	1/22 (4.5%) 11/22 (50%) 10/22 (45.5%) 0.47 0.2

BRCA1	-(N=8) +(N=18) $\bar{X}$ SD	1/4 (25%) 3/4 (75%) 0.75 0.2	7/22 (31.8%) 15/22 (68.2%) 0.68 0.1
TOP2A	-(N=9) +(N=17) $\bar{X}$ SD	1/4 (25%) 3/4 (75%) 0.64 0.1	8/22 (36.4%) 14/22 (63.6%) 0.68 0.1
<i>HER-2</i> na <i>HER-2</i> nna <i>HER-2</i> vna	(N=15) (N=5) (N=6) $\bar{X}$ SD	2/4 (50%) 2/4 (50%) 0 1.5 0.3	13/22 (59.1%) 3/22 (13.6%) 6/22 (27.3%) 1.65 0.8
<i>TOP2A</i> de <i>TOP2A</i> na <i>TOP2A</i> nna <i>TOP2A</i> vna	(N=4) (N=12) (N=6) (N=4) $\bar{X}$ SD	0 2/4 (50%) 2/4 (50%) 0 0.46 0.2	4/22 (18.2%) 10/22 (45.4%) 4/22 (18.2%) 4/22 (18.2%) 1.71 1

**Tabela 14.** Učestalost ekspresije bioloških markera kod trostruko negativnog tipa karcinoma dojke u odnosu na životno doba ispitanica

BIOLOŠKI MARKERI	Trostruko negativni tip karcinoma dojke	
	< 50 (N=1/4)	≥50 (N=3/4)
ER-R -(N=4) +(N=0) $\bar{X}$ SD	1/1 (100%) 0 0 0	3/3 (100%) 0 0 0
PR-R -(N=4) +(N=0) $\bar{X}$ SD	1/1 (100%) 0 0 0	3/3 (100%) 0 0.66 0.2
HER-2 <sup>-</sup> (0 i 1) (N=4) HER-2 <sup>+</sup> (2 i 3) (N=0) $\bar{X}$ SD	1/1 (100%) 0 0 0	3/3 (100%) 0 0.66 0.1
p53=0 (N=0) p53=1 (N=0) p53=2 (N=2) p53=3 (N=2) $\bar{X}$ SD	0 0 0 1/1 (100%) 0 0	0 0 2/3 (66.7%) 1/3 (33.3%) 2.34 0.5
Bcl-2=0 (N=2) Bcl-2=1 (N=0) Bcl-2=2 (N=1) Bcl-2=3 (N=1) $\bar{X}$ SD	0 0 0 1/1 (100%) 0 0	2/3 (66.7%) 0 1/3 (33.3%) 0 0.67 0.1
Ki67 < 0.1 (N=0) 0.1–0.5 (N=0) ≥ 0.5 (N=4) $\bar{X}$ SD	0 0 1/1 (100%) 0 0	0 0 3/3 (100%) 0.63 0.07
ssDNA < 0.1 (N=0) 0.1–0.5 (N=3) ≥ 0.5 (N=1) $\bar{X}$ SD	0 1/1 (100%) 0 0 0	0 2/3 (66.7%) 1/3 (33.3%) 0.48 0.2

BRCA1	-(N=2)	1/1 (100%)	1/3 (33.3%)
	+(N=2)	0	2/3 (66.7%)
	$\bar{X}$	0	0.5
	SD	0	0.1
TOP2A	-(N=2)	1/1 (100%)	1/3 (33.3%)
	+(N=2)	0	2/3 (66.7%)
	$\bar{X}$	0	0.5
	SD	0	0.1
<i>HER-2</i> na	(N=4)	1/1 (100%)	3/3 (100%)
<i>HER-2</i> nna	(N=0)	0	0
<i>HER-2</i> vna	(N=0)	0	0
	$\bar{X}$	0	0.3
	SD	0	0.2
<i>TOP2A</i> de	(N=4)	0	0
<i>TOP2A</i> na	(N=12)	1/1 (100%)	2/3 (66.7%)
<i>TOP2A</i> nna	(N=6)	0	1/3 (33.3%)
<i>TOP2A</i> vna	(N=4)	0	0
	$\bar{X}$	0	1.3
	SD	0	0.4

**Tabela 15.** Učestalost ekspresije bioloških markera kod HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke u odnosu na životno doba ispitanica

BIOLOŠKI MARKERI	HER-2 pozitivni tip karcinoma dojke	
	< 50 (N=0/6)	≥50 (N=6/6)
ER-R -(N=6) +(N=0) $\bar{X}$ SD	0 0 0 0	6/6 (100%) 0 0 0
PR-R -(N=6) +(N=0) $\bar{X}$ SD	0 0 0 0	6/6 (100%) 0 0 0
HER-2 <sup>-</sup> (0 i 1) (N=0) HER-2 <sup>+</sup> (2 i 3) (N=6) $\bar{X}$ SD	0 0 0 0	0 6/6 (100%) 2.83 0.4
p53=0 (N=1) p53=1 (N=0) p53=2 (N=2) p53=3 (N=3) $\bar{X}$ SD	0 0 0 0 0 0	1/6 (16.7%) 0 2/6 (33.3%) 3/6 (50%) 2.12 0.5
Bcl-2=0 (N=6) Bcl-2=1 (N=0) Bcl-2=2 (N=0) Bcl-2=3 (N=0) $\bar{X}$ SD	0 0 0 0 0 0	6/6 (100%) 0 0 0 0 0
Ki67 < 0.1 (N=0) 0.1–0.5 (N=5) ≥ 0.5 (N=1) $\bar{X}$ SD	0 0 0 0 0	0 5/6 (83.3%) 1/6 (16.7%) 0.4 0.2
ssDNA < 0.1 (N=1) 0.1–0.5 (N=2) ≥ 0.5 (N=3) $\bar{X}$ SD	0 0 0 0 0	1/6 (16.7%) 2/6 (33.3%) 3/6 (50%) 0.37 0.2



BRCA1	-(N=4)	0	4/6(66.7%)
	+(N=2)	0	2/6 (33.3%)
	$\bar{X}$	0	0.33
	SD	0	0.1
TOP2A	-(N=2)	0	2/6 (33.3%)
	+(N=4)	0	4/6(66.7%)
	$\bar{X}$	0	0.67
	SD	0	0.1
<i>HER-2</i> na	(N=1)	0	1/6 (16.7%)
<i>HER-2</i> nna	(N=1)	0	1/6 (16.7%)
<i>HER-2</i> vna	(N=4)	0	4/6 (66.6%)
	$\bar{X}$	0	3
	SD	0	1
<i>TOP2A</i> de	(N=0)	0	0
<i>TOP2A</i> na	(N=2)	0	2/6 (33.3%)
<i>TOP2A</i> nna	(N=3)	0	3/6 (50%)
<i>TOP2A</i> vna	(N=1)	0	1/6 (16.7%)
	$\bar{X}$	0	1.75
	SD	0	0.6

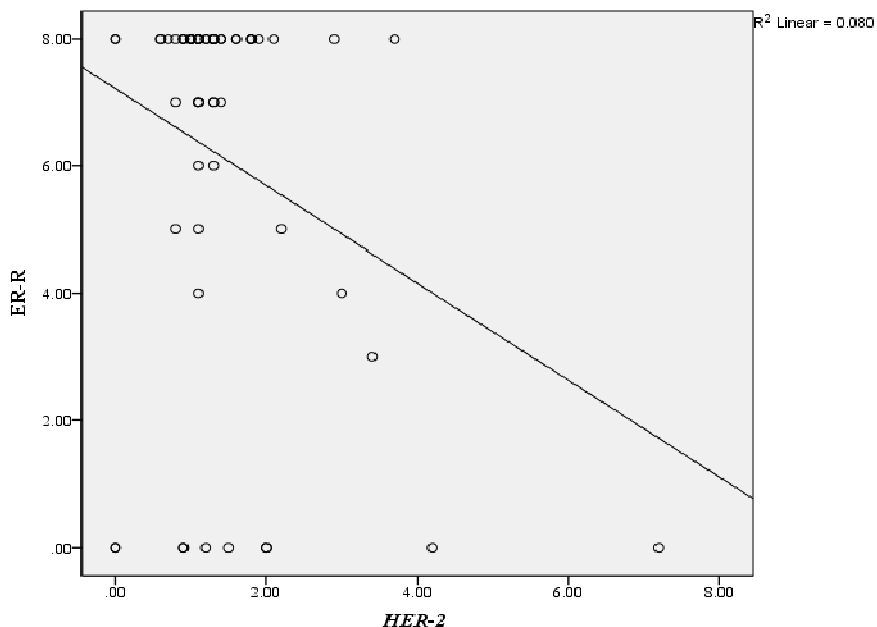
#### IV.4. REZULTATI KORELACIJE EKSPRESIJE ISPITIVANIH BIOLOŠKIH MARKERA U ODNOSU NA GENSKI STATUS *HER-2*

##### IV.4.1. Korelacija ekspresija ER-R u odnosu na genski status *HER-2*

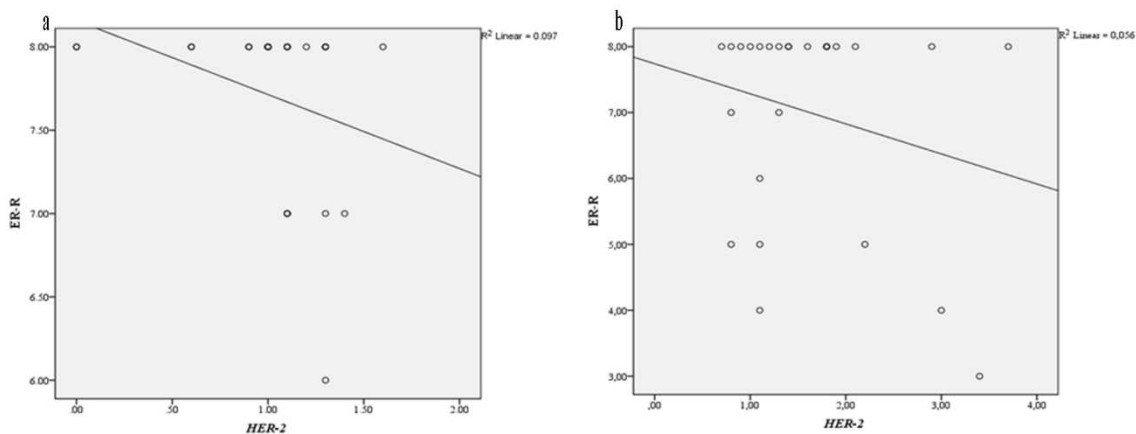
Najveći broj tkivnih uzoraka karcinoma dojke obuhvaćenih našom studijom imao je pozitivnu ekspresiju ER-R udruženu sa nepromenjenim genskim statusom *HER-2* (38/43, 88.4%). Takođe, pozitivna ekspresija ER-R češće je bila udružena sa niskim nivoom amplifikacije *HER-2* gena (6/7, 85.7%), kao i visokim nivoom amplifikacije *HER-2* gena (6/10, 60%) u odnosu na negativnu ekspresiju ER-R (grafikon 23).

Test Pearsonove korelacije je pokazao da postoji statistički značajna negativna korelacija između *HER-2* genskog statusa i ekspresije ER-R ( $p < 0.05$ ) u ukupnoj populaciji ispitivanih infiltrativnih karcinoma dojke. Raspodela učestalosti ekspresije ER-R u odnosu na *HER-2* genski status kod luminalnog A i luminalnog B tipa infiltrativnih karcinoma dojke prikazana je na grafikonima 24 a i 24 b. Statističkom analizom utvrđena je negativna korelacija između stepena ekspresije ER-R i *HER-2* genskog statusa u luminalnom A i luminalnom B tipu karcinoma dojke s tim što

navedena korelacija nije bila statistički značajna (grafikoni 24 a i 24 b). Sve karcinome trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog tipa karakterisala je negativna ekspresija ER-R.



**Grafikon 23.** Korelacija između ekspresije ER-R i *HER-2* genskog statusa kod infiltrativnog duktalnog karcinoma dojke ( $p < 0.05$ )

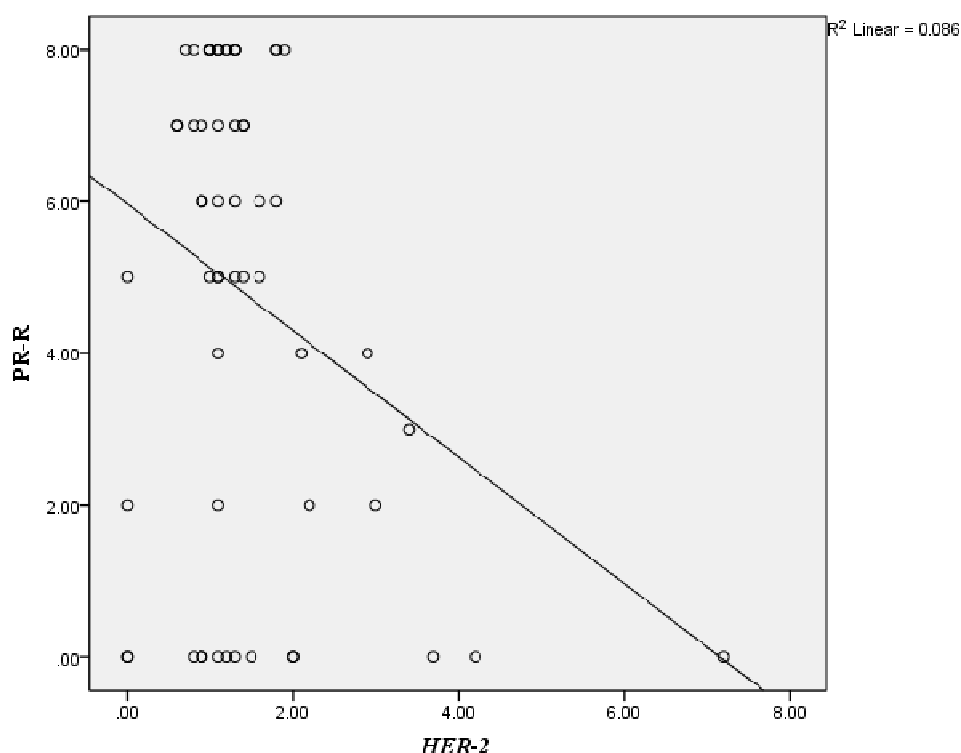


**Grafikon 24.** Korelacija između ekspresije ER-R i *HER-2* genskog statusa kod luminalnog A (a) i luminalnog B (b) tipa karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )

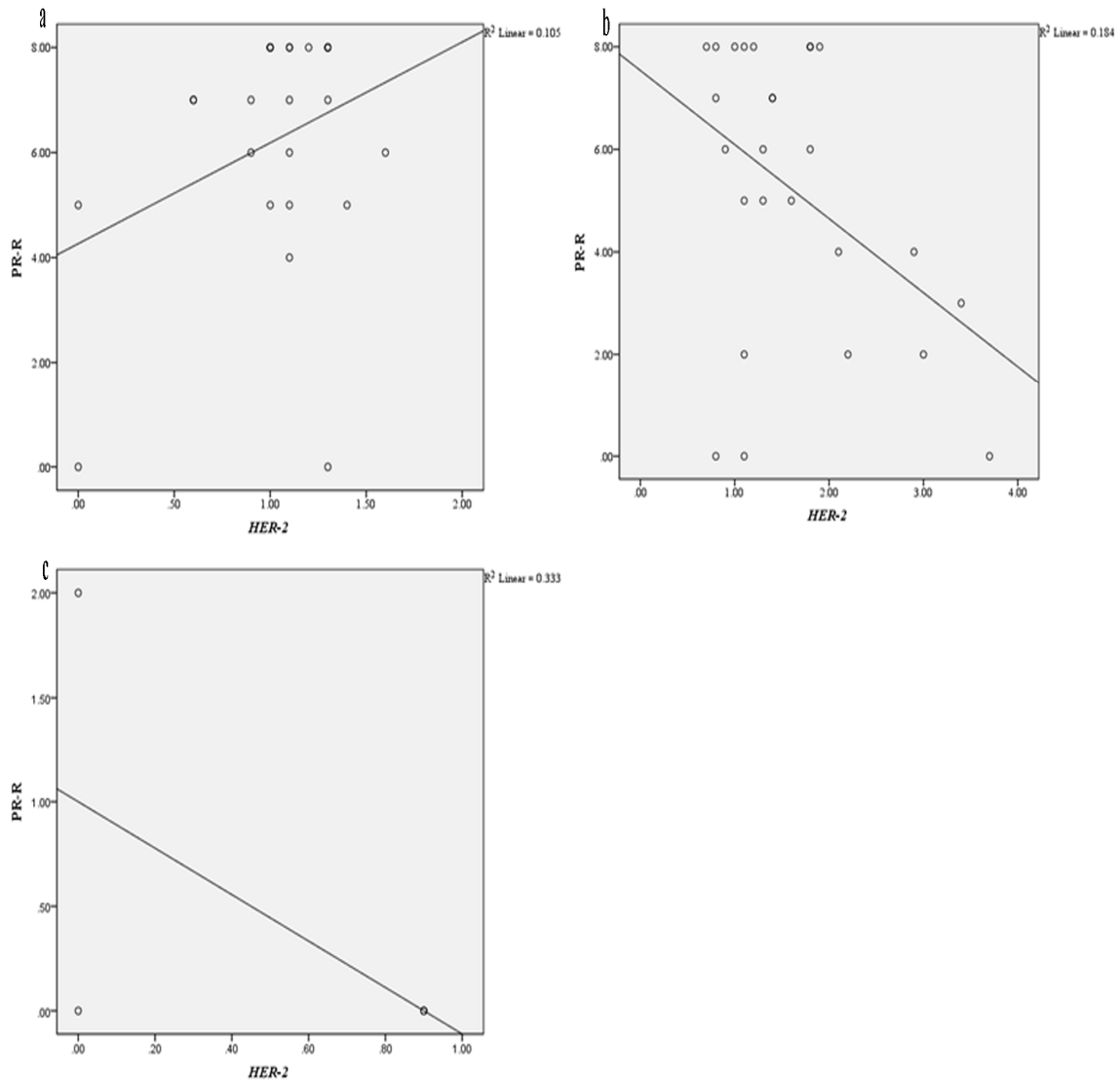
#### IV.4.2. Korelacija ekspresije PR-R u odnosu na genski status *HER-2*

Korelacija ekspresije PR-R u tumorskom tkivu svih infiltrativnih karcinoma dojke obuhvaćenih ovom studijom u odnosu na *HER-2* genski status prikazana je na

grafikonu 25. Primenom testa Pearsonove korelacije uočena je statistički značajna negativna korelacija između genskog statusa *HER-2* i nivoa ekspresije PR-R ( $p < 0.05$ ) (grafikon 25). Pozitivna ekspresija PR-R je u većem broju slučajeva bila udružena sa odsustvom amplifikacije *HER-2* gena (33/43, 76.7%) u odnosu na negativnu ekspresiju PR-R (10/43, 23.3%). Slično kao i u slučaju ER-R, pozitivna ekspresija PR-R bila je češće udružena sa niskim nivoom amplifikacije *HER-2* gena (6/7, 85.7%), dok je negativna ekspresija PR-R predominantno bila udružena sa visokim nivoom amplifikacije *HER-2* (7/10, 70%).



**Grafikon 25.** Korelacija između ekspresije PR-R i *HER-2* genskog statusa kod infiltrativnog duktalnog karcinoma dojke ( $p < 0.05$ )



**Grafikon 26.** Korelacija između ekspresije PR-R i *HER-2* genskog statusa kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p < 0.05$ ) i trostruko negativnog tipa karcinoma dojke (c,  $p > 0.05$ )

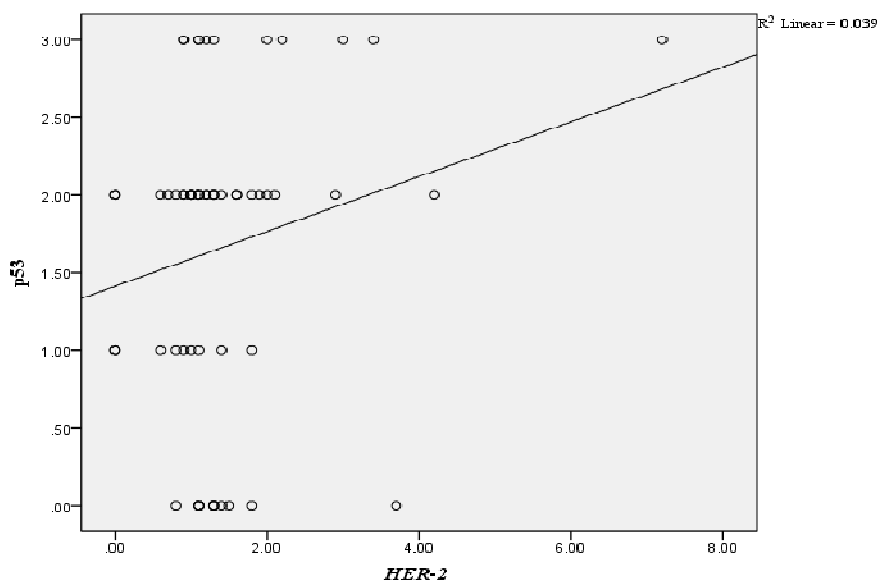
Primenom Pearsonove korelacije nije dokazana statistički značajna veza između prisustva genskih modifikacija *HER-2* i stepena ekspresije PR-R kod karcinoma luminalnog A tipa (grafikon 26 a). Statistički značajna negativna korelacija između ekspresije PR-R i *HER-2* genskog statusa zabeležena je u tumorima luminalnog B tipa ( $p < 0.05$ ) (grafikon 26 b).

Statistička analiza nije pokazala da u tumorskim tkivima trostruko negativnog tipa postoji značajna korelacija između stepena ekspresije PR-R i *HER-2* genskih modifikacija (grafikon 26 c). Odsustvo pozitivne ekspresije PR-R označeno sa nulom

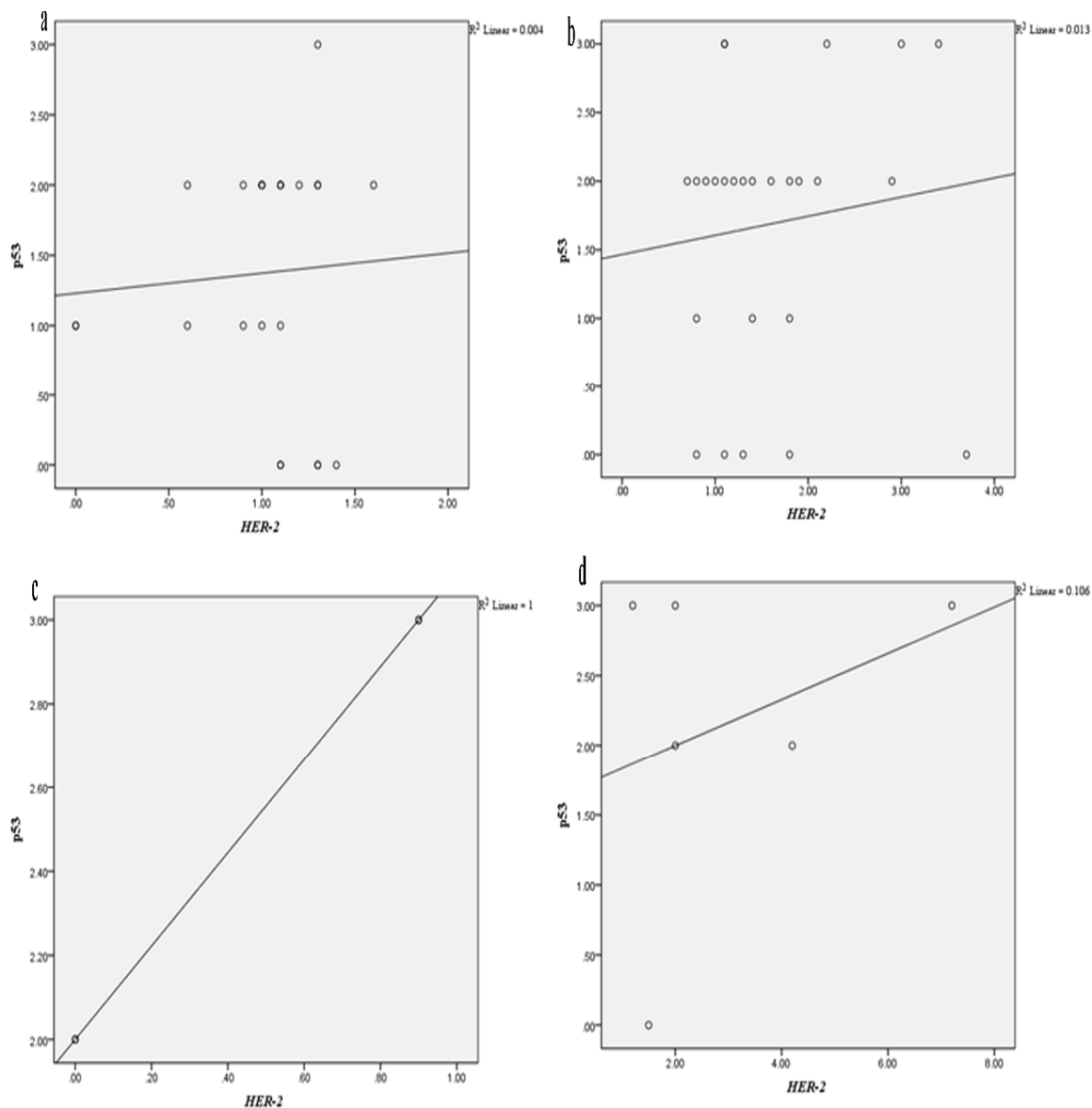
karakterisalo je tumorske promene svih ispitanica sa HER-2 pozitivnim tipom te stoga nije primenjen test Pearsonove korelacije kod ove grupe tumora.

#### IV.4.3. Korelacija ekspresije p53 proteina u odnosu na genski status *HER-2*

Primenom Pearsonove korelacije nije uočena statistički značajna veza između ekspresije proteina p53 i genskog statusa *HER-2* u svim tumorskim promenama obuhvaćenih ovom studijom (grafikon 27). Nepromenjen genski status *HER-2* je u najvećem broju tumora bio udružen sa pozitivnom ekspresijom p53 proteina označenom u bod sistemu sa 2 (21/43, 48.8%), dok je u najmanjem broju slučajeva bio udružen sa maksimalnim nivoom ekspresije p53 proteina (6/43, 14%). U po osam uzoraka tumora nepromenjen genski status *HER-2* interferirao je sa minimalnim nivoom ekspresije p53 proteina (8/43, 18.6%) tj. sa potpunim odsustvom ekspresije označenim sa 0 (8/43, 18.6%). Najveći broj tumorskih promena odlikovao je fenotip udružene visoke ekspresije proteina p53 označen u bod sistemu sa 2 i 3 sa visokim nivoom *HER-2* genske amplifikacije (9/10, 90%). Nizak nivo *HER-2* amplifikacije gena udružen je sa visokim nivoom ekspresije p53 označenim sa 2 (4/7, 57.1%) kod 4 uzorka, u dva tumora sa potpunim odsustvom ekspresije p53 označenim sa 0 (2/7, 28.6%), i u jednom tumoru sa ekspresijom p53 proteina označenom sa jedan (1/7, 14.3%).



**Grafikon 27.** Korelacija ekspresije proteina p53 u odnosu na *HER-2* genski status kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )



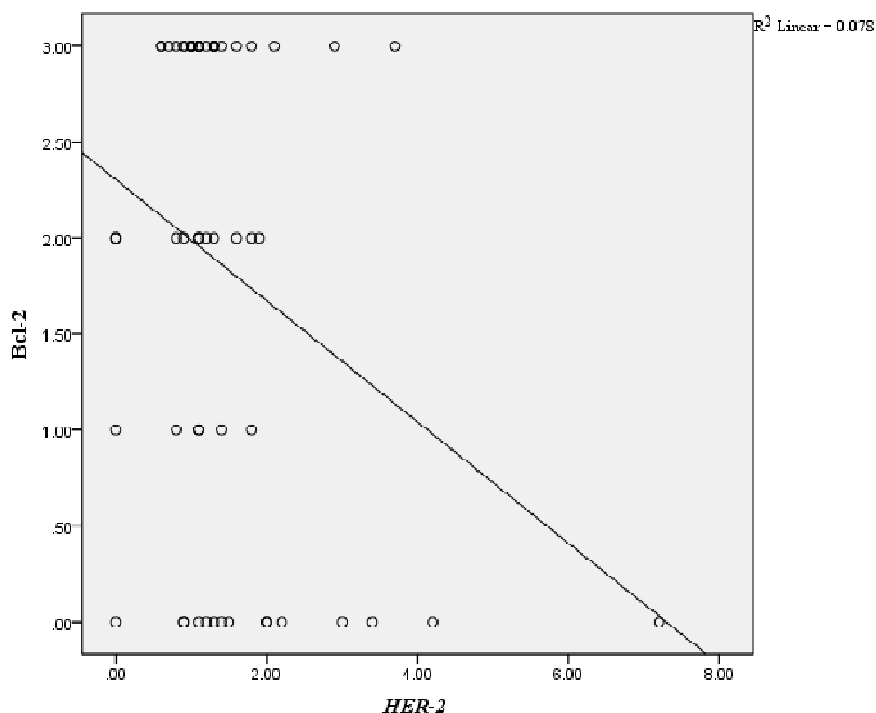
**Grafikon 28.** Korelacija ekspresije proteina p53 u odnosu na *HER-2* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p < 0.01$ ) i *HER-2* pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

Korelacija između stepena ekspresije proteina p53 i genskog statusa *HER-2* nije bila statistički značajna u tumorskim promjenama ispitanica sa luminalnim A ([grafikon 28 a](#)), luminalnim B ([grafikon 28 b](#)) i *HER-2* pozitivnim tipom karcinoma dojke ([grafikon 28 d](#)). Međutim, statistički značajna pozitivna korelacija između ova dva biološka markera uočena je u karcinomima trostruko negativnog tipa ( $p < 0.01$ ) ([grafikon 28 c](#)). Karcinomi četiri ispitanice trostruko negativnog tipa imali su izrazito visok nivo

ekspresije p53 proteina označen u bod sistemu sa 2 i 3 udružen sa neamplifikovanim statusom *HER-2* gena.

#### IV.4.4. Korelacija ekspresije proteina Bcl-2 u odnosu na genski status *HER-2*

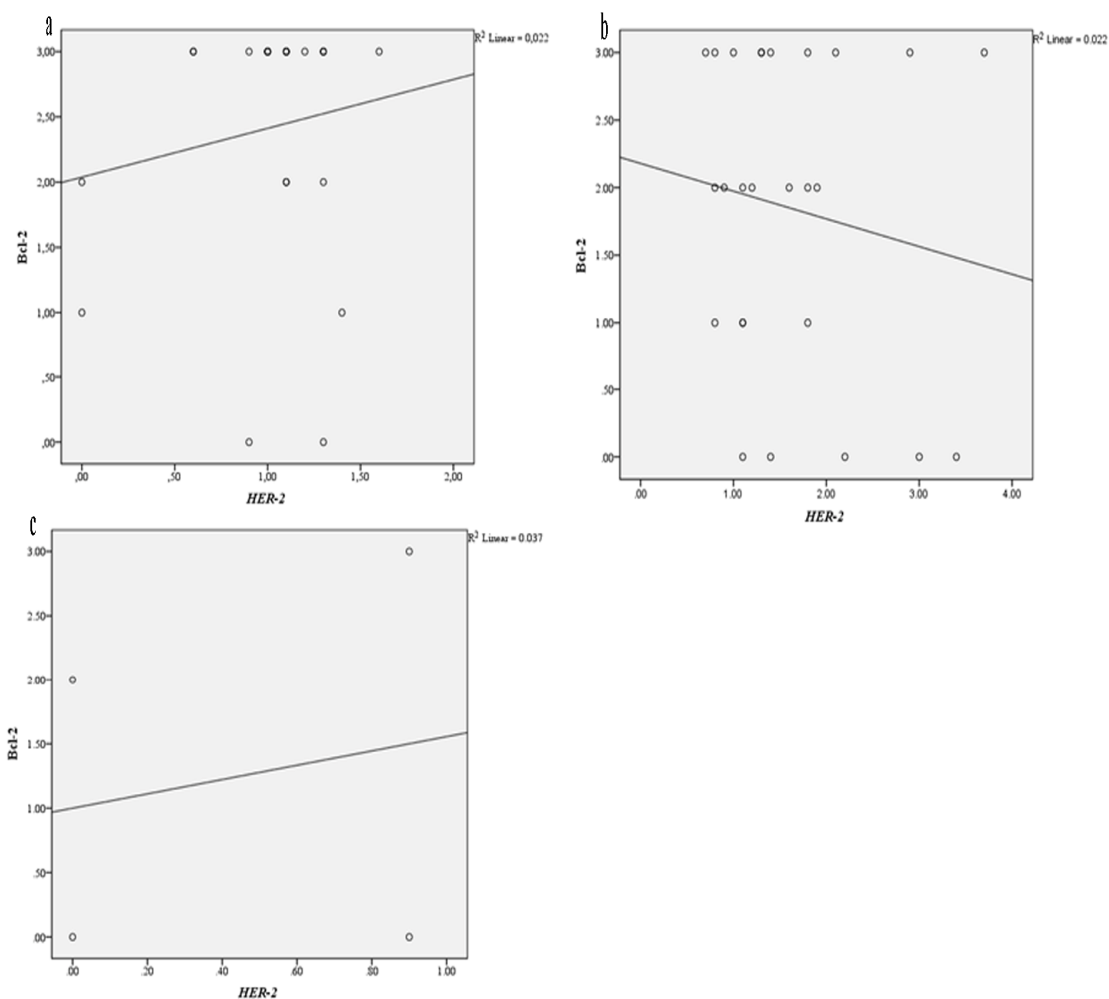
Korelacija ekspresije proteina Bcl-2 u tkivima infiltrativnih karcinoma dojke u odnosu na genski status *HER-2* prikazana je na grafikonu 29. Statističkom analizom podataka uočen je statistički značajan nivo negativne korelacije između ekspresije Bcl-2 proteina i genskog statusa *HER-2* ( $p < 0.05$ ). Korelacija između ekspresije proteina Bcl-2 u odnosu na *HER-2* genski status kod različitih molekularnih tipova karcinoma dojke prikazana je na grafikonu 30 a-d. Statistička analiza nije pokazala značajnu vezu između ova dva markera ni kod jednog od četiri molekularna tipa karcinoma dojke.



**Grafikon 29.** Korelacija ekspresije proteina Bcl-2 u odnosu na *HER-2* genski status kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke ( $p < 0.05$ )

U ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke maksimalno očuvana ekspresija Bcl-2 proteina označena sa 3 bila je u 22 tumora udružena sa nepromenjenim genskim statusom *HER-2* (22/43, 51.2%), dok je u znatno manjem broju tumora nepromenjen genski status *HER-2* interferirao sa očuvanom ekspresijom

označenom u bod sistemu sa 1 (5/43, 11.6%) i 2 (9/43, 20.9%). Redukovana ekspresija Bcl-2 proteina je u sedam tumora bila udružena sa nepromenjenim genskim statusom *HER-2* (7/43, 16.3%). Sedam tumorskih promena sa potpuno redukovanim statusom ekspresije Bcl-2 proteina označenim sa 0 imao je visok nivo amplifikacije *HER-2* gena (7/10, 70%), dok je u tri tumora sa očuvanom ekspresijom Bcl-2 proteina označenom sa 3 takode zabeležen visok nivo amplifikacije *HER-2* gena (3/10, 30%). Nizak nivo amplifikacije *HER-2* gena je u jednom tumoru bio udružen sa redukovanom ekspresijom Bcl-2 proteina označenom sa 0 (1/7, 14.3%), u jednom tumoru sa niskim nivoom očuvane ekspresije Bcl-2 označenim sa 1 (1/7, 14.3%), i u pet tumorskih promena nizak nivo amplifikacije *HER-2* bio je udružen sa izrazito očuvanom ekspresijom Bcl-2 proteina označenom u bod sistemu sa 2 (3/7, 42.8%) i 3 (2/7, 28.6%).



**Grafikon 30.** Korelacija ekspresije proteina Bcl-2 u odnosu na *HER-2* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ) i trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

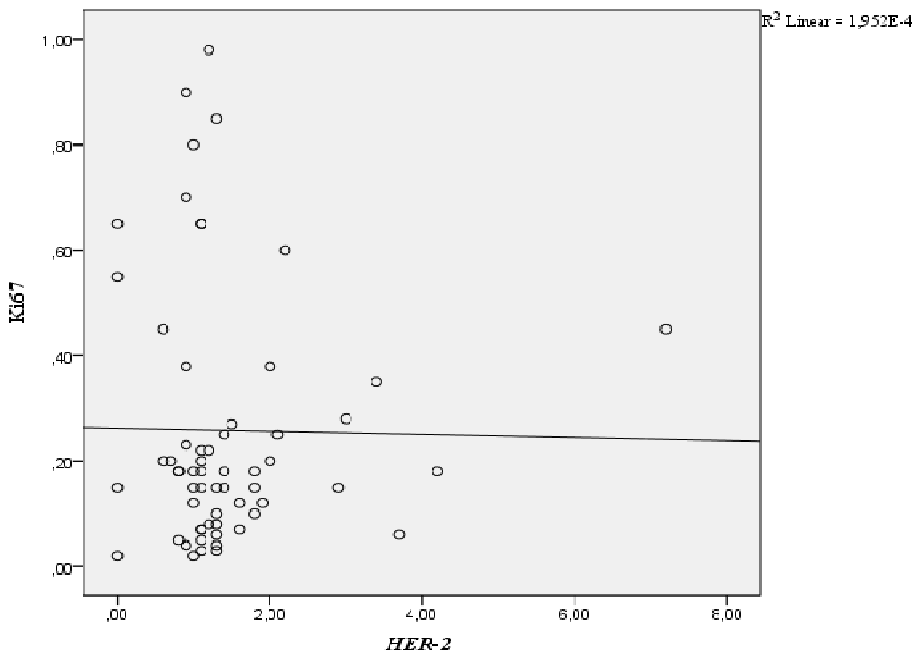


Sve tumorske promene ispitanica sa HER-2 pozitivnim tipom karcinoma dojke imale su i potpuno odsustvo ekspresije Bcl-2 proteina označeno u bod sistemu sa 0 usled čega nije primenjen test Pearsonove korelacije.

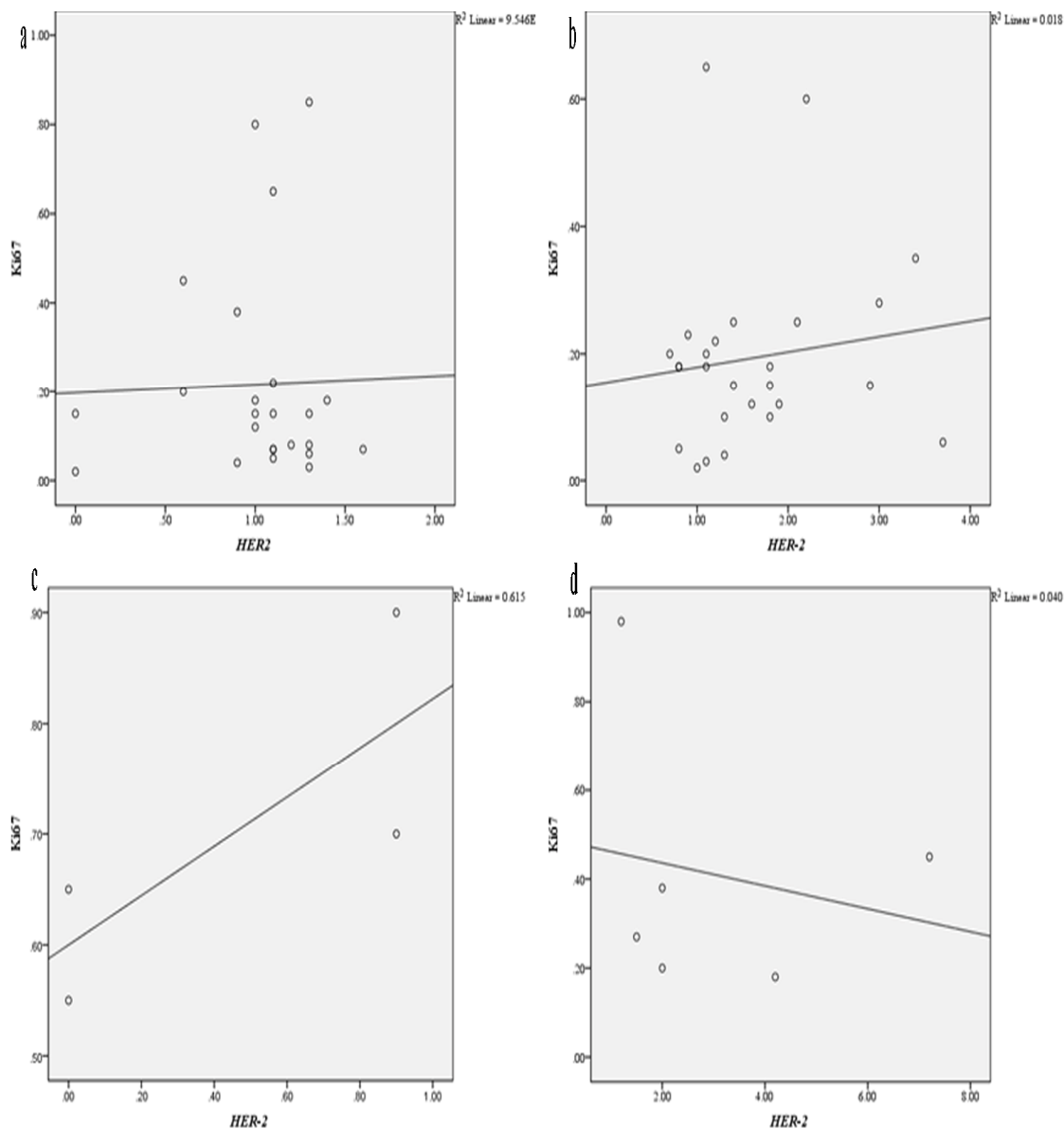
#### IV.4.5. Korelacija ekspresije proteina Ki67 u odnosu na genski status *HER-2*

Korelacija ekspresije proteina Ki67 u tkivu infiltrativnih karcinoma dojke u odnosu na *HER-2* genski status prikazana je na grafikonu 31. Statističkom analizom podataka nije uočena statistički značajna korelacija između ekspresije Ki67 proteina i *HER-2* genskog statusa.

Statistička analiza korelacije između ekspresije Ki67 proteina i genskog statusa *HER-2* nije pokazala statistički značajnu vezu između ova dva markera kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke (grafikon 32 a-d). Bez obzira na izostanak statističke značajnosti, pozitivna korelacija karakterisala je odnos između ispitivanih bioloških markera luminalnog A, luminalnog B i trostruko negativnog tipa, dok je odnos bio negativan u tumorima *HER-2* pozitivnog tipa karcinoma dojke.



**Grafikon 31.** Korelacija ekspresije Ki67 proteina u odnosu na *HER-2* genski status kod infiltrativnog duktalnog karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )



**Grafikon 32.** Korelacija ekspresije Ki67 proteina u odnosu na *HER-2* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) i *HER-2* pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

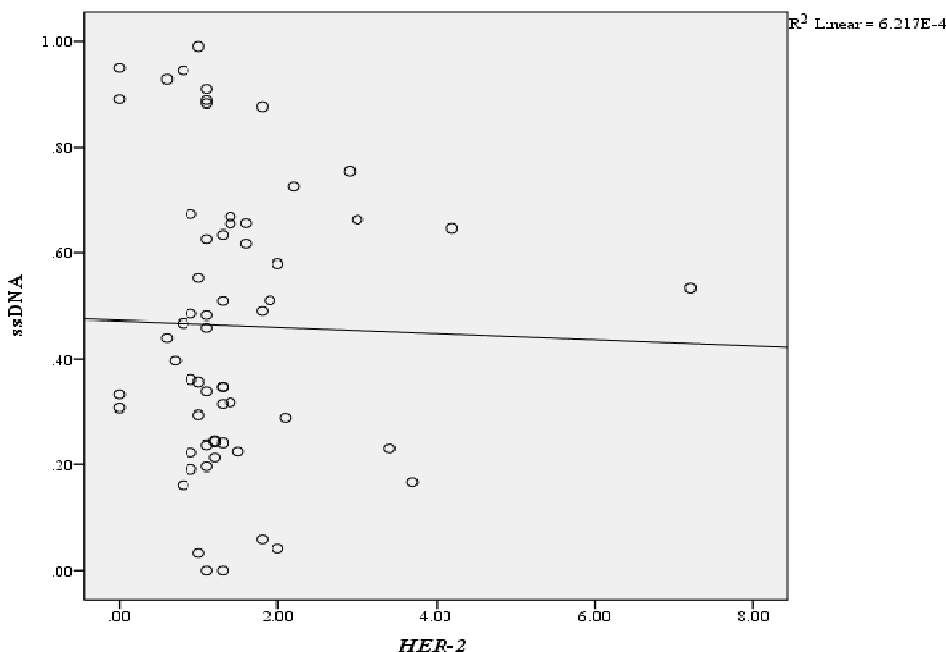
Nepromenjen genski status *HER-2* je u najvećem broju tumora bio udružen sa umerenim indeksom proliferacije (20/43, 46.5%), dok je u 15 tumora bio udružen sa minimalnim (15/43, 34.9%) i u osam tumora sa maksimalnim indeksom proliferacije (8/43, 18.6%). Nizak nivo amplifikacije *HER-2* gena je u pet tumora bio udružen sa umerenim indeksom proliferacije (5/7, 71.4%), dok je u dva preostala tumora bio udružen sa minimalnim indeksom proliferacije (2/7, 28.6%). Visok nivo amplifikacije je predominantno bio udružen sa umerenim indeksom proliferacije (8/10, 80%), dok su

dva preostala tumora sa visokim nivoom amplifikacije *HER-2* gena imali minimalni (1/10, 10%) u jednom, i maksimalni indeks proliferacije (1/10, 10%) u drugom slučaju.

#### IV.4.6. Korelacija ekspresije ssDNA (indeksa apoptoze) u odnosu na genski status *HER-2*

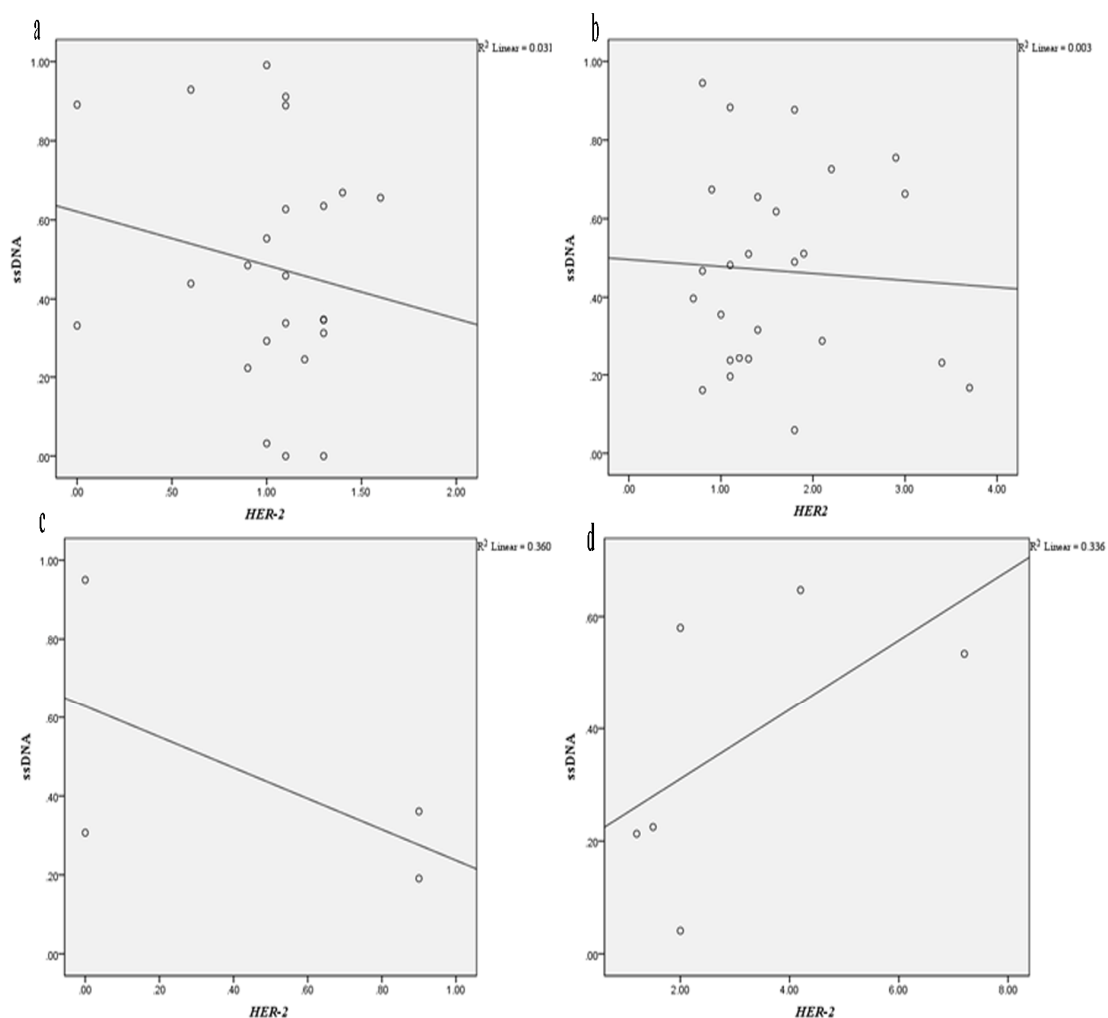
Korelacija ekspresije ssDNA u tkivnim uzorcima infiltrativnih karcinoma dojke u odnosu na genski status *HER-2* prikazana je na grafikonu 33. Statističkom analizom podataka uočen je trend negativne korelacije između apoptotskog indeksa i *HER-2* genskog statusa bez statističke značajnosti.

Statistička analiza korelacije između indeksa apoptoze i genskog statusa *HER-2* nije pokazala statistički značajnu vezu između ova dva markera kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke (grafikon 34 a-d). Korelacija između indeksa apoptoze i *HER-2* genskog statusa imala je negativan trend kod luminalnog A, luminalnog B i trostruko negativnog tipa dok je kod *HER-2* pozitivnog tipa karcinoma dojke zabeležen trend pozitivne korelacije.



**Grafikon 33.** Korelacija ekspresije ssDNA (indeksa apoptoze) u odnosu na *HER-2* genski status kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )

U ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke nepromenjen genski status *HER-2* je u samo tri tumora bio udružen sa minimalnim indeksom apoptoze (3/43, 6.9%), u 15 tumora je bio udružen sa maksimalnim indeksom apoptoze (15/43, 34.9%), dok je u najvećem broju tumora, 25, bio udružen sa umerenim indeksom apoptoze (25/43, 58.2%). Nizak nivo amplifikacije *HER-2* gena bio je udružen sa maksimalnim indeksom apoptoze u pet tumorskih promena (5/7, 71.4%), i u po jednom tumoru je bio udružen sa minimalnim (1/7, 14.3%) tj. umerenim indeksom apoptoze (1/7, 14.3%). Visok nivo *HER-2* genske amplifikacije bio je predominantno udružen sa maksimalnim indeksom apoptoze (6/10, 60%), dok je u tri tumora bio povezan sa umerenim (3/10, 30%) i u jednom tumoru sa minimalnim (1/10, 10%) indeksom apoptoze.

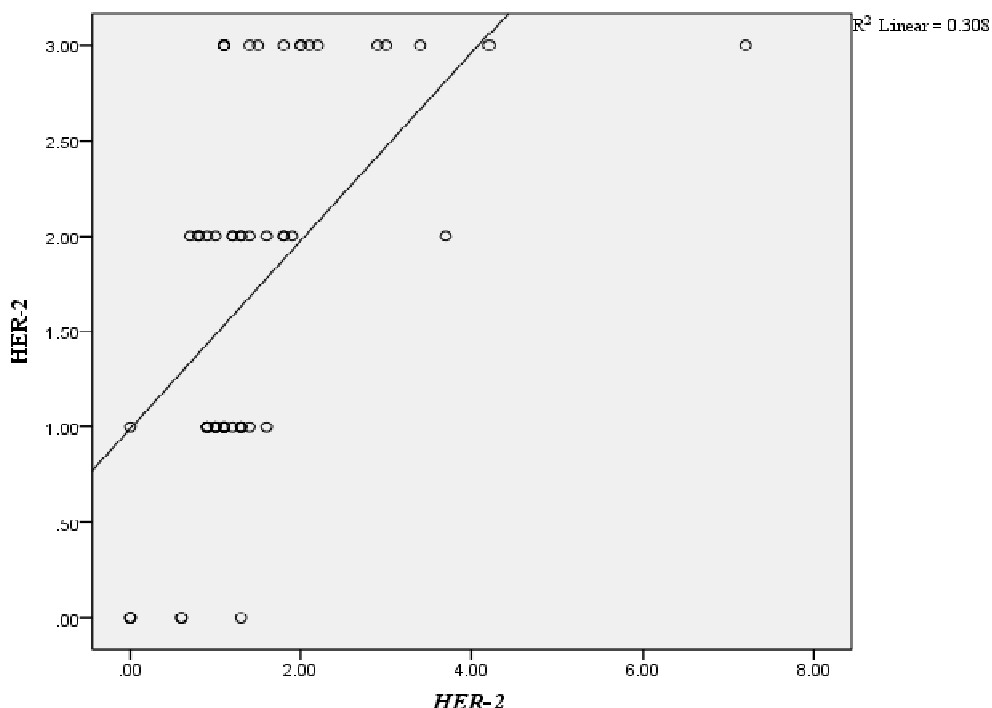


**Grafikon 34.** Korelacija ekspresije ssDNA (indeksa apoptoze) u odnosu na *HER-2* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) i *HER-2* pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

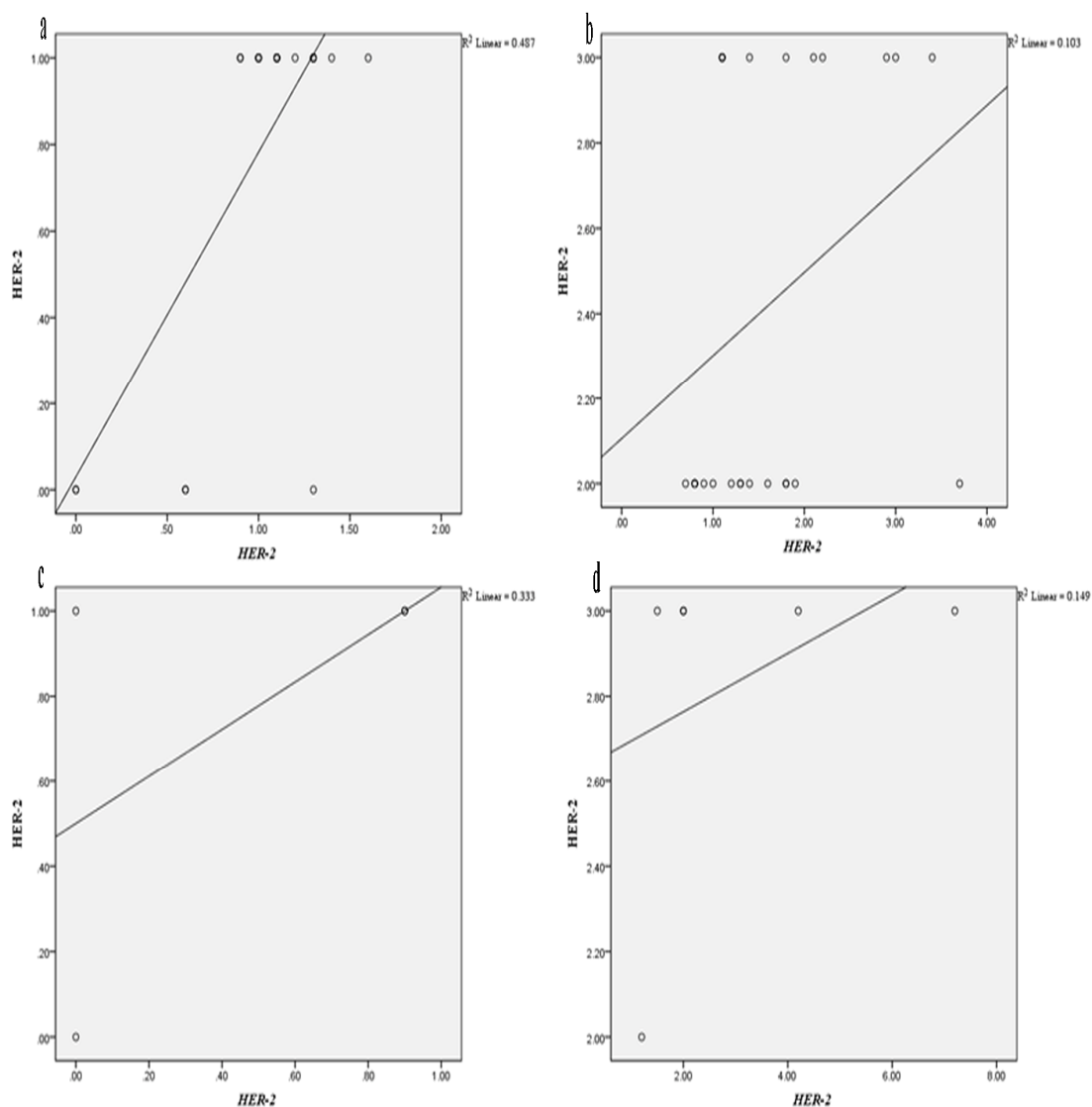
#### IV.4.7. Korelacija ekspresije HER-2 receptora u odnosu na genski status *HER-2*

Statističkom analizom podataka uočena je visoko značajna pozitivna korelacija između stepena ekspresije HER-2 receptora i genskog statusa *HER-2* ( $p < 0.01$ ) ([grafikon 35](#)) u ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke.

Korelacija između ekspresije HER-2 receptora u odnosu na *HER-2* genski status u karcinomima različitih molekularnih tipova prikazana je na [grafikonu 36 a-d](#). Statistička analiza korelacije između ekspresije HER-2 proteina i gena koji kodira njegovu sintezu pokazala je statistički značajnu pozitivnu korelaciju ( $p < 0.01$ ) u tumorskim promjenama luminalnog A tipa, dok kod svih ostalih molekularnih tipova ova veza nije bila statistički značajna. Naime u luminalnom A tipu karcinoma dojke ekspresija HER-2 receptora označena sa 0 i 1 udružena je sa neamplifikovanim nivoom *HER-2* gena kod 23 od ukupno 24 tumorske promene ([grafikon 36 a](#)).



**Grafikon 35.** Korelacija ekspresije HER-2 receptora u odnosu na *HER-2* genski status kod infiltrativnog duktalnog karcinoma dojke ( $p < 0.01$ )



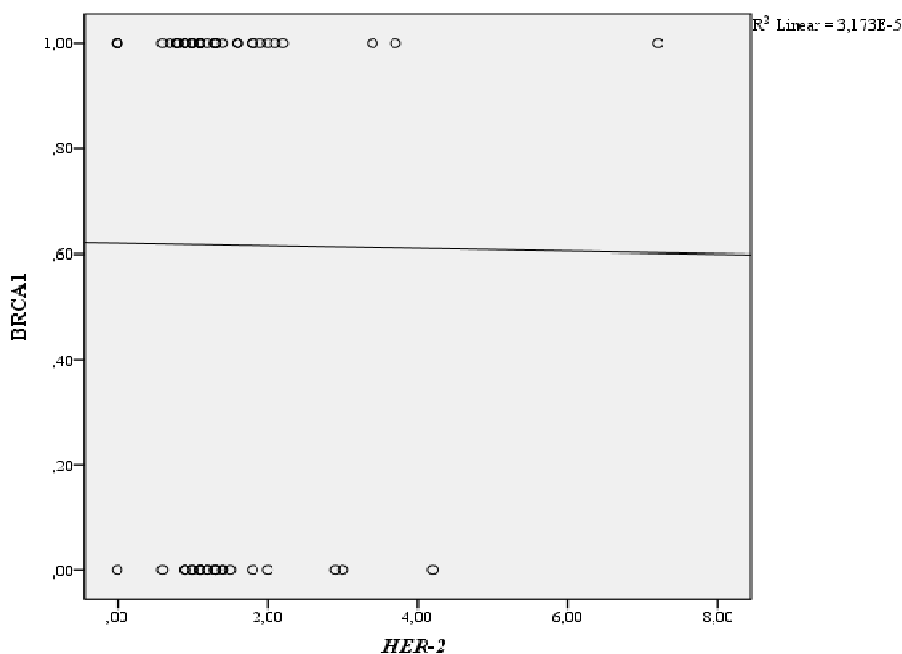
**Grafikon 36.** Korelacija ekspresije HER-2 receptora u odnosu na *HER-2* genski status kod luminalnog A (a,  $p < 0.01$ ), luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) i HER-2 pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

Negativna ekspresija HER-2 receptora udružena sa odsustvom genske amplifikacije, kao i pozitivna ekspresija HER-2 receptora udružena sa genskom amplifikacijom *HER-2* zabeležena je kod 43 karcinoma obuhvaćenih ovom studijom (43/60, 71.7%). Samo kod 17 (17/60, 28.3%) karcinoma naše studije pozitivna ekspresija HER-2 receptora bila je udružena sa odsustvom *HER-2* genske amplifikacije, dok je negativna ekspresija HER-2 bila udružena sa *HER-2* genskom amplifikacijom.

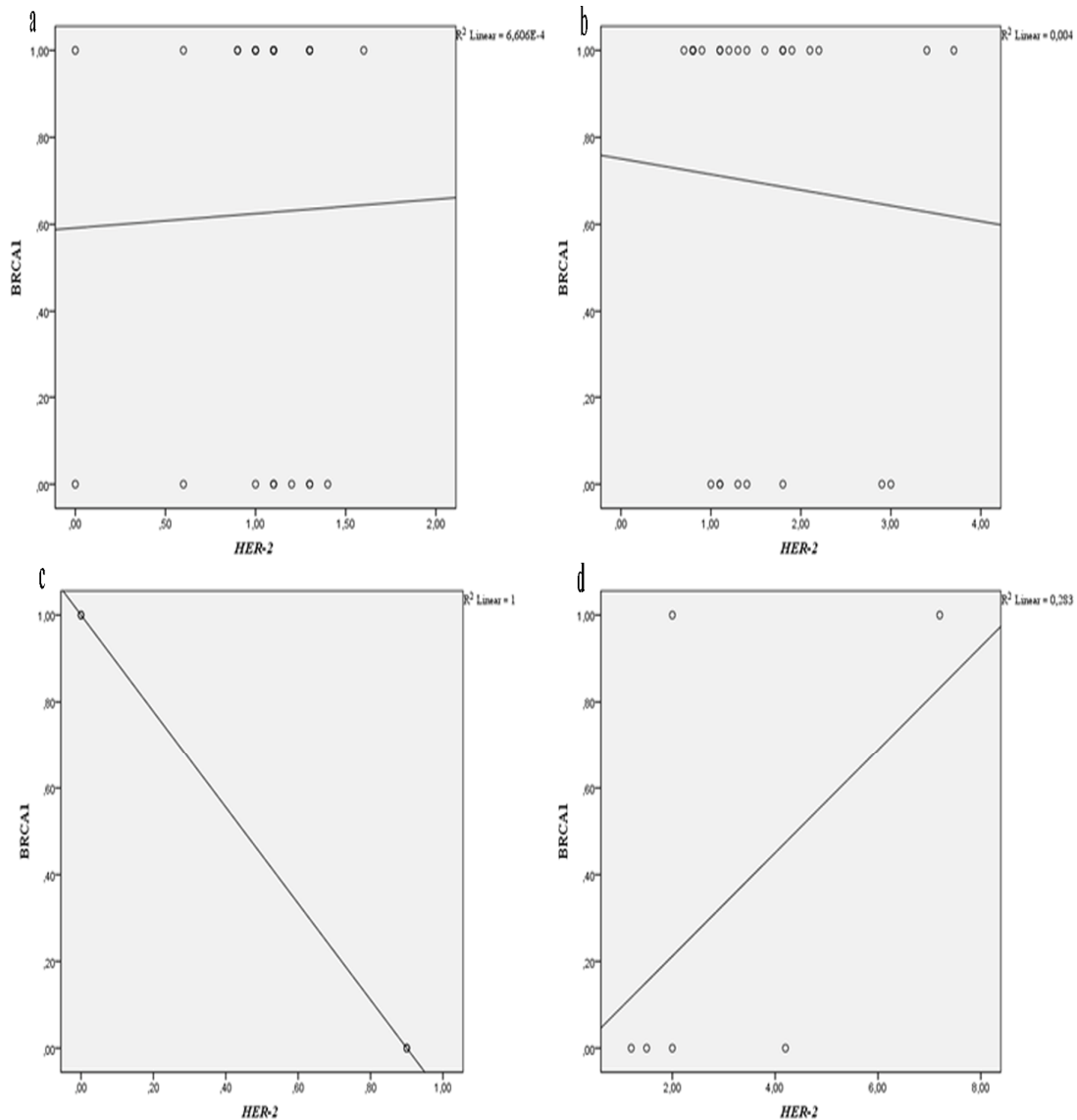
#### IV.4.8. Korelacija ekspresije BRCA1 proteina u odnosu na genski status *HER-2*

Statističkom analizom podataka nije uočena značajna korelacija između stepena ekspresije BRCA1 proteina i *HER-2* genske amplifikacije u ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke (grafikon 37).

Korelacija između ekspresije BRCA1 proteina u odnosu na *HER-2* genski status u tumorskim ćelijama različitih molekularnih tipova infiltrativnih karcinoma dojke prikazana je na grafikonu 38 a-d. Statistička analiza korelacije između ekspresije BRCA1 proteina i *HER-2* genskog statusa pokazala je statistički značajnu negativnu korelaciju u trostruko negativnom ( $p < 0.01$ ) tipu karcinoma dojke (grafikon 38 c), dok kod svih ostalih molekularnih tipova ova veza nije bila statistički značajna (grafikoni 38 a, 38 b, 38 d). U prilog značajnoj negativnoj korelaciji kod trostruko negativnog tipa karcinoma dojke po dva tumora sa pozitivnom i negativnom ekspresijom BRCA1 proteina bili su udruženi sa neamplifikovanim statusom *HER-2* gena.



**Grafikon 37.** Korelacija ekspresije BRCA1 proteina u odnosu na *HER-2* genski status kod infiltrativnog duktalnog karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )



**Grafikon 38.** Korelacija ekspresije BRCA1 proteina u odnosu na *HER-2* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p < 0.01$ ) i *HER-2* pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

U Ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke pet tumora karakterisao je fenotip udružene pozitivne ekspresije BRCA1 proteina i niskog nivoa amplifikacije *HER-2* gena (5/7, 71.4%), dok je u dva slučaja fenotip negativne ekspresije BRCA1 proteina udružen sa niskim nivoom amplifikacije *HER-2* gena (2/7, 28.6%). Četiri tumora odlikovao je kombinovani fenotip pozitivne ekspresije BRCA1 proteina i visokog nivoa amplifikacije *HER-2* (4/10, 40%), dok je u šest tumora negativna ekspresija BRCA1 udružena sa visokim nivoom *HER-2* genske amplifikacije (6/10, 60%). Pozitivna ekspresija BRCA1 je u 28 tumora bila udružena sa



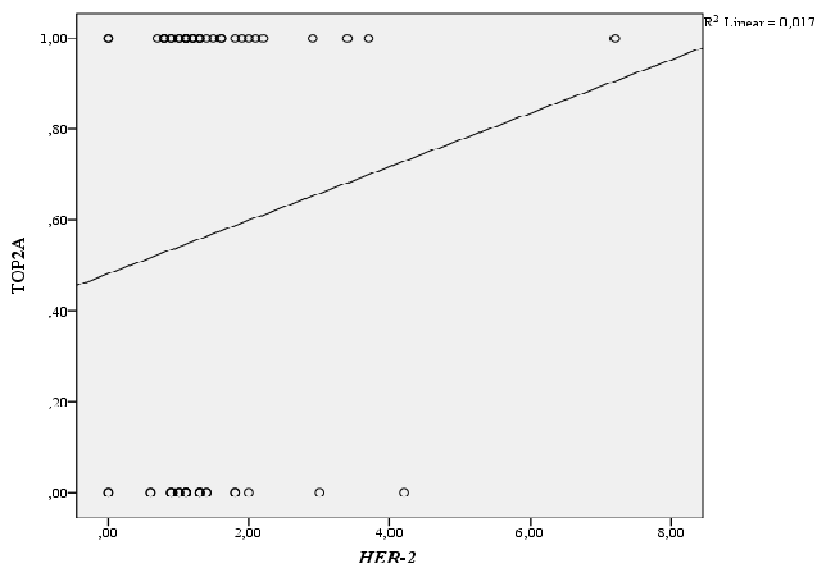
nepromenjenim genskim statusom *HER-2* (28/43, 65.1%), dok je u 15 tumora negativna ekspresija BRCA1 proteina interferirala sa nepromenjenim *HER-2* genskim statusom (15/43, 34.9%).

#### **IV.4.9. Korelacija ekspresije TOP2A proteina u odnosu na genski status *HER-2***

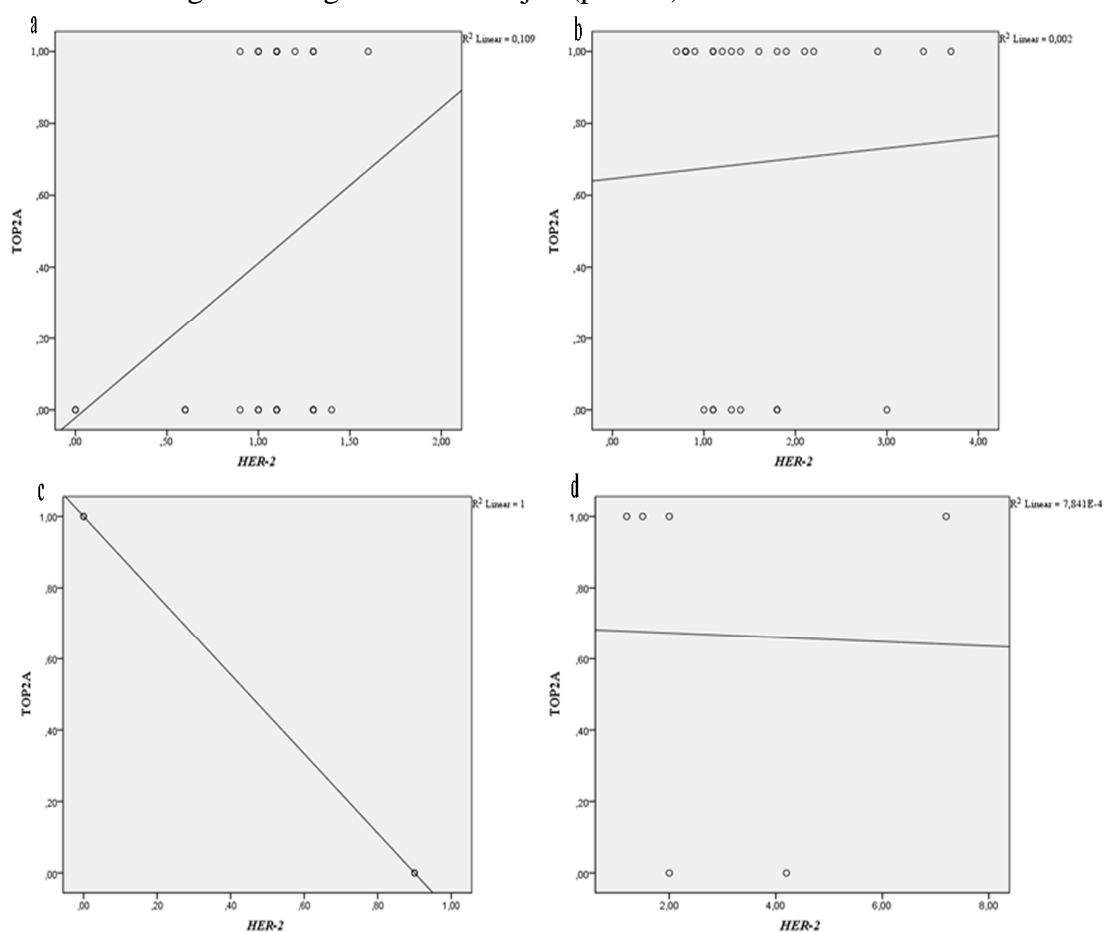
Statističkom analizom podataka nije uočena značajna korelacija između stepena ekspresije TOP2A proteina i *HER-2* genskog statusa u ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke (grafikon 39).

Korelacija ekspresije TOP2A proteina u odnosu na *HER-2* genski status u tumorskim ćelijama različitih molekularnih tipova infiltrativnih karcinoma dojke prikazana je na grafikonu 40 a-d. Statistička analiza korelacije između stepena ekspresije TOP2A proteina i *HER-2* genskog statusa pokazala je statistički značajnu negativnu korelaciju u tumorima trostruko negativnog ( $p < 0.01$ ) tipa (grafikon 40 c), dok kod svih ostalih molekularnih tipova ova veza nije bila statistički značajna (grafikoni 40 a, 40 b, 40 d). Uprkos statistički značajnoj korelaciji ekspresija TOP2A proteina je u svim slučajevima bila udružena sa neamplifikovanim statusom *HER-2* gena.

U šest tumora nizak nivo amplifikacije *HER-2* gena bio je udružen sa pozitivnom ekspresijom TOP2A proteina (6/7, 85.7%), dok je u jednom slučaju u pitanju negativna ekspresija TOP2A proteina udružena sa niskim nivoom amplifikacije *HER-2* gena (1/7, 14.3%). Visok nivo *HER-2* genske amplifikacije bio je podjednako udružen i sa pozitivnom (5/10, 50%) i sa negativnom (5/10, 50%) ekspresijom TOP2A proteina. Nepromenjen genski status *HER-2* bio je skoro u podjednakom broju tumora udružen sa pozitivnom (23/43, 53.5%) odnosno negativnom ekspresijom TOP2A proteina (20/43, 46.5%).



**Grafikon 39.** Korelacija ekspresije TOP2A proteina u odnosu na *HER-2* genski status kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )



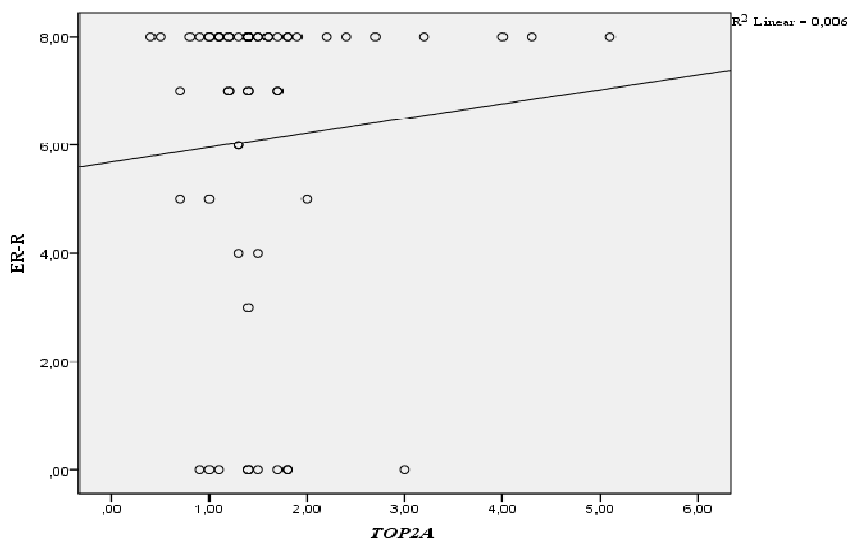
**Grafikon 40.** Korelacija ekspresije TOP2A proteina u odnosu na *HER-2* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p < 0.01$ ) i *HER-2* pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

## **IV.5. REZULTATI KORELACIJE EKSPRESIJE ISPITIVANIH BIOLOŠKIH MARKERA U ODNOSU NA GENSKI STATUS *TOP2A***

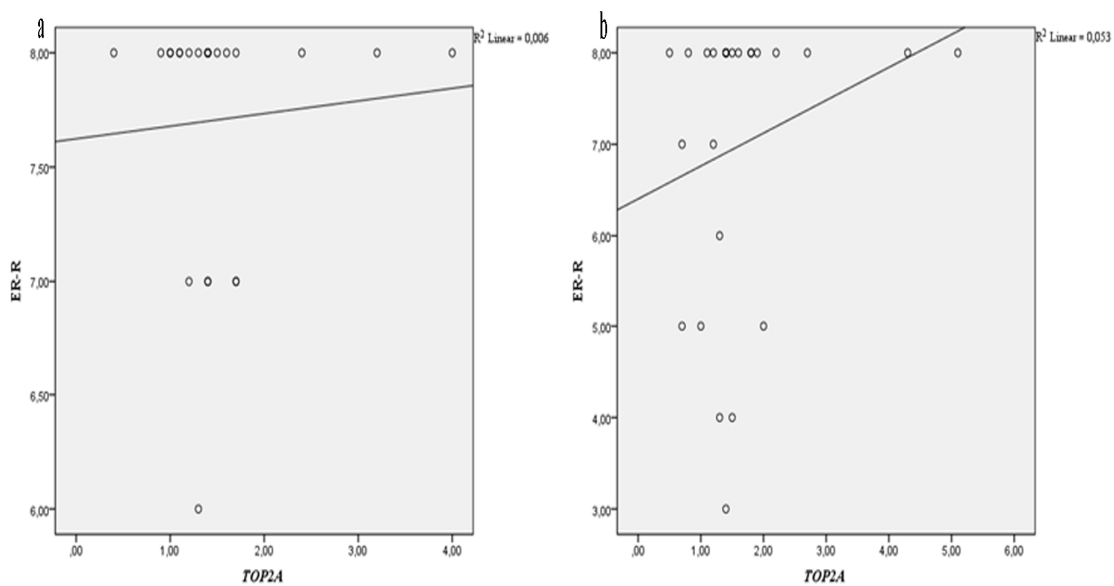
### **IV.5.1. Korelacija ekspresije ER-R u odnosu na genski status *TOP2A***

Statističkom analizom nije uočena značajna veza između ekspresije ER-R i genskih modifikacija *TOP2A* u ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke (grafikon 41). Međutim, bez obzira na izostanak statističke značajnosti veći broj tumorskih promena sa niskim nivoom amplifikacije *TOP2A* gena imao je pozitivnu ekspresiju ER-R (11/15, 73.3%), u odnosu na one kod kojih je ekspresija bila negativna ER-R (4/15, 26.7%). U osam tumorskih promena visok nivo amplifikacije *TOP2A* gena bio je udružen sa pozitivnom ekspresijom ER-R (8/9, 88.9%), dok je u jednom tumoru kombinovani fenotip sastavljen od negativne ekspresije ER-R i visokog nivoa amplifikacije *TOP2A* (1/9, 11.2%) (grafikon 41). Delecija *TOP2A* gena je bila udružena sa pozitivnom ekspresijom ER-R (5/5, 100%). Nepromenjen genski status *TOP2A* dominantno je bio udružen sa pozitivnom ekspresijom ER-R (26/31, 83.9%) u odnosu na negativnu ekspresiju ER-R (5/31, 16.1%).

Statistički test Pearsonove korelacije nije pokazao da postoji statistički značajna korelacija između genskog statusa *TOP2A* i ekspresije ER-R u tumorima luminalnog A i luminalnog B tipa (grafikon 42 a i 42 b). Tumorske promene svih ispitanica iz grupe trostruko negativnog tipa karakterisalo je odsustvo pozitivne ekspresije ER-R, dok je nizak nivo amplifikacije *TOP2A* gena zabeležen u jednom tumoru. Karcinome HER-2 pozitivnog tipa karakterisalo je odsustvo pozitivne ekspresije ER-R, dok je *TOP2A* genska amplifikacija bila prisutna kod 4 od ukupno 6 karcinoma (66.7%) iz ove grupe. Iz tih razloga test Pearsonove korelacije nije primenjen na ova dva molekularna tipa karcinoma dojke.



**Grafikon 41.** Korelacija ekspresije ER-R u odnosu na *TOP2A* genski status kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke ( $p>0.05$ )



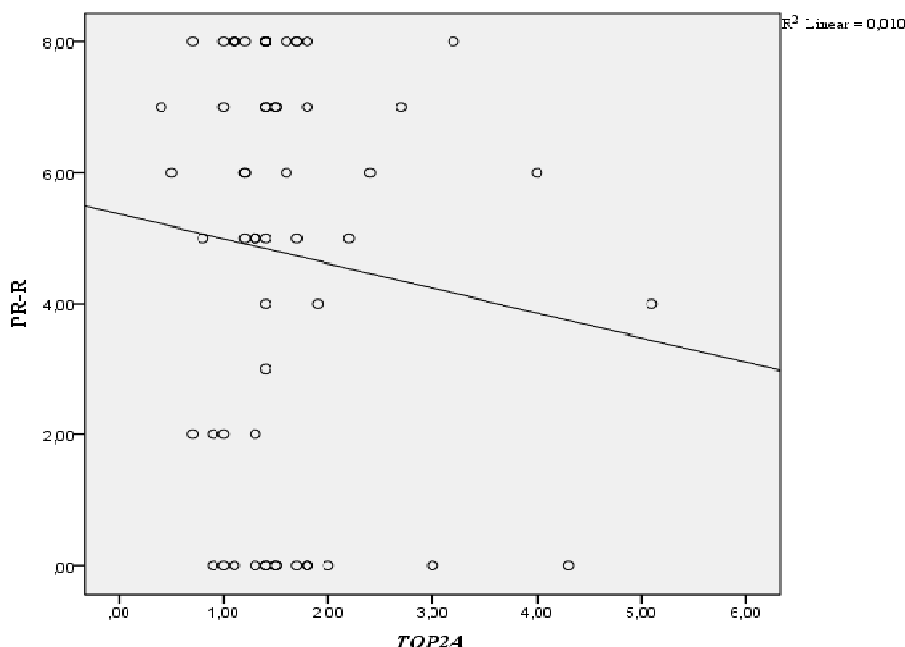
**Grafikon 42.** Korelacija ekspresije ER-R u odnosu na *TOP2A* genski status kod luminalnog A (a,  $p>0.05$ ) i luminalnog B (b,  $p>0.05$ ) tipa karcinoma dojke

#### IV.5.2. Korelacija ekspresije PR-R u odnosu na genski status *TOP2A*

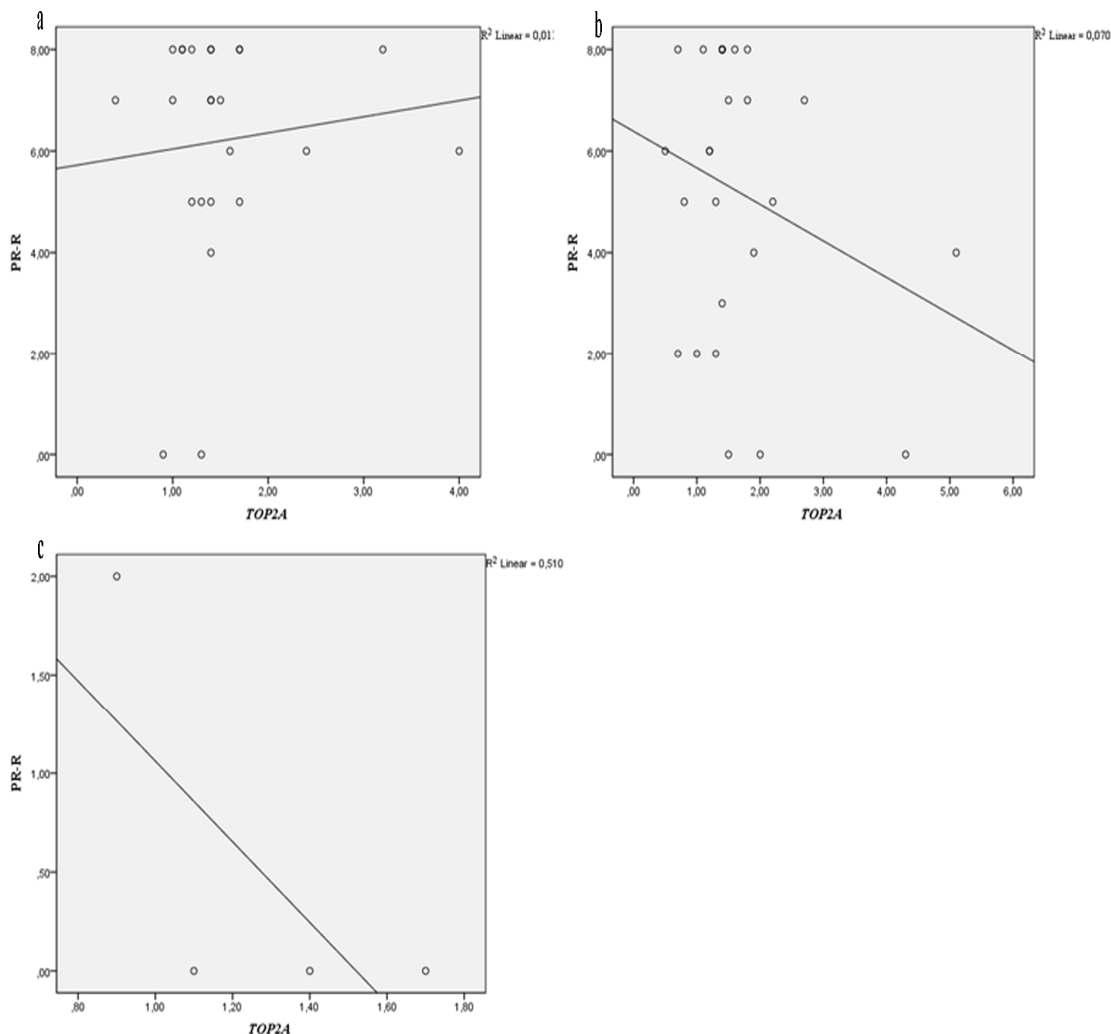
Statističkom analizom nije uočena značajna veza između ekspresije PR-R i genskih aberacija *TOP2A* u ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke (grafikon 43).

Statistički test Pearsonove korelacije nije pokazao da postoji statistički značajna korelacija između *TOP2A* genskih aberacija i ekspresije PR-R u tumorima luminalnog A, luminalnog B i trostruko negativnog tipa karcinoma dojke (grafikon 44 a-d). Tumorske promene trostruko negativnog tipa odlikovao je samo jedan slučaj niskog nivoa amplifikacije koji je bio udružen sa negativnom ekspresijom PR-R (grafikon 44 c), dok su tri slučaja sa niskim nivoom i jedan slučaj sa visokim nivoom amplifikacije *TOP2A* gena iz HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke takođe bili udruženi sa potpunim odsustvom ekspresije PR-R označenim sa 0.

U ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke nepromenjen genski status *TOP2A* dominantno je bio udružen sa pozitivnom ekspresijom PR-R (22/31, 70.9%) u odnosu na negativnu ekspresiju PR-R (9/31, 29.1%). Nizak nivo amplifikacije *TOP2A* gena je u deset tumora bio udružen sa pozitivnom ekspresijom PR-R (10/15, 66.7%) dok je u pet tumora interferirao sa negativnom ekspresijom PR-R (5/15, 33.3%). Visok nivo amplifikacije je u tri tumora bio udružen sa negativnom (3/9, 33.3%) i u šest tumora sa pozitivnom ekspresijom PR-R (6/9, 66.7%). Delecija *TOP2A* gena je takođe dominantno bila udružena sa pozitivnom ekspresijom PR-R (4/5, 80%) dok je samo u jednom tumoru istovremeno bila zabeležena i negativna ekspresija PR-R (1/5, 20%).



**Grafikon 43.** Korelacija ekspresije PR-R u odnosu na *TOP2A* genski status kod infiltrativnog duktalnog karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )

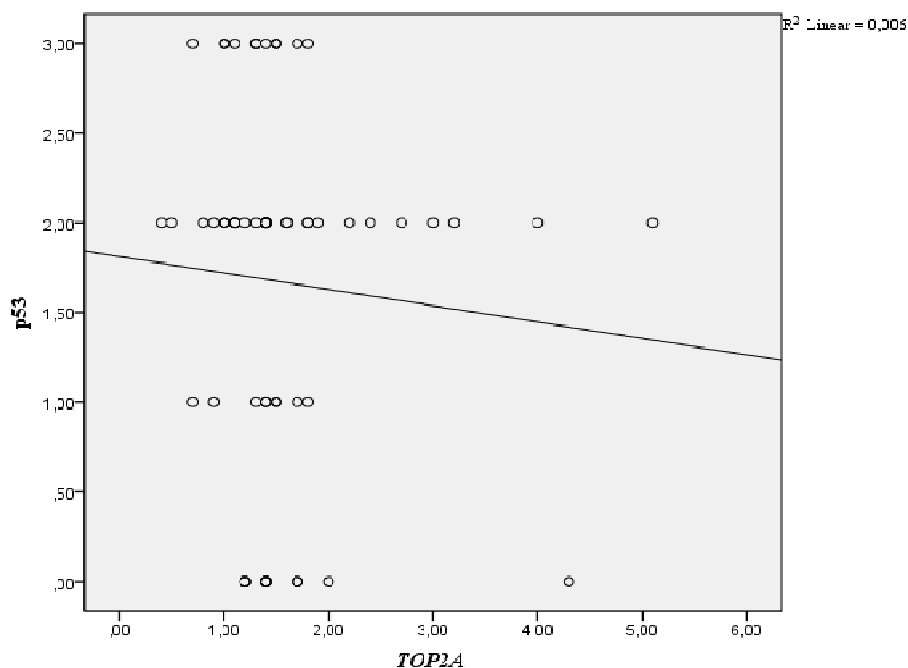


**Grafikon 44.** Korelacija ekspresije PR-R u odnosu na *TOP2A* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ) i trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

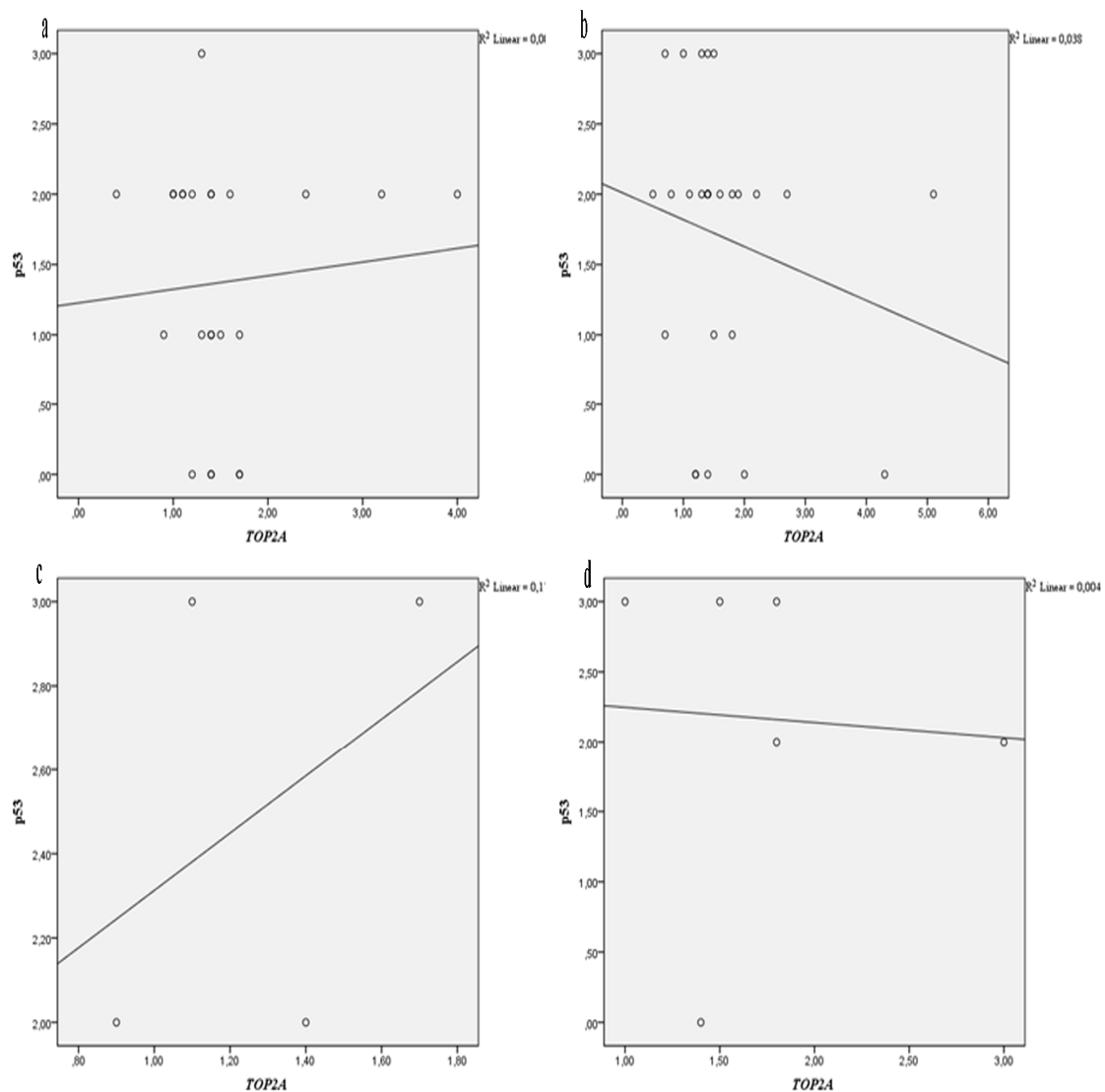
#### IV.5.3. Korelacija ekspresije tumor supresornog proteina p53 u odnosu na genski status *TOP2A*

Statističkom analizom nije uočena značajna veza između stepena ekspresije p53 proteina i *TOP2A* genskih aberacija u populaciji svih ispitivanih infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke (grafikon 45). Bez obzira na izostanak statističke značajnosti između različitih molekularnih tipova karcinoma dojke, uočen je trend negativne korelacije između stepena ekspresije p53 proteina i *TOP2A* genskog statusa u luminalnom B (grafikon 46 b) i HER-2 pozitivnom (grafikon 46 d) tipu karcinoma dojke, dok je trend

pozitivne korelacije karakterisao odnos između navedenih markera u luminalnom A (grafikon 46 a) i trostruko negativnom (grafikon 46 c) tipu karcinoma dojke. U ukupnoj ispitivanoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke visok nivo genske amplifikacije *TOP2A* je najčešće udružen sa visokim stepenom ekspresije p53 proteina označenim u bod sistemu sa 2 (7/9, 77.7%). Nizak nivo amplifikacije *TOP2A* gena bio je udružen u po četiri tumora sa ekspresijom p53 označenom sa 1 (4/15, 26.7%) i 3 (4/15, 26.7%), u pet tumora sa ekspresijom od 2 (5/15, 33.3%) i u dva tumora je bio udružen sa potpunim odsustvom ekspresije p53 proteina (2/15, 13.3%). Delecija *TOP2A* gena je najčešće bila udružena sa maksimalnim stepenom ekspresije p53 (3/5, 60%), dok je u po jednom tumoru bila udružena sa minimalnim (1/5, 20%) tj. umerenim stepenom ekspresije p53 proteina označenim u bod sistemu sa 2 (1/5, 20%). Nepromenjen genski status *TOP2A* je u najvećem broju tumora bio udružen sa ekspresijom proteina p53 označenim sa 2 (14/32, 45.1%), dok je u najmanjem broju tumora interferirao sa slabom pozitivnom ekspresijom p53 označenom sa 1 (4/31, 12.9%). Potpuno odsustvo ekspresije p53 proteina označeno sa 0 (7/31, 22.6%) i maksimalni nivo ekspresije p53 označen u bod sistemu sa 3 (6/31, 19.4%) udruženi su u približnom broju tumora sa nepromenjenim *TOP2A* genskim statusom.



**Grafikon 45.** Korelacija ekspresije proteina p53 u odnosu na *TOP2A* genski status kod infiltrativnog duktalnog karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )



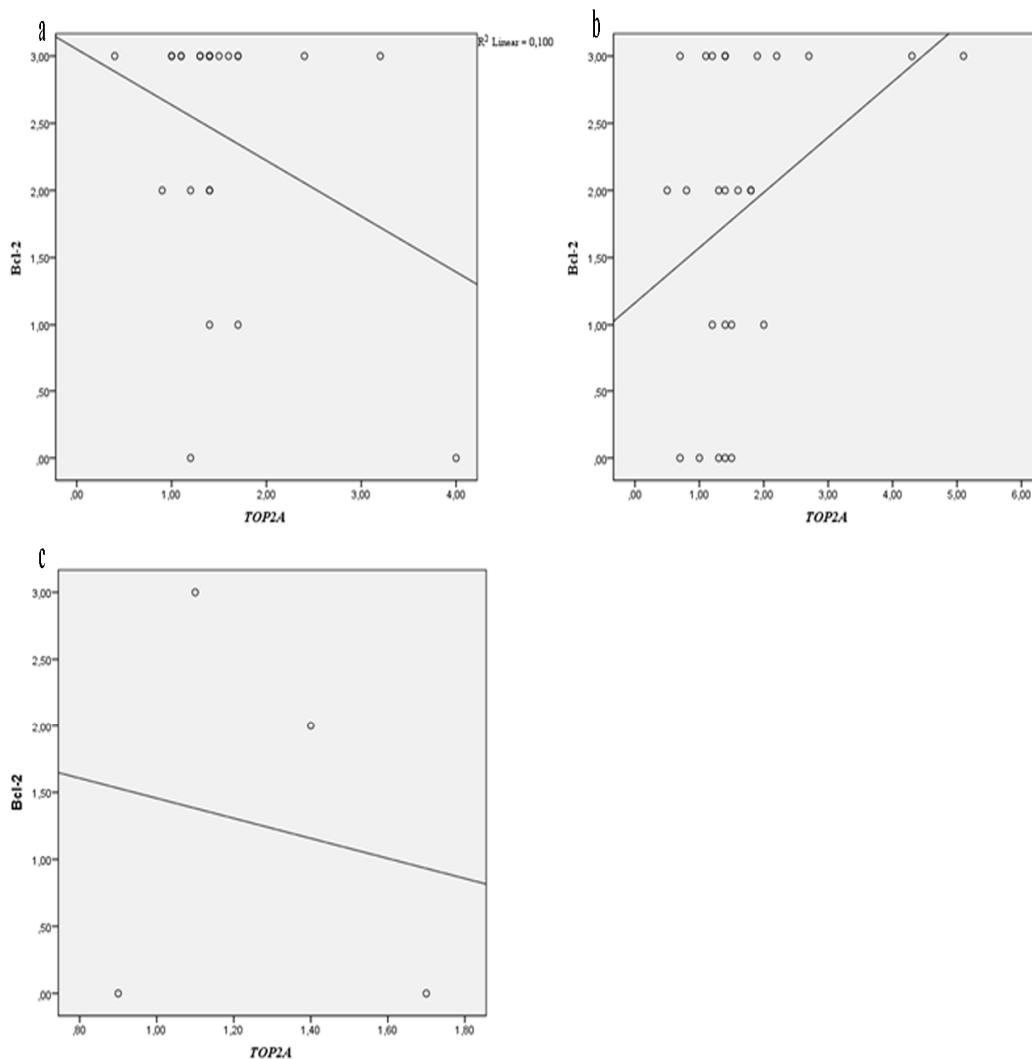
**Grafikon 46.** Korelacija ekspresije proteina p53 u odnosu na *TOP2A* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) i HER-2 pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

#### IV.5.4. Korelacija ekspresije Bcl-2 proteina u odnosu na genski status *TOP2A*

Statističkom analizom nije uočena značajna veza između stepena ekspresije proteina Bcl-2 i genskog statusa *TOP2A* kod svih infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke obuhvaćenih našom studijom ([grafikon 47](#)). Visok nivo amplifikacije *TOP2A* gena bio je udružen uglavnom sa visokim nivoom očuvanosti ekspresije Bcl-2 proteina označenim sa 3 (6/9, 66.7%), dok je u dva slučaja bio povezan sa niskim nivoom očuvanosti ekspresije Bcl-2 označenim sa 1 (2/9, 22.2%) i u jednom tumoru sa







**Grafikon 48.** Korelacija ekspresije proteina Bcl-2 u odnosu na *TOP2A* genski status kod luminalnog A (a,  $p < 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ) i trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

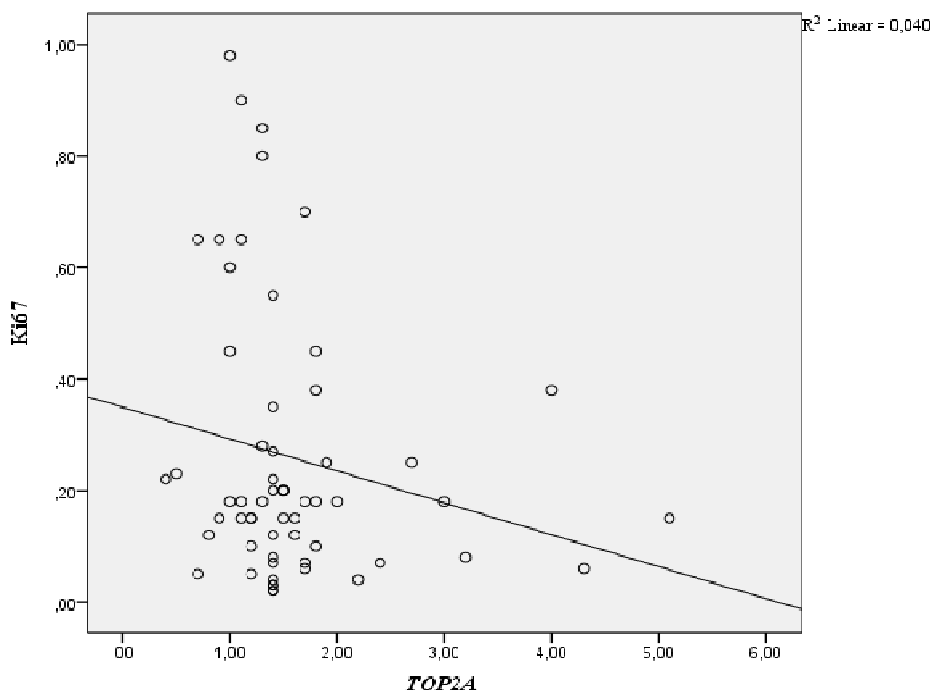
Sve tumorske promene HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke karakterisala je negativna ekspresija Bcl-2 proteina zbog čega u navedenom slučaju nije rađen test Pearsonove korelacije.

#### IV.5.5. Korelacija ekspresije Ki67 proteina (indeksa proliferacije) u odnosu na genski status *TOP2A*

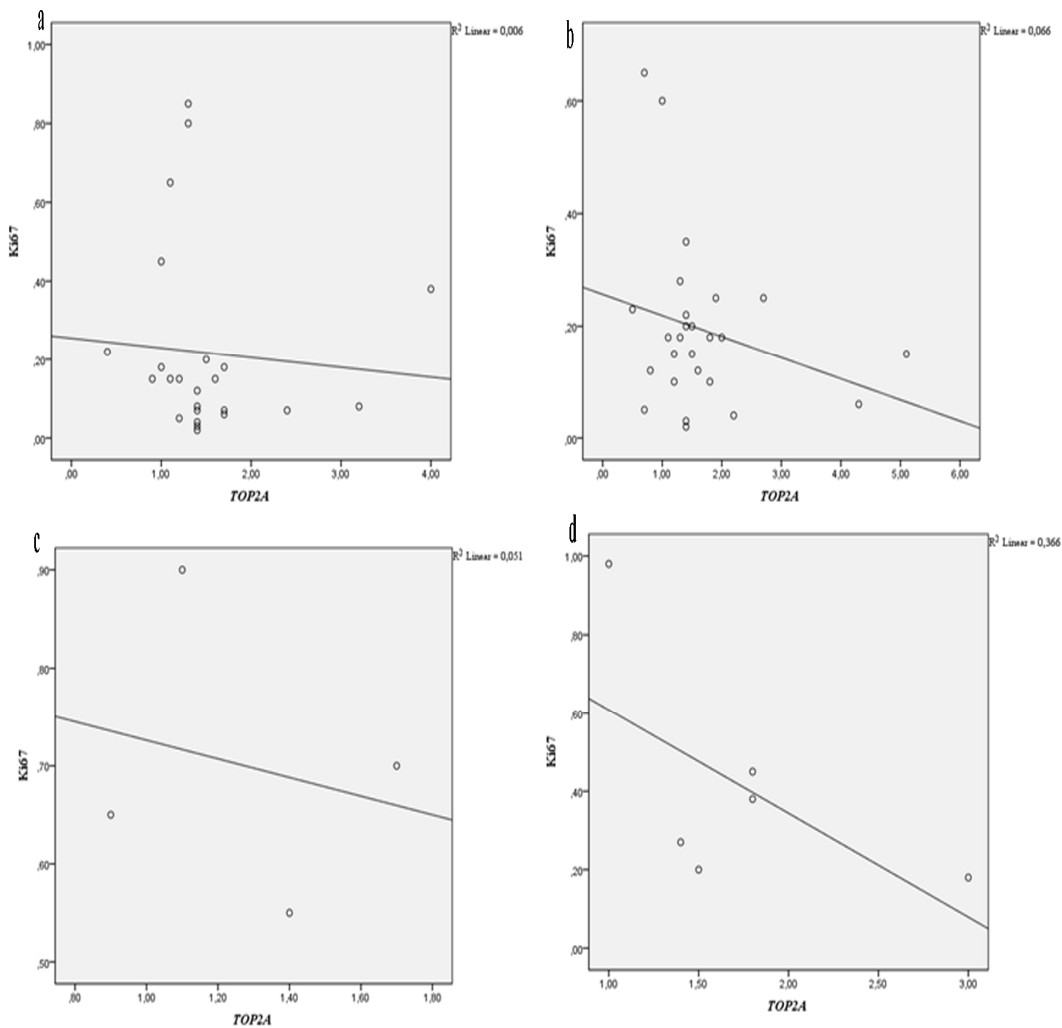
Statističkom analizom nije uočena značajna korelacija između stepena ekspresije Ki67 proteina i genskog statusa *TOP2A* u ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke (grafikon 49). Takođe, odsustvo statistički značajne korelacije između

stepena ekspresije Ki67 proteina i *TOP2A* genskih aberacija zabeležena je kod sva četiri molekularna tipa karcinoma dojke (grafikon 50 a-d). U svim molekularnim grupama korelacija između dva navedena biološka markera pokazuje negativan trend (grafikoni 50 a-d).

Visok nivo amplifikacije *TOP2A* gena je u pet tumora interferirao sa umerenim indeksom proliferacije (5/9, 55.6%) dok je u četiri tumora bio udružen sa minimalnim indeksom proliferacije označenim sa 1 (4/9, 44.4%). Nizak nivo amplifikacije *TOP2A* gena bio je udružen sa minimalnim indeksom proliferacije u tri tumora (3/15, 20%), i u po šest tumora sa umerenim (6/15, 40%) i maksimalnim (6/15, 40%) indeksom proliferacije. Delecija *TOP2A* gena je dominantno bila udružena sa umerenim indeksom proliferacije označenim sa 2 (3/5, 60%), dok je u po jednom tumoru bila udružena sa maksimalnim (1/5, 20%) tj. minimalnim (1/5, 20%) indeksom proliferacije. U najvećem broju tumora nepromenjeni genski status *TOP2A* bio je udružen sa umerenim indeksom proliferacije (14/31, 45.1%) dok je u devet tj. osam tumora bio udružen sa minimalnim (9/31, 29.1%) odnosno maksimalnim (8/31, 25.8%) indeksom proliferacije.



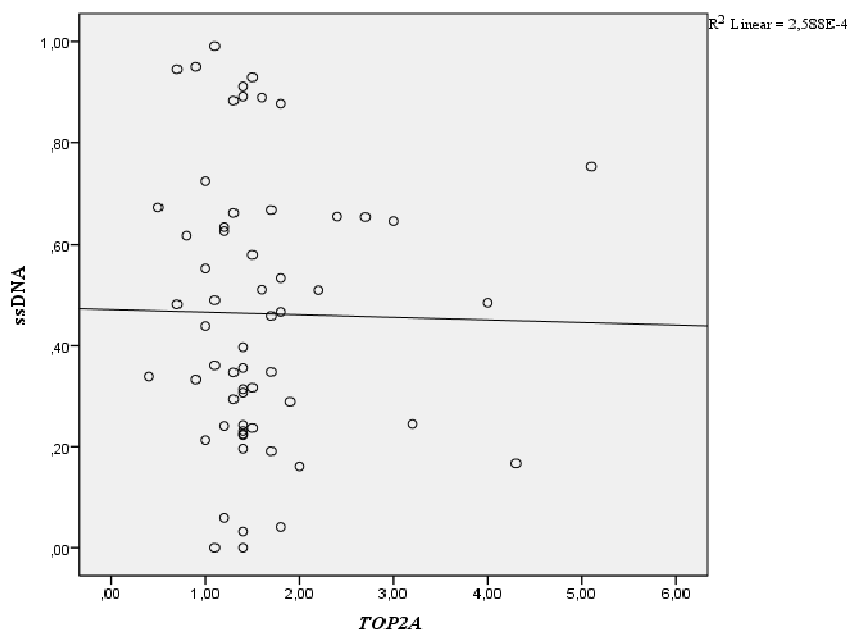
**Grafikon 49.** Korelacija ekspresije proteina Ki67 u odnosu na *TOP2A* genski status kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )



**Grafikon 50.** Korelacija ekspresije proteina Ki67 u odnosu na *TOP2A* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) i HER-2 pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

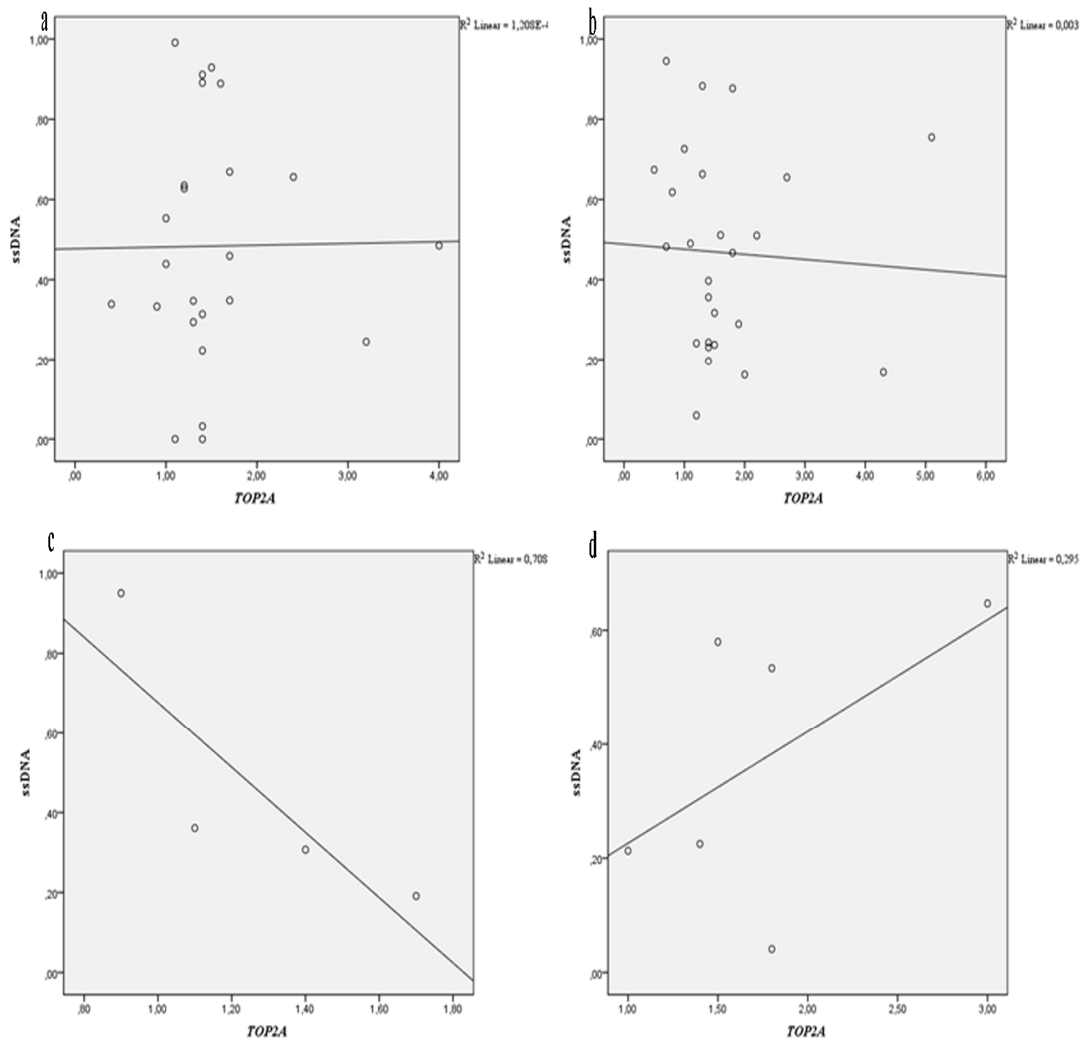
#### IV.5.6. Korelacija ekspresije ssDNA (indeksa apoptoze) u odnosu na genski status *TOP2A*

Statističkom analizom nije uočena značajna korelacija između indeksa apoptoze i stepena modifikacije *TOP2A* gena u ukupnoj ispitivanoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke (grafikon 51). Takođe, statistička analiza korelacije između apoptotskog indeksa i *TOP2A* genskih modifikacija nije pokazala značajnu vezu kada su uzeti u obzir molekularni tipovi (grafikon 52 a-d) karcinoma dojke ispitivani u ovoj studiji.



**Grafikon 51.** Korelacija ekspresije ssDNA u odnosu na *TOP2A* genski status kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )

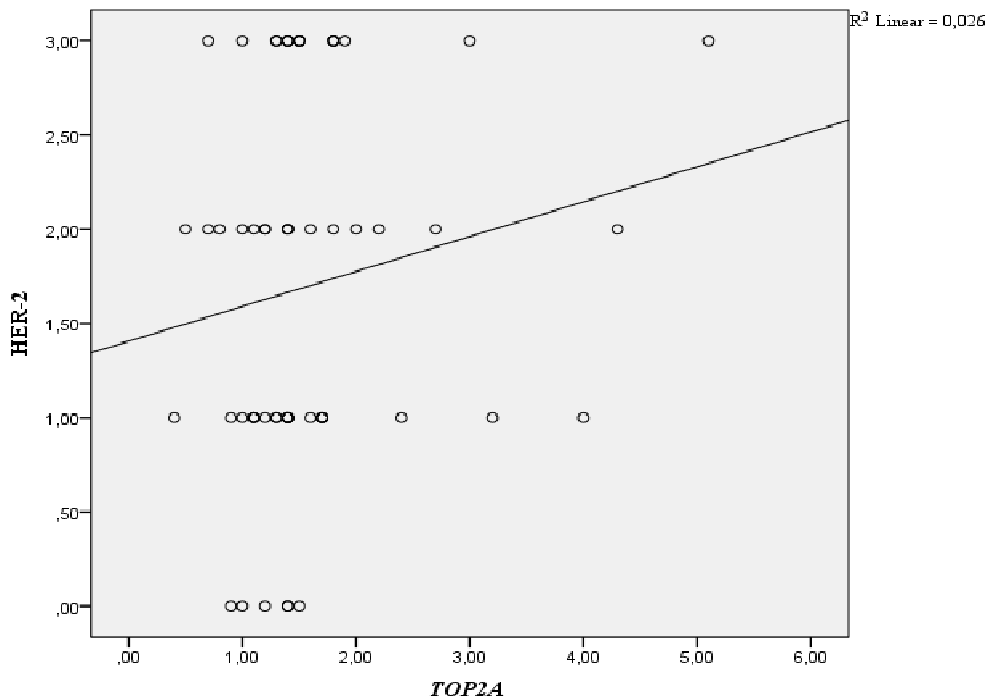
Po sedam tumorskih promena sa niskim nivoom amplifikacije *TOP2A* gena bilo je udružen sa umerenim (7/15, 46.7%) tj. maksimalnim indeksom apoptoze (7/15, 46.7%), dok je samo u jednom slučaju nizak nivo amplifikacije bio udružen sa minimalnim indeksom apoptoze (1/15, 6.6%) u ukupnoj populaciji ispitivanih infiltrativnih dukalnih karcinoma dojke. Pet tumorskih promena koje je odlikovao visok nivo amplifikacije *TOP2A* gena imao je istovremeno i maksimalni indeks apoptoze (5/9, 55.5%), dok je umeren indeks apoptoze u četiri tumora bio udružen sa visokim nivoom *TOP2A* genske amplifikacije (4/9, 44.5%). Dva slučaja delecije bila su udružena sa umerenim indeksom apoptoze (2/5, 40%), dok su tri tumorske promene imale zabeleženu deleciju udruženu sa maksimalnim indeksom apoptoze (3/5, 60%). Nepromenjen genski status *TOP2A* je u najmanjem broju tumora interferirao sa minimalnim indeksom apoptoze (4/31, 12.9%), dok je u najvećem broju tumora bio udružen sa umerenim indeksom apoptoze (17/31, 54.8%). Deset tumorskih promena odlikovao je udruženi fenotip maksimalnog indeksa apoptoze i nepromenjenog *TOP2A* genskog statusa (10/31, 32.3%)



**Grafikon 52.** Korelacija ekspresije ssDNA u odnosu na *TOP2A* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ) luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) i HER-2 pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

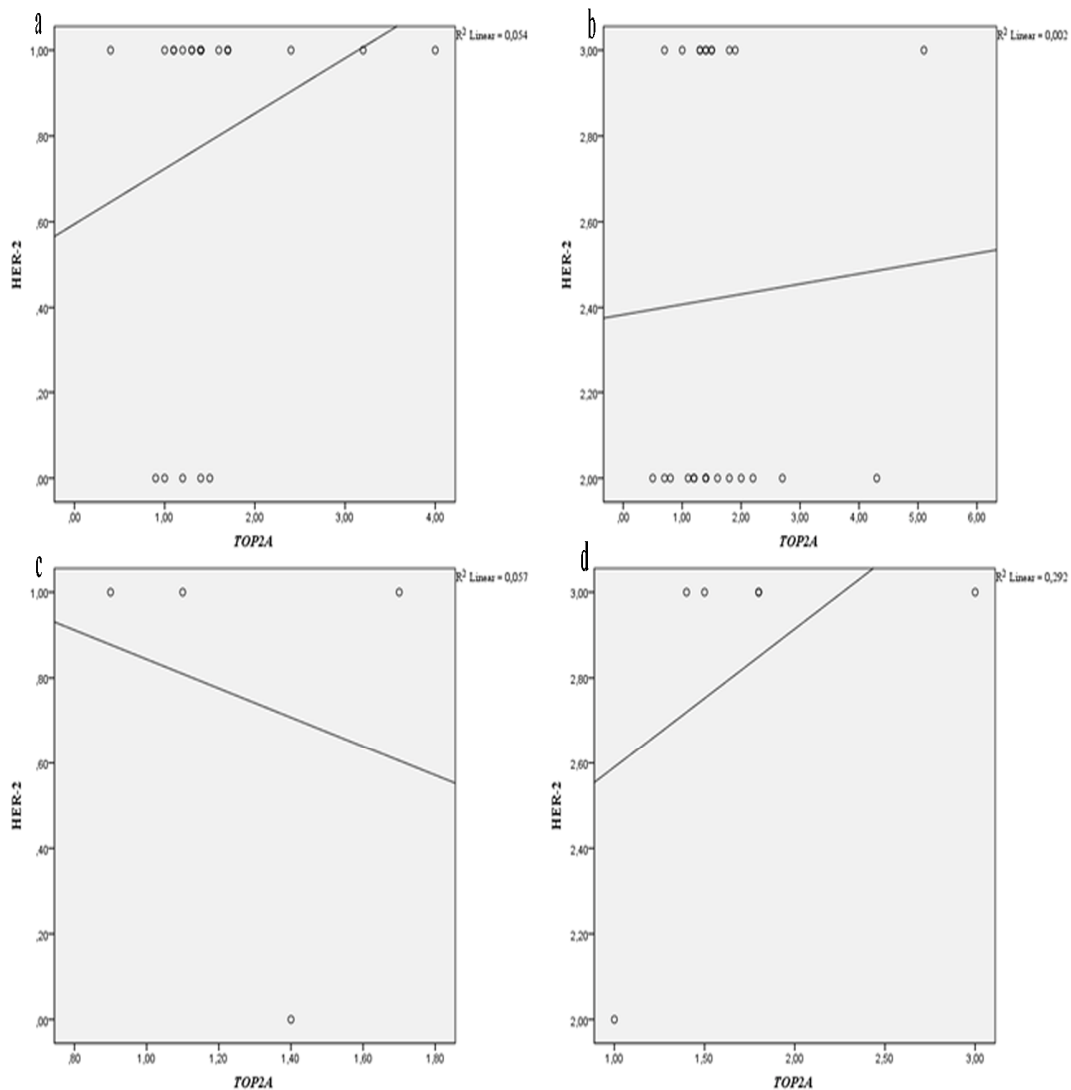
#### IV.5.7. Korelacija ekspresije HER-2 receptora u odnosu na genski status *TOP2A*

Statističkom analizom nije uočena značajna korelacija između stepena ekspresije HER-2 receptora i *TOP2A* genskih aberacija u ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke ispitivanih u ovoj studiji (grafikon 53). Uzevši u obzir poređenje dva navedena markera kod različitih molekularnih tipova karcinoma dojke takođe nije uočena statistički značajna korelacija (grafikon 54 a-d).



**Grafikon 53.** Korelacija ekspresije HER-2 receptora u odnosu na *TOP2A* genski status kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )

Nizak nivo amplifikacije *TOP2A* gena bio je udružen sa pozitivnom ekspresijom HER-2 receptora u devet karcinoma (9/15, 60%), dok je kod šest tumora nizak nivo *TOP2A* genske amplifikacije interferirao sa negativnom ekspresijom HER-2 receptora (6/15, 40%). Visok nivo amplifikacije *TOP2A* gena takođe je dominantno bio udružen sa pozitivnom ekspresijom HER-2 receptora (6/9, 66.7%), dok je kod tri karcinoma visok nivo amplifikacije bio udružen sa negativnom ekspresijom HER-2 receptora (3/9, 33.3%). Delecija je takođe predominantno korelirala sa pozitivnom ekspresijom HER-2 receptora (4/5, 80%), dok je samo u jednom slučaju bila povezana sa negativnom ekspresijom HER-2 receptora (1/5, 20%). Nepromenjen genski status *TOP2A* je predominantno bio udružen sa negativnom ekspresijom HER-2 receptora označenom sa 1 (13/31, 41.9%) i 0 (5/31, 16.1%), dok je u manjem broju tumora bio povezan sa pozitivnom ekspresijom HER-2 receptora označenom sa 2 (7/31, 22.6%) i 3 (6/31, 19.4%).



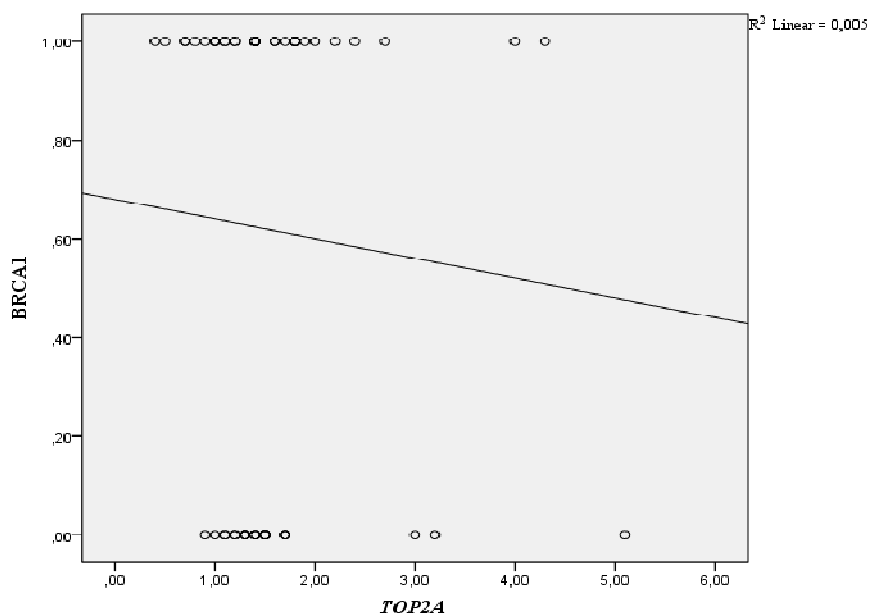
**Grafikon 54.** Korelacija ekspresije HER-2 receptora u odnosu na *TOP2A* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ) luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) i HER-2 pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

#### IV.5.8. Korelacija ekspresije BRCA1 proteina u odnosu na genski status *TOP2A*

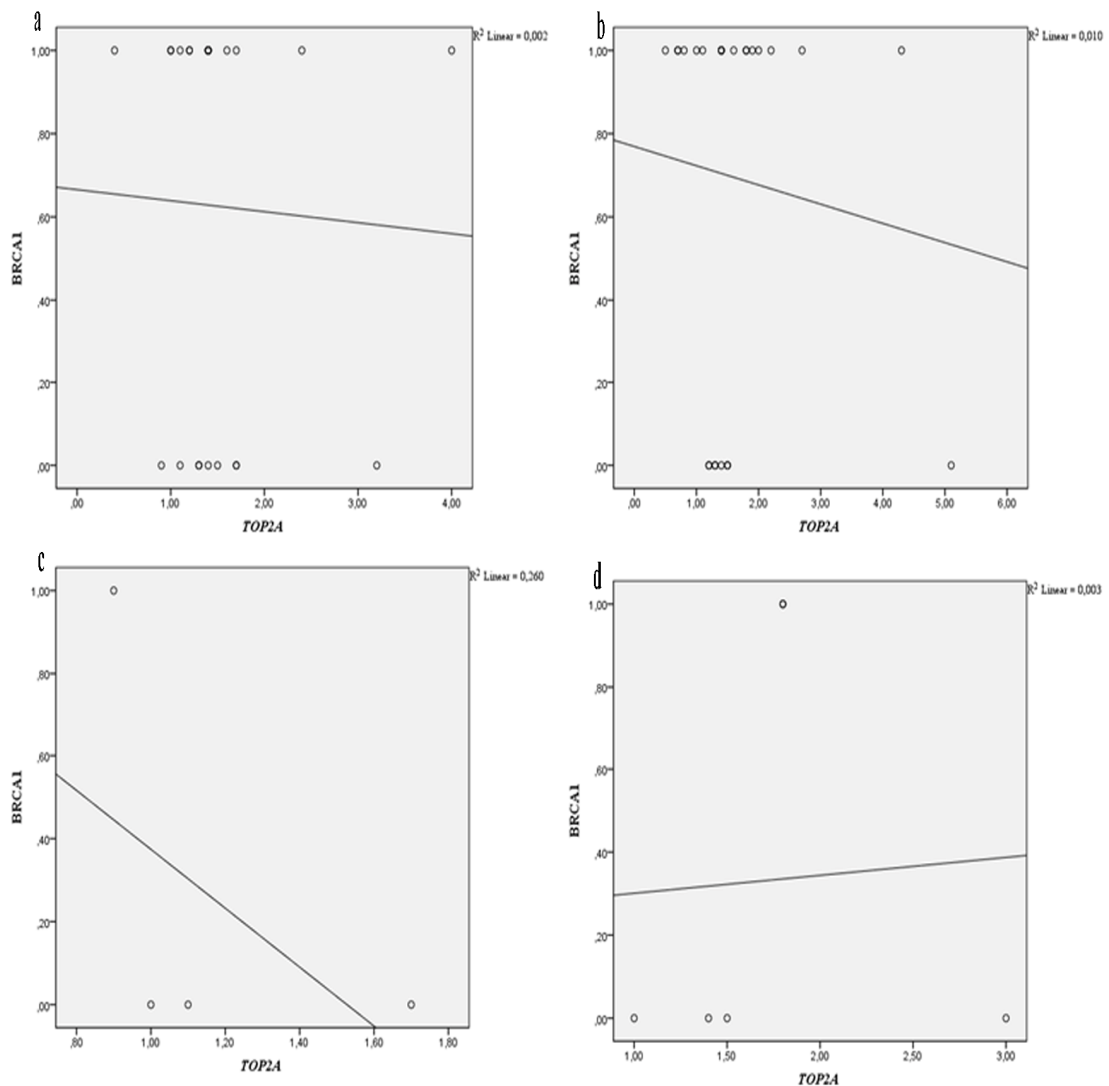
Statističkom analizom nije uočena značajna korelacija između stepena ekspresije BRCA1 proteina i *TOP2A* genskog statusa u ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke ispitivanih u ovoj studiji (grafikon 55). Poređenje ekspresije BRCA1 proteina u odnosu na *TOP2A* genski status kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke takode nije pokazalo statistički značajnu vezu (grafikon 56 a-d). Nizak nivo amplifikacije *TOP2A* gena je u 11 tumorskih promena bio udružen sa pozitivnom ekspresijom BRCA1 proteina (11/15, 73.3%) dok je u 4 tumora bio udružen sa



njegovom negativnom ekspresijom (4/15, 26.7%). Visok nivo amplifikacije je skoro podjednako bio udružen i sa pozitivnom (5/9, 55.5%) i sa negativnom (4/9, 44.5%) ekspresijom BRCA1 proteina. Delecija *TOP2A* gena je u svih 5 tumorskih promena bila udružena sa pozitivnom ekspresijom BRCA1 proteina. Nepromenjen genski status *TOP2A* je u 16 tumora bio udružen sa pozitivnom ekspresijom BRCA1 proteina (16/31, 51.6%), dok je u 15 tumora bio udružen sa negativnom ekspresijom BRCA1 proteina (15/31, 48.4%).



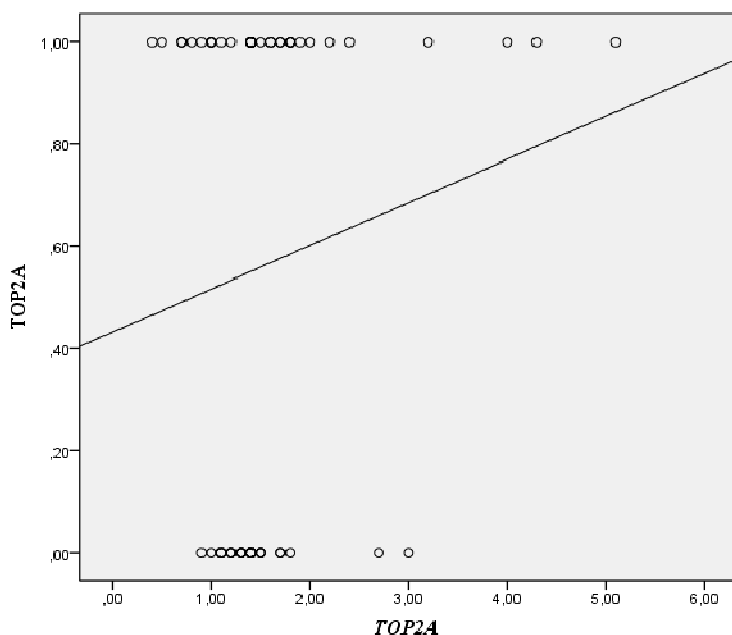
**Grafikon 55.** Korelacija ekspresije BRCA1 proteina u odnosu na *TOP2A* genski status kod infiltrativnog duktalnog karcinoma dojke ( $p > 0.05$ )



**Grafikon 56.** Korelacija ekspresije BRCA1 proteina u odnosu na *TOP2A* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ) luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) i HER-2 pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

#### IV.5.9. Korelacija ekspresije TOP2A proteina u odnosu na genski status *TOP2A*

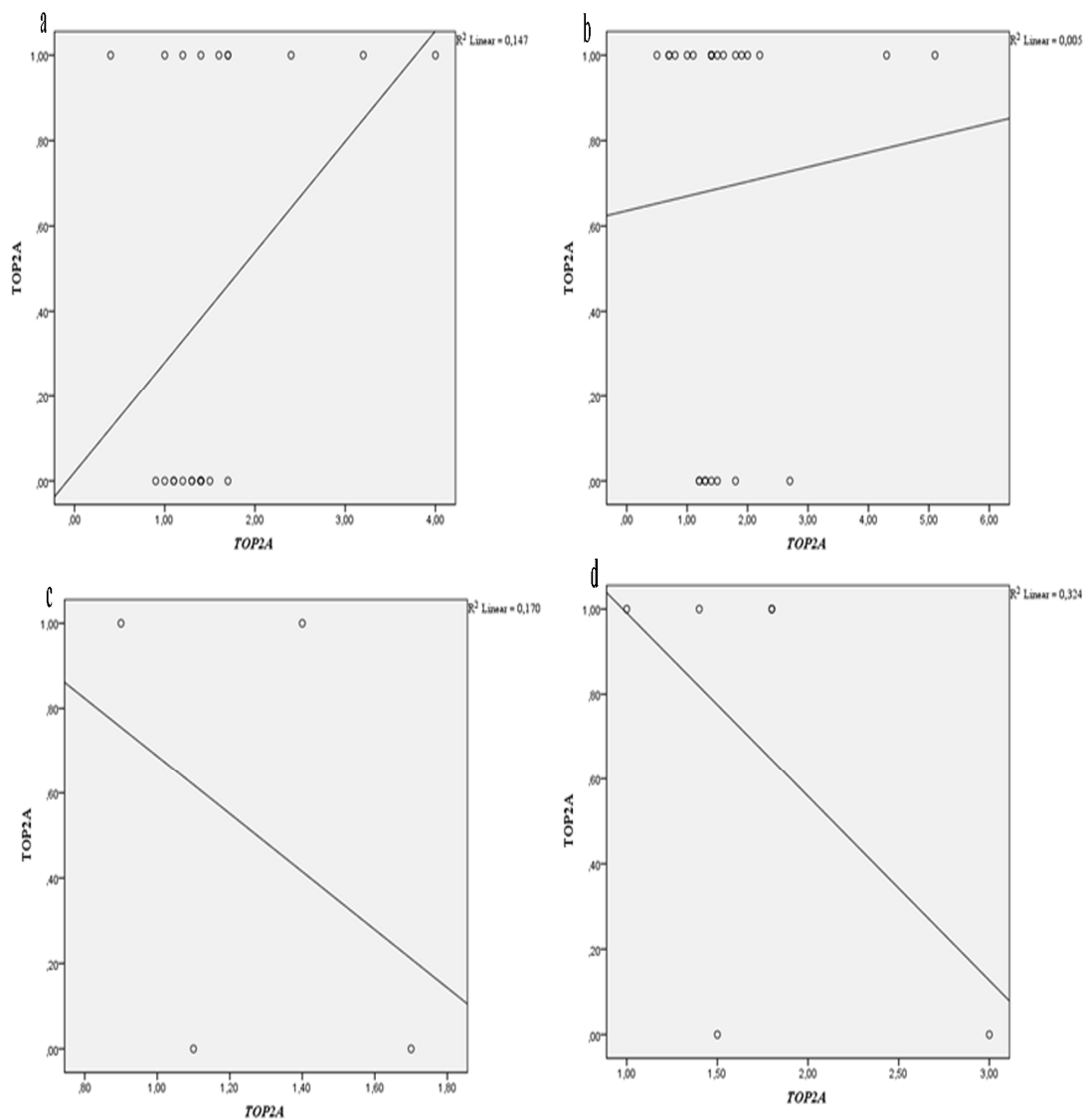
Statističkom analizom nije uočena značajna korelacija između stepena ekspresije TOP2A proteina i genskog statusa *TOP2A* u ukupnoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke ispitivanih u ovoj studiji (grafikon 57).



**Grafikon 57.** Korelacija ekspresije TOP2A proteina u odnosu na *TOP2A* genski status kod infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke ( $p>0.05$ )

Korelacija između ekspresije TOP2A proteina i njegovog gena imala je pozitivan trend u luminalnom A (grafikon 58 a) i luminalnom B (grafikon 58 b) tipu karcinoma dojke, dok je odnos između dva biološka markera u trostruko negativnom (grafikon 58 c) i HER-2 pozitivnom (grafikon 58 d) tipu pokazao negativan trend.

U ukupnoj ispitivanoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke pozitivna ekspresija TOP2A proteina bila je udružena sa niskim nivoom amplifikacije *TOP2A* gena u devet tumorskih promena (9/15, 60%) u osam sa visokim nivoom amplifikacije (8/9, 88.9%), u četiri tumora sa delecijom *TOP2A* gena (4/5, 80%) i u 13 tumora sa nepromenjenim genskim statusom *TOP2A* (13/31, 41.9%). Negativna ekspresija TOP2A proteina bila je udružena sa niskim nivoom amplifikacije u šest tumora (6/15, 40%), u jednom tumoru je bila povezana sa visokim nivoom amplifikacije (1/9, 11.1%), u jednom tumoru sa delecijom *TOP2A* gena (1/5, 20%) i u 18 tumora sa nepromenjenim genskim statusom *TOP2A* (18/31, 58.1%).



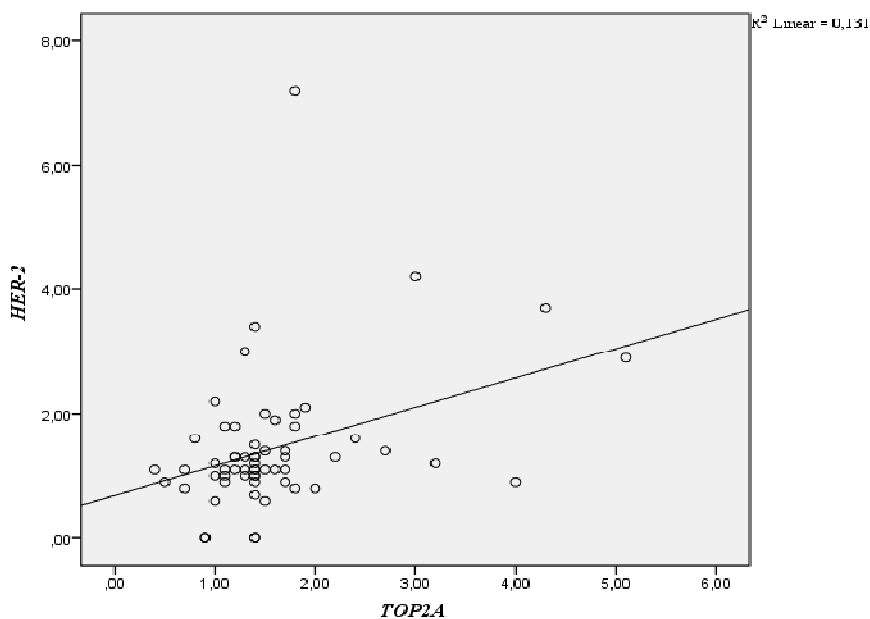
**Grafikon 58.** Korelacija ekspresije TOP2A proteina u odnosu na *TOP2A* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ) luminalnog B (b,  $p > 0.05$ ), trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) i HER-2 pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

#### IV.5.10. Korelacija između *HER-2* i *TOP2A* genskih statusa

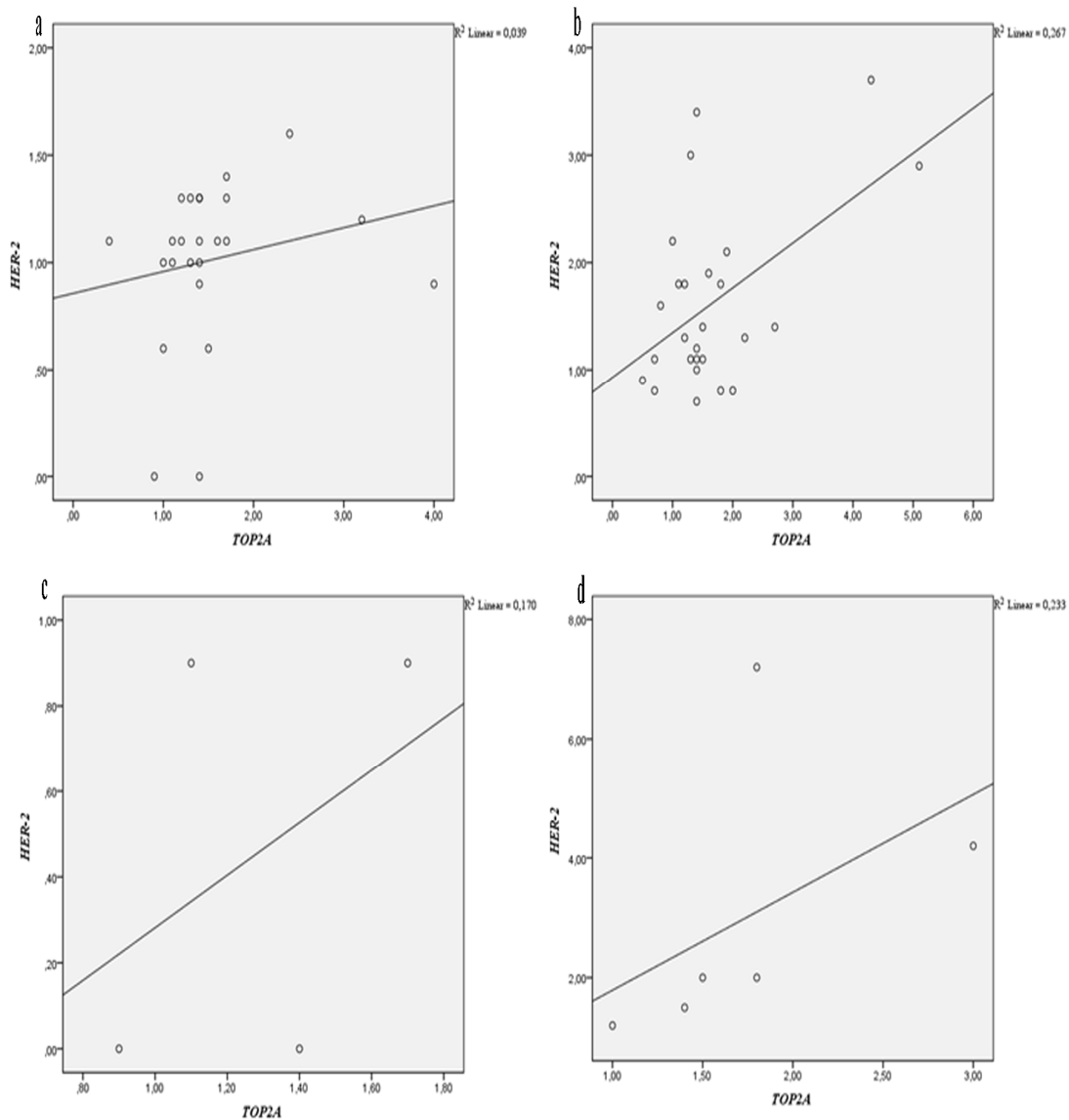
Statističkom analizom Pearsonove korelacije uočena je visoko statistički značajna pozitivna korelacija između genskih statusa *HER-2* i *TOP2A* ( $p < 0.01$ ) u ukupnoj ispitivanoj populaciji infiltrativnih duktalnih karcinoma dojke ([grafikon 59](#)). Uzevši u obzir poređenje dva navedena markera kod različitih molekularnih tipova karcinoma dojke statistički značajna pozitivna korelacija uočena je u luminalnom B tipu

karcinoma dojke ( $p < 0.01$ ) (grafikon 60 b), dok je odsustvo značajnosti zabeleženo kod preostale tri molekularne grupe (grafikoni 60 a, 60 c, 60 d).

Nizak nivo amplifikacije *TOP2A* gena bio je udružen sa visokim nivoom amplifikacije *HER-2* gena u četiri tumora (4/15, 26.6%), u dva tumora sa niskim (2/15, 13.4%) i u devet tumora sa nepromenjenim genskim statusom *HER-2* (9/15, 60%). Pet tumora sa visokim nivoom amplifikacije *TOP2A* gena imao je istovremeno i nepromenjen nivo *HER-2* gena (5/9, 55.6%), jedan tumor je imao nizak (1/9, 11.1%) a u tri tumora je zabeležen visok nivo amplifikacije *HER-2* gena (3/9, 33.3%). Delecija *TOP2A* gena bila je u četiri tumora udružena sa nepromenjenim *HER-2* genskim statusom (4/5, 80%) i u jednom tumoru sa niskim nivoom amplifikacije *HER-2* gena (1/5, 20%).



**Grafikon 59.** Korelacija genskog statusa *HER-2* u odnosu na *TOP2A* genski status kod infiltrativnog duktalnog karcinoma dojke ( $p < 0.01$ )



**Grafikon 60.** Korelacija genskog statusa *HER-2* u odnosu na *TOP2A* genski status kod luminalnog A (a,  $p > 0.05$ ), luminalnog B (b,  $p < 0.01$ ), trostruko negativnog (c,  $p > 0.05$ ) i *HER-2* pozitivnog (d,  $p > 0.05$ ) tipa karcinoma dojke

## V DISKUSIJA

### V.1. KLINIČKI PODACI

Karcinom dojke, zajedno sa kardiovaskularnim oboljenjima, predstavlja najzastupljeniji uzrok smrtnosti u savremenom svetu, kada je u pitanju ženska populacija. Incidenca karcinoma dojke kod žena u Zapadnoj Evropi i SAD iznosi 70-202/120.000 žena, što ovo oboljenje svrstava na prvo mesto po učestalosti u svetskoj populaciji <sup>1</sup>. Kod žena u Srbiji naročito su izražene starosno specifične kategorije tako da se karcinom dojke najčešće javlja u populaciji žena staroj između 70 i 75 godina života sa incidencom 350/100.000, dok se u mlađoj uzrasnoj kategoriji, između 45 i 50 godine, javlja sa učestalošću 200/100.000 <sup>2</sup>. U Srbiji se godišnje zabeleži 3500 novoobolelih žena sa karcinomom dojke što našu zemlju svrstava u zemlje visokog rizika <sup>2</sup>.

Naša studija je sprovedena na ukupno 60 tkivnih uzoraka infiltrativnog karcinoma dojke – 24 (ili 40%) luminalnog A, 26 (43.4%) luminalnog B, 4 (6.6%) trostruko negativnog i 6 (10%) karcinoma HER-2 pozitivnog molekularnog tipa. Naši rezultati koji se odnose na opštu zastupljenost pojedinačnih tipova karcinoma dojke su u saglasnosti sa literaturnim podacima koji takođe ukazuju na to da su luminalni tipovi karcinoma dojke najzastupljeniji u opštoj ženskoj populaciji <sup>100</sup>.

Prema podacima naše studije najveći broj pacijentkinja sa infiltrativnim karcinomom dojke, njih 52/60 (86.6%), imao je više od 50 godina. U ovoj starosnoj kategoriji nalazio se najveći broj pacijentkinja sa karcinomima luminalnog A (21/24, 87.5%), luminalnog B (22/26, 84.6%), trostruko negativnog (3/4, 75%) i sve pacijentkinje HER-2 pozitivnog (6/6, 100%) molekularnog tipa.

Grupu standardnih kliničko-patoloških prognostičkih faktora značajnih kod karcinoma dojke čine stepen zahvaćenosti limfnih nodusa, histološki gradus i veličina tumora <sup>37</sup>. Najveći broj infiltrativnih karcinoma dojke (bez obzira na molekularnu klasifikaciju) obuhvaćenih ovom studijom, 37.5% (18/48), imao je tumor čija je veličina bila ispod 2 cm u prečniku (pT1). Ovaj princip je zadržan i kod karcinoma iz grupe luminalnog A (9/24, 37.5 %) i luminalnog B (8/26, 30.8 %) tipa, dok su tumori iz dva preostala molekularna tipa bili većeg dijametara. Tumore trostruko negativnog tipa karcinoma dojke je takođe karakterisala i direktna zahvaćenost zida grudnog koša ili

kože, a bili su različite veličine (pT4) (3/4, 75%), što ukazuje na agresivnije forme ovih tumora i lošiju prognozu ishoda same bolesti u odnosu na luminalne tipove karcinoma dojke.

Najveći broj ispitanica obuhvaćenih ovom studijom, njih 24 (48.9%) u momentu hirurške intervencije nije imao zahvaćene regionalne limfne noduse, dok je infiltraciju u ipsilateralnim limfnim nodusima (pN1) kao i infiltraciju u ipsilateralnim limfnim nodusima međusobno povezanim sa drugim strukturama (pN2) imalo po deset ispitanica. Zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa je bila znatno prisutnija u tumorskom tkivu pacijentkinja trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog molekularnog tipa u odnosu na tumore pacijentkinja luminalne grupe što je u skladu sa literaturnim podacima<sup>99</sup>.

Od svih karcinoma obuhvaćenih ovom studijom njih 52.1% (25/48) karakterisala je umerena diferentovanost tumora histološkog gradusa G2, u 12.5% (6/48) tj. 35.4% (17/48) slučajeva u pitanju su bili dobro diferentovani tumori histološkog gradusa G1 i slabo diferentovani tumori histološkog gradusa G3. Ukoliko se uzmu u obzir molekularni tipovi karcinoma dojke, grupu luminalnih tipova karakterisalo je prisustvu umereno diferentovanih tumora, dok je grupu trostruko negativnih i HER-2 pozitivnih tipova karakterisalo dominantno prisustvo slabo diferentovanih tumora.

Imajući u vidu kratak vremenski period praćenja pacijentkinja (četiri godine), od hirurške intervencije do publikovanja ovih rezultata, opravdana je slika da je metastaza prisutna kod malog broja pacijentkinja (7), od kojih su četiri imale karcinom koji je pripadao luminalnom B tipu, dok je po jedna pacijentkinja iz tri preostala molekularna tipa takođe imala zabeleženu metastazu.

Najveći broj pacijentkinja sa luminalnim A i B tipom karcinoma dojke podvrgnut je kombinaciji hemoterapijskih agenasa (AC, CMF), hormonske terapije (tamoksifen, nolvadeks) i terapije zračenjem. Kombinacija hemoterapijskih agenasa je poslužila i kao osnovni terapijski protokol kod pacijentkinja sa trostruko negativnim i HER-2 pozitivnim tipom karcinoma dojke. Herceptin je primenjen kod šest pacijentkinja iz grupe luminalnog B tipa i kod dve pacijentkinje iz grupe HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke.

Samo su dve pacijentkinje od ukupno 60 tokom četvorogodišnje studije praćenja



imale smrtni ishod koji je nastupio kao posledica ove bolesti. Preživljavanje bez znakova recidiva bolesti zabeleženo je kod 39 ispitanica (65%). Obe pacijentkinje sa smrtnim ishodom su pripadale luminalnom A tipu karcinoma dojke. Prosečno najduži period opšteg preživljavanja karakterisao je pacijentkinje iz grupe HER-2 pozitivnog molekularnog tipa karcinoma dojke, dok je najkraće preživljavanje karakterisalo pacijentkinje sa najagresivnijim oblikom karcinoma tj. trostruko negativnim molekularnim tipom.

## V.2. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKE MOLEKULARNIH TIPOVA KARCINOMA DOJKE – OPŠTA RAZMATRANJA

Rezultati koji se odnose na procenu stepena ekspresije određenih bioloških markera uključujući: ER-R, PR-R, HER-2, p53, Bcl-2, Ki67 (indeks proliferacije), ssDNA (indeks apoptoze), BRCA1, TOP2A, na procenu genskog statusa *HER-2* i *TOP2A*, kao i paralelni prikaz stepena ekspresije kod ispitanica razvrstanih u četiri molekularna tipa karcinoma dojke, pokazali su određene pravilnosti.

**Luminalni A** tip karcinoma dojke karakteriše molekularni fenotip sa ER-R (100%) i PR-R (91.6%) pozitivnom ekspresijom i negativnom ekspresijom HER-2 receptora (100%). Takođe, većinu karcinoma iz ove molekularne grupe karakterisala je izrazito očuvana ekspresija Bcl-2 proteina označena u bod sistemu sa 2 i 3 (20/24, 83.4%). U oko polovine karcinoma registrovana je prekomerna akumulacija p53 proteina označena u bod sistemu sa 2 i 3 (13/24, 54.2%), dok je apoptotski indeks bio najveći kod ove grupe ispitanica u odnosu na ostale molekularne grupe karcinoma dojke. Nizak i visok nivo *TOP2A* genske amplifikacije zabeležen je kod 33.4% (8/24) karcinoma, dok je delecija zastupljena samo kod jednog karcinoma (4.2%). Nizak nivo *HER-2* genske amplifikacije registrovan je kod jednog karcinoma 4.2% (1/24). Pozitivna ekspresija BRCA1 proteina zabeležena je u više od polovine karcinoma (15/24, 62.5%), dok je ekspresija TOP2A proteina bila nešto manje zastupljena (10/24, 41.7%).

Drugu grupu čini takozvani **luminalni B** tip karcinoma dojke koji je vrlo sličan po svom molekularnom fenotipu luminalnom A tipu karcinomu dojke od koga se razlikuje samo po pozitivnoj ekspresiji HER-2 receptora. Pozitivna ekspresija ER-R je

registrovana u svim karcinomima luminalnog B tipa, dok je ekspresija PR-R zabeležena u (20/26) 76.9% karcinoma. Prekomerna akumulacija p53 proteina označena u bod sistemu sa 2 i 3 prisutna je kod 69.3% (18/26) karcinoma sa luminalnim B tipom. U oko trećine tumora registrovana je izrazito očuvana ekspresija Bcl-2 proteina označena u bod sistemu sa 2 i 3 (17/26, 65.4%), dok je HER-2 receptor bio pozitivno eksprimiran u karcinomima svih ispitanica iz ove grupe. Takođe, ove tumore je u oko polovine slučajeva karakterisala amplifikacija *HER-2* gena (42.3%, 11/26), dok je genska modifikacija *TOP2A* gena, koja uključuje i amplifikaciju i deleciju, bila zastupljena kod 57.7% karcinoma (15/26). Pozitivna ekspresija BRCA1 i TOP2A proteina zastupljena je kod istog broja karcinoma ovog molekularnog tipa (18/26, 69.2%).

**Trostruko negativni** tumori, koji su ER-R, PR-R i HER-2 negativni, svrstani su u treću molekularnu kategoriju karcinoma dojke. Prekomerna ekspresija p53 (4/4, 100%) registrovana je u karcinomima svih ispitanica iz ove grupe, dok je kod polovine tumora registrovana i očuvana ekspresija Bcl-2 proteina (2/4, 50%). Indeks proliferacije je bio izrazito visok u svim karcinomima ispitanica iz ove molekularne grupe, dok je apoptotski indeks niži u odnosu na tumore luminalnih grupa karcinoma dojke. Genske modifikacije *HER-2* i *TOP2A* su slabo zastupljene u ovoj grupi ispitanica, naime samo u jednom tumoru zabeležen je nizak nivo amplifikacije *TOP2A* gena. Pozitivna ekspresija BRCA1 i TOP2A proteina zastupljena je kod istog broja karcinoma ovog molekularnog tipa (2/4, 50%).

Četvrtu grupu čini **HER-2 pozitivni tip** karcinoma dojke koga karakteriše amplifikacija gena za HER-2 receptor i amplifikacija nekoliko drugih gena koji se nalaze na hromozomu 17 (najčešće *TOP2A* gen koji je ispitivan i u našoj studiji). Najupečatljivija fenotipska karakteristika ove molekularne grupe odnosi se na potpuno odsustvo ekspresije Bcl-2 proteina. Takođe, izuzetno upečatljiva osobina ovih tumora odnosi se na prisustvo genske amplifikacije za *HER-2* kod 83.3% ispitanica, dok je *TOP2A* amplifikovan kod 66.7% ispitanica. Pozitivna ekspresija HER-2 receptora je zabeležena kod svih ispitanica, dok su ER-R i PR-R receptori imali negativan status. Pozitivna ekspresija TOP2A proteina zabeležena je u karcinomima ispitanica sa prisutnom amplifikacijom *TOP2A* gena (4/6, 66.7%), dok je pozitivna ekspresija BRCA1 proteina zastupljena samo u dve tumorske promene (2/6, 33.3%).

### V.2.1. ER-R i PR-R kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

Literaturni podaci ranije sprovedenih studija pokazali su da je povišena ekspresija ER-R i PR-R učestalija kod pacijentkinja sa luminalnim molekularnim tipovima karcinoma dojke u odnosu na trostruko negativne i HER-2 pozitivne molekularne tipove karcinoma dojke <sup>100</sup>. Imajući u vidu da je ekspresija ova dva steroidna receptora jedan od ključnih markera za razlikovanje osnovnih molekularnih tipova, opravdana je i njihova različita učestalost u ovim grupama karcinoma dojke.

Ekspresija ER-R i PR-R ima ulogu i kao prediktivni i kao prognostički marker kod pacijentkinja sa karcinomom dojke. Naime, precizno određivanje ekspresije ovih steroidnih receptora igra značajnu ulogu u odabiru odgovarajuće hormonske terapije kod ovih pacijentkinja <sup>101</sup>. Luminalni tipovi karcinoma dojke imaju veću verovatnoću da dobro odgovore na hormonsku terapiju u odnosu na trostruko negativne i HER-2 pozitivne tipove karcinoma dojke jer njihov primarni tumor eksprimira i ER-R i PR-R za razliku od druga dva tipa karcinoma dojke <sup>101</sup>. Kao što je već naglašeno, ER-R i PR-R, osim značaja u predviđanju odgovora na hormonsku terapiju, označeni su i kao prognostički faktori ishoda bolesti kod karcinoma dojke. Naime, biološka aktivnost određenog broja gena regulisana je delovanjem steroidnih receptora <sup>102</sup>. Ovi geni su uglavnom uključeni u proces aktivacije i regulacije ćelijskog ciklusa, a danas se pretpostavlja da su steroidni receptori presudni u procesu pojave i razvoja karcinoma dojke i njegovom odgovoru na hormonsku terapiju <sup>102</sup>.

Pozitivan prognostički značaj ER-R dokazan je u nedavno sprovedenoj studiji čiji su rezultati pokazali da pacijentkinje koje imaju visoku ekspresiju ER-R imaju sedam puta manju verovatnoću od ponovnog javljanja bolesti tokom petogodišnjeg perioda u odnosu na pacijentkinje sa negativnom ekspresijom ER-R, nakon terapije tamoksifenom <sup>12</sup>. Pored ER-R, veliki prognostički i prediktivni značaj pripisuje se i PR-R <sup>12</sup>. Pacijentkinje sa progresivnim oblicima karcinoma dojke imaju veću verovatnoću da pozitivno odgovore na hormonsku terapiju ukoliko njihov primarni tumor eksprimira istovremeno i ER-R i PR-R, nasuprot onim koji sadrže samo ER-R ili samo PR-R. Međutim, prognostički značaj ER-R je ipak daleko veći u odnosu na poznavanje statusa PR-R <sup>10,12,103</sup>.

Ekspresija ER-R i PR-R poslužila je kao jedan od osnovnih kriterijuma za podjelu karcinoma dojke na odgovarajuće molekularne tipove tako da je u luminalnim tipovima ekspresija bila pozitivna a u trostruko negativnom i HER-2 pozitivnom tipu karcinoma dojke ekspresija je bila negativna. Takođe u prethodnim studijama je pokazano da između ekspresije ER-R i amplifikacije *HER-2* gena postoji statistički značajna negativna korelacija što se pokazalo kao slučaj i u poređenju PR-R sa amplifikacijom *HER-2* gena <sup>102</sup>.

Sismondia je u svojoj studiji iz 2007. godine pokazao da su tumori dojke negativnog steroidnog receptorskog statusa obično veličine preko 2 cm u dijametru, visokog histološkog gradusa, nekrotični i da imaju prekomernu ekspresiju HER-2 receptora i amplifikaciju njegovog gena <sup>102</sup>. U istoj studiji je takođe potvrđeno da pacijentkinje sa negativnim receptorskim statusom imaju lošiji ishod bolesti, agresivniji tok i kraće preživljavanje bez pojave recidiva <sup>102</sup>. Rezultati naše studije su pokazali da su tumori većine pacijentkinja sa niskim nivoom amplifikacije *HER-2* gena imali istovremeno i pozitivnu ekspresiju ER-R (6/7, 85.7%), dok je visok nivo genske amplifikacije bio skoro podjednako udružen i sa negativnom i sa pozitivnom ekspresijom ER-R (ER-R<sup>-</sup>/*HER-2* vna: 4/10, 40% i ER-R<sup>+</sup>/*HER-2* vna: 6/10, 60%). Odnos između genskih aberacija *TOP2A* gena i ekspresije steroidnih receptora je takođe bio negativan, ali bez statističke značajnosti. Rody je u svojoj studiji iz 2009. godine pokazao da veza između nivoa ekspresije ER-R i genskog statusa *TOP2A* ima prediktivni značaj kod pacijentkinja sa karcinomom dojke <sup>104</sup>. Naime, pacijentkinje sa pozitivnom ekspresijom ER-R i niskim nivoom amplifikacije *TOP2A* gena imaju duži period preživljavanja bez pojave recidiva ili metastaze bolesti u odnosu na pacijentkinje sa ER-R<sup>+</sup> i visokim nivoom amplifikacije *TOP2A* gena <sup>104</sup>.

Prema dosadašnjim rezultatima, visok nivo ekspresije steroidnih receptora ukazuje na dobar ishod bolesti, slabije napredovanje i dobar odgovor na hormonsku terapiju tamoksifenom <sup>101</sup>. Na osnovu molekularnih karakteristika i ekspresije steroidnih receptora, proizilazi da dobar odgovor na hormonsku terapiju tamoksifenom i dugačak postterapijski period bez pojave recidiva imaju pacijentkinje iz grupe luminalnih tipova karcinoma dojke, dok one iz grupe trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog tipa imaju lošiji odgovor i kraće preživljavanje.

## V.2.2. Tumor supresorni protein p53 kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke

Tumor supresorni protein p53 obavlja ulogu zaštitnika ćelije od različitih genetičkih poremećaja koji uvode ćeliju u apoptozu i dovode do smrti<sup>18</sup>. Biološka uloga p53 se svodi na vezivanje za oštećeni region DNK i aktivaciju reparacije nastalog oštećenja. Takođe, p53 u slučajevima nemogućnosti reparacije oštećene DNK indukuje zaustavljanje ćelijskog ciklusa i aktiviranje procesa apoptoze u ćeliji<sup>17,18</sup>. Ćelije u kojima je došlo do inaktivacije p53 imaju napredniji rast u odnosu na okolne ćelije<sup>105,106</sup>.

Mutacije, germinativne i somatske, u tumor supresornom genu *TP53* čine nosioca mutacija predodređenim za nastanak različitih karcinoma, uključujući i karcinom dojke<sup>106</sup>. Ispitivanja na ovom genu su do sada potvrdila postojanje 15.000 somatskih i 196 germinativnih mutacija<sup>18,106</sup>. Somatske mutacije gena *TP53* su najčešće prisutne kod sporadičnih karcinoma, uključujući i karcinom dojke. Ovaj vid mutacija je prisutan u oko 12-50% karcinoma dojke, i povezan je sa lošom prognozom ishoda bolesti, dok su germinativne mutacije znatno ređe i prisutne su samo u 1% svih karcinoma dojke<sup>106</sup>. Prema osnovnoj hipotezi mutacije u *TP53* genu dovode do pojave malignih tumora koji su izrazito invazivni, slabo diferentovani i visokog histološkog gradusa. Ovi rezultati idu u prilog našoj studiji koja je pokazala da je pozitivna ekspresija tumor supresornog proteina p53 daleko više zastupljena kod pacijentkinja iz grupe trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke u odnosu na luminalne tipove karcinoma dojke. Somatske mutacije u *TP53* genu su uglavnom tačkaste mutacije (93.6%) i nastaju kao rezultat zamene jedne aminokiseline drugom<sup>18</sup>. Spektar ovih tačkastih mutacija se jako razlikuje u odnosu na mutacije koje se viđaju u drugim tumor supresornim genima<sup>18</sup>. Naime, u ovim drugim slučajevima, mutacije koje pogađaju gene, bilo da su u pitanju delecije ili zamene delova gena rezultuju potpunim gubitkom proteinske ekspresije. Međutim, mutacije koje se dešavaju u *TP53* genu, a koje nastaju kao rezultat zamene jedne baze drugom, u većini tumorskih ćelija dovode do zadržavanja sposobnosti ekspresije izmenjene tj. mutirane forme p53 proteina, koji su znatno stabilniji i prisutni su u ćeliji u znatno većoj koncentraciji od nemutiranog proteinskog oblika p53 proteina<sup>18,106</sup>.

Prema jednoj od hipoteza, objašnjenje za ovu pojavu leži u činjenici da se mutirani oblik proteina ponaša kao dominantni inhibitor wild type p53 i funkcionira kao tetramer u ćeliji <sup>107</sup>. Tumori u kojima dolazi do nagomilavanja mutacija u *TP53* genu uglavnom gube heterozigotnost tokom vremena, što ukazuje na to da efikasnost dominantno-negativne inhibicije nije kompletna i da najčešće zavisi od prirode početne tačkaste mutacije <sup>108</sup>. Sa druge strane, tumori koji u svojim ćelijama zadržavaju wild type proteina p53 uglavnom kao posledicu imaju nagomilavanje defekata u putevima koji vode stabilizaciji p53 ili u efektorima apoptotske aktivnosti p53. Stabilizacija p53 povezana je sa inhibicijom funkcije MDM2 proteina, a poremećaji u putu zaustavljanja aktivnosti MDM2 su česti u tumorima koji zadržavaju wild type p53 <sup>22,107,108</sup>.

U ovoj studiji, u koju je bilo uključeno 60 uzoraka infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke, prema dobijenim rezultatima proizilazi da je pozitivna ekspresija proteina p53 ispoljena u 81.7% karcinoma, dok je maksimalan nivo ekspresije označen sa 3 zabeležen kod 18.3% karcinoma dojke. Prosečno najveći stepen pozitivne ekspresije p53 proteina karakterisao je karcinome ispitanica sa trostruko negativnim tipom, a najmanji stepen ekspresije zabeležen je u karcinomima ispitanica luminalnog A tipa.

Guarneri je u svojoj studiji koju je sproveo na 154 pacijentkinje pokazao da je pozitivna ekspresija p53 povezana sa visokim indeksom proliferacije, slabijom diferenciranošću tumora i da ukazuje na agresivniji tok i lošiju prognozu same bolesti <sup>107</sup>. Takođe, Sarode je 2011. godine pokazao da je kod HER-2 pozitivnog i trostruko negativnog tipa karcinoma dojke povećana ekspresija p53 proteina kao i indeks proliferacije u odnosu na luminalne tipove karcinoma dojke, što je u saglasnosti sa rezultatima naše studije <sup>108</sup>.

Statističkom analizom naših rezultata nije pokazana značajna razlika u nivou ekspresije p53 proteina između starosnih kategorija ispitanica kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke. Međutim, bez obzira na izostanak statističke značajnosti poređenjem razlike u ekspresiji p53 proteina u odnosu na starosne kategorije ispitanice ipak su zapažene određene pravilnosti. Naime, u tumorima sva četiri molekularna tipa nivo ekspresije p53 proteina bio je veći kod ispitanica starijih od 50 godina starosti u odnosu na mlađu grupu ispitanica. Tumore ispitanica trostruko negativnog tipa karakterisala je pozitivna korelacija između nivoa ekspresije p53 proteina i genskog

statusa *HER-2*, dok veza između nivoa ekspresije p53 i *TOP2A* genskih aberacija nije bila statistički značajna.

Opšti zaključak koji se nameće na osnovu naših rezultata odnosi se na činjenicu da je pozitivna ekspresija tumor supresornog proteina p53 zastupljenija u tumorima grupe trostruko negativnog i *HER-2* pozitivnog tipa u odnosu na luminalnu grupu karcinoma dojke što je u skladu sa literaturnim podacima <sup>108</sup>. Imajući u vidu studije u kojima je pokazano da je pozitivna ekspresija p53 proteina povezana sa agresivnijim tokom bolesti, lošijim ishodom i kraćim preživljavanjem, kao i lošijim odgovorom na hormonsku terapiju, nameće se zaključak da pacijentkinje iz grupe trostruko negativnih i *HER-2* pozitivnih karcinoma dojke imaju lošiju prognozu ishoda bolesti u odnosu na one iz grupe luminalnih tipova karcinoma dojke.

### **V.2.3. *HER-2* protein kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke**

*HER-2* protein je kodiran od strane *HER-2* gena tj. aktiviranog protoonkogenom <sup>36</sup>. Gen je lokalizovan na hromozomu 17q21 i eksprimira se u normalnim, tumorski nepromenjenim ćelijama mnogih tkiva, uključujući i epitelno tkivo dojke <sup>36</sup>. *HER-2* receptor je transmembranski protein koji je uključen u više signalnih puteva koji u ćeliji dovode do prenosa signala sa površine i iz citoplazme u nukleus gde dolazi do aktiviranja kaskade enzimskih reakcija koje su uključene u rast i deobu ćelije <sup>35,36</sup>. Pored opšte poznatog prognostičkog značaja *HER-2* receptora, u novije vreme ekspresija ovog markera služi i za predviđanje odgovora na terapiju humanim monoklonskim antitelom Herceptinom <sup>109</sup>. Naročito je značajna njegova primena kod pacijentkinja sa metastatskim formama karcinoma dojke. Dve najčešće metode kojima se određuje nivo ekspresije *HER-2* u tumorskim ćelijama jesu imunohistohemijska metoda kojom se semikvantitativno određuje nivo ekspresije proteina i FISH metoda kojom se određuje genski status *HER-2* <sup>109,110</sup>.

*HER-2* receptor je biološki marker koji se najčešće koristi u procesu kliničkih istraživanja karcinoma dojke. Prekomerna ekspresija ovog receptora kod pacijentkinja sa ranim oblicima karcinoma dojke je u korelaciji sa visokim histološkim gradusom, niskim stepenom ekspresije steroidnih receptora, povećanim proliferativnim potencijalom i pojavom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, što sve ukazuje na

činjenicu da je prekomerna ekspresija ovog receptora faktor loše prognoze <sup>35</sup>. U većini studija, dokazano je da je HER-2 nezavisan prognostički marker kod karcinoma dojke u kojima postoji i infiltracija tumorskim ćelijama regionalnih limfnih nodusa, ali ne i u slučajevima gde zahvaćenost limfnih nodusa odsustvuje, mada neki podaci govore u prilog i drugačijoj slici <sup>110</sup>.

Literaturni podaci ukazuju na to da se prekomerna ekspresija HER-2 receptora beleži u proseku kod 20-35% svih karcinoma dojke <sup>35</sup>. Prekomerna ekspresija HER-2 receptora povezana je sa lošijim ishodom i agresivnijim tokom bolesti, naročito kod pacijentkinja sa zahvaćenim limfnim nodusima. Prognostički značaj stepena ekspresije HER-2 receptora je ograničen kod pacijentkinja kod kojih nije prisutna infiltracija regionalnih limfnih čvorova tumorskim ćelijama i ogleda se uglavnom u odsustvu korelacije između stepena ekspresije i prognoze <sup>35</sup>. Međutim, bez obzira na ovo ograničenje, određivanje stepena ekspresije HER-2 receptora ima veliki prognostički značaj u predviđanju odgovora ili rezistentnosti na terapiju Herceptinom <sup>109</sup>. Dosadašnja istraživanja na ovom polju su pokazala da povećana ekspresija HER-2 receptora ukazuje na rezistentnost na hormonsku terapiju, kao i na CMF hemioterapiju (ciklofosamid, metoteksat i 5- fluorouracil), povećanu osetljivost na hemoterapiju zasnovanu na doksorubicinu kao i naročito dobar odgovor na terapiju monoklonskim antitelom Herceptinom, koji je sintetisan tako da se kompatibilno vezuje za ekstracelularni domen HER-2 receptora <sup>111</sup>. Samostalnom primenom Herceptina u terapijske svrhe povećava se uspešnost povoljnog ishoda lečenja, a primenom Herceptina zajedno sa hemoterapijom postiže se znatno bolji i pozitivniji terapijski efekat <sup>111,112</sup>.

U skladu sa izvršenom klasifikacijom tumora na molekularne tipove u našoj studiji je prekomerna ekspresija HER-2 receptora zabeležena u tumorima HER-2 pozitivnog i luminalnog B tipa. Nasuprot njima, u tumorima luminalnog A i trostruko negativnog tipa zabeleženo je potpuno odsustvo ili slaba pozitivnost, koja se takođe smatra negativnom ekspresijom, a označena je u bod sistemu sa 1. U grupi luminalnog B tipa karcinoma dojke zabeležen je najveći broj tzv. intermedijernih slučajeva čija je ekspresija HER-2 receptora označena sa 2 (15/26, 57.7%) i kod kojih je najindikativnije raditi FISH metodu za proveru prisustva genske amplifikacije. Kod HER-2 pozitivnog tipa čak 83.4% karcinoma dojke imao je prekomernu ekspresiju HER-2 receptora



označenu u bod sistemu sa 3, što ukazuje na istovremeno prisustvo amplifikacije *HER-2* gena, koja je takođe zabeležena u istim uzorcima tumora (5/6, 83.4%). Pozitivna, prekomerna ekspresija *HER-2* receptora uglavnom je povezana sa negativnom ekspresijom steroidnih receptora<sup>113</sup> što je pokazano i u ovoj studiji, međutim, ono što je zanimljivo, a može se zaključiti na osnovu rezultata naše studije, jeste činjenica da je prekomerna ekspresija *HER-2* receptora kod ispitanica iz grupe *HER-2* pozitivnog tipa karcinoma dojke, bila udružena sa potpunim odsustvom ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2. Apoptotski indeks je takođe najniži u tumorima pacijentkinja iz grupe *HER-2* pozitivnog tipa.

Većina do sada sprovedenih studija je pokazala da se u opštoj populaciji ispitanica oboljelih od karcinoma dojke, ne uzimajući u obzir molekularne tipove, prekomerna ekspresija *HER-2* receptora kao i amplifikacija njegovog gena zajedno javljaju kod 20- 40% ispitanica<sup>35,114</sup>. Britanska grupa istraživača na čelu sa Dowsettom je u svojoj studiji iz 2003. godine pokazala da se u karcinomima pacijentkinja sa intermedijernom vrednošću ekspresije *HER-2* (2<sup>+</sup>) proteina amplifikacija njegovog gena javlja kod 50% karcinoma, dok je stepen pozitivne korelacije znatno veći kada su u pitanju tumori ispitanica kod kojih je stepen ekspresije označen sa *HER-2* (3<sup>+</sup>) i *HER-2* (0)<sup>113</sup>. Slične rezultate dobila je i grupa čeških istraživača na čelu sa Bouchalovom koja je takođe pokazala da je stepen korelacije rezultata dobijenih pomoću imunohistohemijske i FISH metode za *HER-2* iznosio 88.4%<sup>114</sup>. Su je u svojoj studiji iz 2011. godine pokazao da je *HER-2* pozitivni tip karcinoma dojke zastupljeniji kod žena azijske populacije u odnosu na žene iz Evrope među kojima dominiraju grupe luminalnih tipova karcinoma dojke<sup>115</sup>. Naši rezultati su takođe u skladu sa ovom tvrdnjom s obzirom da je i u našoj studiji najveći broj pacijentkinja na osnovu ekspresije osnovnih bioloških markera odgovarao luminalnim tipovima karcinoma dojke.

Kada se uzme u obzir svih 60 tumorskih promena obuhvaćenih našom studijom, značajna pozitivna korelacija beleži se između stepena ekspresije *HER-2* receptora i stepena genskih modifikacija *HER-2*. Takođe, kada se uzme u obzir molekularna tipizacija karcinoma dojke značajna korelacija između proteinske i genske ekspresije zabeležena je u tumorima luminalnog A tipa u kojima je nizak nivo genske amplifikacije zabeležen samo u jednom karcinomu dok su svi ostali tumori imali neamplifikovan status *HER-2* gena udružen sa negativnom ekspresijom *HER-2*

receptora označenom sa 0 i 1. Imajući u vidu da je negativna ekspresija HER-2 proteina uglavnom posledica nepromenjene ekspresije *HER-2* gena naši rezultati su u skladu sa poznatim literaturnim rezultatima <sup>36</sup>, jer u 23 od ukupno 24 karcinoma luminalnog A tipa negativna ekspresija HER-2 receptora udružena je sa nepromenjenim genskim statusom *HER-2*. U luminalnom B, trostruko negativnom i HER-2 pozitivnom tipu karcinoma dojke zabeleženo je odsustvo statistički značajne korelacije između genske i proteinske ekspresije HER-2. Takođe, stepen korelacije rezultata dobijenih imunohistohemijskom i FISH metodom iznosi preko 70% (43/60, 71.7%) u našoj studiji i u potpunoj je saglasnosti sa poznatim literaturnim rezultatima <sup>114</sup>. Naime, samo kod 17 karcinoma obuhvaćenih našom studijom rezultati genske amplifikacije *HER-2* ne koreliraju sa proteinskim nivoom ekspresije dobijenim na osnovu imunohistohemijske analize. Na osnovu literaturnih podataka opravdano je očekivati da kod ispitanica sa pozitivnom ekspresijom HER-2 receptora bude prisutna i amplifikacija *HER-2* gena, kao i da u slučajevima sa negativnom ekspresijom HER-2 receptora amplifikacija bude odustna, što je i dokazano u našoj studiji kod 43 karcinoma (43/60, 71.7%). Odstupanje od očekivanih rezultata zabeleženo je kod 17 karcinoma gde je pozitivna ekspresija HER-2 receptora bila udružena sa odustvom genske amplifikacije, tj. negativna ekspresija HER-2 receptora je bila udružena sa *HER-2* genskom amplifikacijom.

#### **V.2.4. Bcl-2 protein kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke**

Tokom poslednjih dvadesetak godina značajno je unapređeno znanje iz oblasti funkcionisanja i regulacije ćelijskog ciklusa, kao i smrti ćelije, čemu je doprinelo umnogome i poznavanje uloge antiapoptotskog proteina Bcl-2 <sup>53</sup>. Ekspresija proteina Bcl-2 ima značajnu ulogu u razvoju tumora. Pozitivna ekspresija Bcl-2 proteina uočena je u normalnom, hiperplastičnom i u neoplastičnom epitelnom tkivu dojke <sup>65</sup>. Očuvana ekspresija ovog proteina smatra se faktorom dobre prognoze i dobrog odgovora na hormonsku terapiju kod pacijentkinja sa karcinomom dojke. Ranije studije su pokazale da postoji pozitivna korelacija između dužine preživljavanja i dobrog odgovora na hormonsku terapiju kod pacijentkinja sa očuvanom ekspresijom Bcl-2 proteina u odnosu na one sa negativnom ekspresijom Bcl-2 <sup>53,65</sup>.

Podaci o očuvanoj ekspresiji Bcl-2 proteina kod karcinoma dojke su jako heterogeni. Naime, prema nekim studijama ekspresija je prisutna u oko 32% tumora dojke <sup>116</sup> dok se prema navodima drugih studija ekspresija beleži u oko 76% ispitanica sa karcinomom dojke <sup>117</sup>. Takođe, većina studija je pokazala da između očuvane ekspresije Bcl-2 proteina i steroidnih receptora postoji pozitivna korelacija <sup>96</sup>. Naime, dokazano je da kod pacijentkinja čiji tumori imaju očuvanu ekspresiju Bcl-2 proteina dolazi do boljeg odgovora na hormonsku terapiju u odnosu na one pacijentkinje u čijim tumorima odsustvuje Bcl-2 proteinska ekspresija <sup>117</sup>. Takođe, dokazano je da ukoliko postoji očuvana ekspresija Bcl-2 proteina koja je udružena sa prisutnom infiltracijom regionalnih limfnih nodusa tumorskim ćelijama, preživljavanje pacijentkinja je duže, bez obzira na tip primenjene adjuvantne terapije <sup>118</sup>.

Bertolo je u svojoj studiji iz 2008. godine pokazala da je očuvana ekspresija Bcl-2 proteina svojstvena luminalnoj grupi karcinoma dojke, što je u saglasnosti i sa našim rezultatima <sup>17</sup>. Naime, luminalne tipove karcinoma dojke karakterisala je očuvana pozitivna ekspresija označena u bod sistemu sa 2 i 3, dok je tumore trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog tipa karakterisalo odsustvo ekspresije, ili slaba pozitivnost Bcl-2 proteina. Ekspresija Bcl-2 proteina prisutna je i u normalnom, tumorski nepromenjenom tkivu dojke, i održava se takođe i prilikom pojave i progresije tumora. Luminalni tipovi karcinoma dojke spadaju u dobro diferentovane tumore, slično luminalnoj epitelnoj komponenti normalnog tkiva dojke. Rezultati studije koju su sprovedeli Bertolo i saradnici su pokazali da luminalni tipovi karcinoma dojke imaju bolju prognozu u odnosu na dva preostala molekularna tipa <sup>17</sup>. Očuvana ekspresija Bcl-2 proteina udružena je najčešće sa pozitivnom ekspresijom ciklina D1 koji učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa <sup>17</sup>. Dawson je u multicentričnoj studiji iz 2010. godine koja je sprovedena na 11.202 ispitanice dokazao da je Bcl-2 protein nezavisan prognostički marker i faktor dobre prognoze kod svih molekularnih tipova karcinoma dojke <sup>117</sup>. Takođe, prema njegovim rezultatima ispitanice sa očuvanom ekspresijom Bcl-2 proteina i udruženim fenotipom Bcl-2<sup>+</sup>/ER-R<sup>-</sup> imale su duže preživljavanje bez pojave recidiva i bolji ishod bolesti u odnosu na pacijentkinje koje je odlikovao Bcl-2<sup>-</sup>/ER-R<sup>+</sup> fenotip <sup>117</sup>. Daidone je još 1999. godine dokazao da je očuvana ekspresija Bcl-2 proteina najčešće udružena sa pozitivnim statusom steroidnih receptora, niskim indeksom proliferacije kao i potpunim odsustvom ili slabom pozitivnom ekspresijom tumor supresornog

proteina p53<sup>118</sup>. Naši rezultati su u potpunoj saglasnosti sa navodima ove studije s obzirom da je očuvana ekspresija Bcl-2 proteina zastupljenija u grupi luminalnih tipova karcinoma dojke, dok je u grupi HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke ekspresija Bcl-2 proteina potpuno odsutna.

Opšti zaključak koji se nameće na osnovu naših rezultata kao i ranije poznatih literaturnih podataka, jeste da očuvana ekspresija Bcl-2 karakteriše dobro diferentovane tumore, koji imaju dobar odgovor na hormonsku terapiju i duži period preživljavanja u odnosu na tumore sa negativnom ekspresijom Bcl-2 proteina. Karcinome luminalnih tipova karakterisala je uglavnom očuvana ekspresija Bcl-2 u svim karcinoma što ukazuje na bolju prognozu ishoda bolesti u odnosu na ispitanice sa tumorima trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog molekularnog tip koje karakteriše odsustvo pozitivne ekspresije Bcl-2 proteina.

#### **V.2.5. Ki67 protein kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke**

Glavni biološki markeri čija se ekspresija prati i uvažava prilikom odabira hemoterapije, kao i predviđanja odgovora na terapiju su: ER-R, PR-R i HER-2 receptor<sup>31</sup>. Međutim, većina patologa u poslednje vreme zajedno sa izveštajem o stepenu ekspresije osnovnih markera dodaju i određivanje stepena ekspresije proliferativnog markera Ki67<sup>31</sup>. Uvođenje novih genetičkih metoda postavilo je u prvi plan značaj indeksa proliferacije i kao prognostičkog i kao prediktivnog markera kod karcinoma dojke<sup>31</sup>.

Normalno, tumorski nepromenjeno tkivo dojke karakteriše nizak indeks proliferacije (manje od 3%)<sup>119</sup>. Novije studije koje su sprovedene na određivanju indeksa proliferacije kod normalnog epitelnog tkiva dojke pokazale su jako zanimljivu korelaciju po kojoj se pozitivna ekspresija Ki67 markera ograničava isključivo na ER-R negativne, zdrave, epitelne ćelije. Epitelne ER-R pozitivne ćelije nemaju sposobnost proliferacije tako da u toj populaciji ćelija izostaje ekspresija Ki67. Ovakva distinkcija između ER-R pozitivnosti i indeksa proliferacije ne nalazi se kao specifična i u slučaju tumorskog tkiva dojke<sup>119</sup>. Fabian je zajedno sa kolegama dokazao da se nivo ekspresije Ki67 smanjuje nakon delovanja aromatoznog inhibitora, letrozole, kojim su pacijentkinje tretirane uz hormonsku terapiju<sup>119</sup>.

Prognostički značaj Ki67 proteina je do sada bio tema ispitivanja velikog broja studija koje su dale jako kontroverzne i različite rezultate <sup>119,120</sup>. Internacionalna grupa za ispitivanje karcinoma dojke sprovela je istraživanje na dve grupe pacijentkinja koje su u toku 21 dana bile podvrgnute delovanju dvaju različitih grupa hemoterapijskih agenasa <sup>120</sup>. Jedna grupa pacijentkinja tretirana je FAC (fluorouracil 500 mg/m<sup>2</sup>, doksorubicin 50 mg/m<sup>2</sup>, ciklofosamid 500 mg/m<sup>2</sup>) kombinacijom terapijskih agenasa, dok je druga grupa pacijentkinja tretirana TAC protokolom (docetaksel 75 mg/m<sup>2</sup>, doksorubicin 50 mg/m<sup>2</sup>, ciklofosamid 500 mg/m<sup>2</sup>) <sup>120</sup>. Istraživači su podelili pacijentkinje na osnovu molekularne klasifikacije u četiri molekularne grupe tj. na luminalni A i B tip karcinoma dojke, na HER-2 pozitivni i trostruko negativni tip karcinoma dojke. Izuzetno pozitivan odgovor na delovanje terapije taksanima imale su pacijentkinje sa luminalnim B tipom karcinoma dojke koji se odlikovao visokim indeksom proliferacije. U ovom slučaju, visok nivo ekspresije Ki67 ukazuje na benefit delovanjem terapije taksanima, tj. pacijentkinje sa visokim nivoom ekspresije Ki67 proteina imale su dobar odgovor na terapiju taksanima. Međutim, bez obzira na ovu vezu između Ki67 i terapijskog benefita, indeks proliferacije se ni danas ne smatra nezavisnim prediktivnim markerom kod pacijentkinja sa karcinomom dojke <sup>119,120</sup>.

Najsveobuhvatnije kliničko istraživanje (4922 pacijentkinje) odnosilo se na ispitivanje prediktivne uloge Ki67 proteina u odnosu na grupe pacijentkinja koje su primile terapiju koja se sastojala od tamoksifena i letrozole a koju je sprovela grupa američkih istraživača na čelu sa Regan <sup>121</sup>. Studija je dizajnirana tako da prati četiri različite grupe pacijentkinja koje su tretirane tamoksifenom ili letrozolom u toku 5 godina, kao i dve grupe pacijentkinja kod kojih je primenjena terapija letrozolom praćena dodavanjem tamoksifena, kao i obrnuto. Kriterijum za visok nivo ekspresije Ki67 proteina definisan je u slučajevima kada je ekspresija zabeležena u 11% tumorskih ćelija. Dokazano je da povećan proliferativni indeks ukazuje na terapijski benefit kod pacijentkinja koje su tretirane letrozolom u odnosu na one koje su tretirane tamoksifenom. Grupu pacijentkinja koju je karakterisao visok indeks proliferacije odlikovao je dvostruko duži period preživljavanja nakon primene letrozole u odnosu na pacijentkinje koje su podvrgnute samo terapiji tamoksifenom <sup>121</sup>. Terapijski benefit je bio znatno manji kod pacijentkinja koje su imale nizak nivo ekspresije proliferativnog markera. Na osnovu ovih nalaza istraživači su zaključili da pacijentkinje sa visokim

indeksom proliferacije imaju izuzetno dobar odgovor na delovanje terapije letrozolom  
121

Generalni zaključak koji se nameće nakon sumiranja svih navedenih rezultata jeste taj da se Ki67 ne može smatrati samostalnim prognostičkim markerom kod karcinoma dojke bez obzira na određene specifičnosti i zakonitosti koje se javljaju kod pacijentkinja sa visokim i niskim indeksom proliferacije.

Na osnovu naših rezultata dokazano je da umereno izražen indeks proliferacije 2 karakteriše više od polovine ukupnog broja karcinoma koje je obuhvatila ova studija (55%). Za razliku od Menga koji je u svojoj studiji iz 2012. godine pokazao da je indeks proliferacije statistički značajno veći kod ispitanica sa amplifikacijom *TOP2A* gena i niskim nivoom ekspresije HER-2 receptora, naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu vezu između dva navedena markera<sup>122</sup>.

Takođe, rezultati naše studije su pokazali da sve ispitanice iz grupe trostruko negativnih karcinoma dojke imaju maksimalno izražen indeks proliferacije. Tumore HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke je karakterisala najveća zastupljenost umereno izraženog proliferativnog indeksa (5/6, 83.4%), dok je u karcinomu jedne pacijentkinje indeks proliferacije imao maksimalnu vrednost. Karcinome luminalnog A i luminalnog B tipa odlikovao je statistički značajno niži nivo indeksa proliferacije u odnosu na karcinome trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog tipa, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima<sup>122</sup>.

#### **V.2.6. Apoptotski indeks kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke**

Ćelijska smrt je verovatno jedan od najproučavanijih ćelijskih procesa, naročito interesantan i bitan u različitim patološkim stanjima<sup>57</sup>. Razumevanje mehanizma same apoptoze kod obolelih je veoma značajno ne samo sa stanovišta razumevanja mehanizma nastanka i progresije oboljenja, već i sa aspekta predviđanja ishoda same bolesti kao i predviđanja odgovora na određeni vid terapije<sup>57</sup>. U karcinomskim stanjima, ravnoteža koja postoji između ćelijske proliferacije i apoptoze je narušena, tako da ćelije koje treba da podlegnu procesu ćelijske smrti preživljavaju usled narušavanja signalnih puteva koji prenose signale za pokretanje procesa apoptoze. Problem u mehanizmu aktivacije može da se javi na bilo kom mestu u ovom signalnom

putu <sup>59</sup>. Jedan od mogućih scenarija odnosi se na inaktivaciju ekspresije p53 proteina što rezultuje redukcijom apoptoze i pojačanim tumorskim rastom i razvojem što je česta situacija kod različitih vrsta tumorskih promena <sup>59</sup>.

Morfološke promene koje nastaju u ćeliji u toku procesa apoptoze su različite i svojstvene određenom tipu ćelije. U većini slučajeva potrebno je da prođe nekoliko sati od trenutka inicijacije apoptoze do finalne fragmentacije. Međutim, ukupno vreme neophodno za odvijanje celokupnog procesa apoptoze zavisi od tipa ćelije, vrste stimulusa koji je izaziva i tipa aktiviranog apoptotskog puta <sup>58</sup>.

Morfološke promene u nukleusu se odnose na fragmentaciju nukleusa i kondenzaciju hromatina. Postoje tri glavna tipa biohemijskih promena koje se odvijaju u ćeliji tokom procesa apoptoze, a odnose se na aktivaciju kaspaza, razgradnju DNK i proteina i promene na membranama koje uslovljavaju stvaranje specifičnih formacija koje prepoznaju fagociti <sup>58</sup>.

Karcinomi dojke dele osnovne karakteristike nastanka, narušavanje ravnoteže između ćelijske smrti i proliferacije, dok su molekularni mehanizmi koji prate ove procese veoma specifični i jedinstveni kod tumorskih promena različitog porekla. Na osnovu poznatih literaturnih podataka postoji čitav set bioloških markera koji ispoljavaju poseban obrazac promene ekspresije tokom nastanka i progresije karcinoma dojke. Mottolese je u svojoj studiji iz 2000. godine pokazao da neoplastične epitelne ćelije dojke imaju sposobnost da inhibiraju proces apoptoze u ćeliji aktiviranjem više različitih mehanizama <sup>123</sup>. Ova grupa istraživača je pokazala da smanjenje ekspresije Fas i Fas liganda predstavlja jedan od najznačajnijih mehanizama i da učestvuje u prognostičkoj evaluaciji kod karcinoma dojke <sup>123</sup>. Iste godine grupa istraživača na čelu sa Muschen-om dokazala je da ekspresija Fas liganda može biti povećana u karcinomu dojke što dovodi do stimulacije imunskog ćelijskog odgovora i aktivacije apoptoze u T limfocitima <sup>124</sup>.

Ravnoteža između normalne ekspresije Bcl-2 proteina koji spada u ključne biološke markere koji regulišu mitohondrijalni apoptotski put je u tumorskim ćelijama dojke najčešće narušena <sup>125</sup>. Alizera je pokazao da je prekomerna ekspresija Bcl-2 proteina povezana sa tumorskom progresijom i pojavom metastaza kada je u pitanju karcinom dojke <sup>125</sup>. Sličan odnos vrednosti indeksa apoptoze nađen je u sva četiri molekularna tipa karcinoma dojke. Metaanaliza apoptoze u karcinomu dojke koju su

sproveli Liu i Chen, 2010. godine, pokazala je da kompleks, steroidni hormon estrogen i njegov receptor, igra ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena koji su uključeni u visokokonzervirani apoptotski signalni put u ćeliji <sup>126</sup>. Rana je u svojoj studiji iz 2010. godine postavio hipotezu po kojoj estrogeni stimulišu i održavaju preživljavanje ER-R pozitivnih ćelija karcinoma dojke. Biološki mehanizam kojim estrogeni obavljaju ovu svoju funkciju odnosi se na inhibiciju signalnog puta koji dovodi do aktivacije apoptoze kao i do stimulacije povećane ekspresije antiapoptotskih molekula među kojima se naročito ističe Bcl-2 protein <sup>127</sup>.

U našoj studiji je očuvana ekspresija Bcl-2 proteina najzastupljenija kod karcinoma iz grupe luminalnog A tipa kod kojih je zabeležena i maksimalna ekspresija ER-R, dok je u grupi HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke ER-R, kao i Bcl-2 protein bio negativan u svim karcinomima. Ranije objavljeni literaturni podaci ukazuju da između apoptotskog indeksa i tumor supresornog proteina p53 postoji pozitivna korelacija. Negativna korelacija između indeksa apoptoze i indeksa proliferacije ukazuje na agresivniji tok bolesti i kraće preživljavanje bez pojave recidiva što je dokazao Lipponen u svojoj studiji iz 1994. godine <sup>128</sup>. Protein TOP2A, s obzirom na svoju ulogu u procesu ćelijske deobe, ima pozitivnu korelaciju sa indeksom proliferacije, što je u suprotnosti sa našim rezultatima imajući u vidu da je odnos između ova dva biološka markera u sva četiri molekularna tipa bio negativan. U našoj studiji je pokazana pozitivna korelacija između indeksa apoptoze i genske amplifikacije *TOP2A* gena u luminalnom A i HER-2 pozitivnom tipu karcinoma dojke, što je u saglasnosti sa poznatim literaturnim podacima <sup>42</sup>.

Bez obzira na odsustvo statistički značajne korelacije između apoptotskog indeksa i genskog statusa *HER-2* i *TOP2A*, osnovni zaključak koji se nameće jeste činjenica da je apoptotski indeks imao najveću vrednost u karcinomima pacijentkinja luminalnog A tipa, kao i da je trend pozitivne korelacije zabeležen u odnosu na stepen amplifikacije *TOP2A* gena.

### **V.2.7. BRCA1 protein kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke**



Iako precizna biološka uloga BRCA1 proteina do danas nije otkrivena, njegova uloga u reparaciji DNK, kontroli ćelijskog ciklusa i remodelovanju hromatina ukazuje na značaj ovog proteina i u kancerogenezi <sup>84</sup>.

BRCA1 je nukleusni protein molekulske mase od 220 kD <sup>84</sup>. Ovaj kompleksni protein mora da se prebaci iz citoplazme, mesta svoje sinteze, u jedro, mesto funkcionalne aktivnosti, te je u normalnom epitelu dojke protein lokalizovan isključivo u nukleusima. Stoga jedarna lokalizacija BRCA1 proteina odražava normalan/fiziološki fenotip. Dokazano je da protein BRCA1 deluje i kao transkripcioni faktor: to je važan regulator funkcije rasta u epitelnim ćelijama dojke, s obzirom da deluje kao inhibitor ćelijske proliferacije <sup>84</sup>. Ukoliko izostane ekspresija BRCA1 proteina, prestaje inhibični efekat na ćelijsku proliferaciju, pa tumorske ćelije proliferišu i bolest progredira. Niska ekspresija BRCA1 u ćelijama sa visokim indeksom proliferacije može da rezultuje narušavanjem reparacije DNK i dovede do akumulacije dodatnih mutacija koje mogu da stvore invazivni ćelijski fenotip <sup>84</sup>.

Karcinomi dojke se javljaju u sporadičnoj i familijarnoj formi. Iako su mutacije u genu *BRCA1* retke kod sporadičnih karcinoma dojke, neka od novijih istraživanja su pokazala da je funkcija gena *BRCA1* u sporadičnim karcinomima dojke kompromitovana i da je smanjenje njegove genske ekspresije ključni događaj u progresiji ovih karcinoma <sup>85</sup>. Naime, u tumorskim ćelijama ili kulturama ćelija sporadičnih karcinoma dojke u poređenju sa normalnim epitelnim ćelijama često se beleži izostanak nukleusne ekspresije proteina BRCA1, a tokom progresije karcinoma *in situ* u invazivni karcinom, smanjuje se nivo iRNK za BRCA1. Takođe, smatra se da se gubitak ekspresije BRCA1 proteina može uzeti kao potencijalni prognostički marker kod sporadičnih karcinoma dojke i da ukazuje na lošu prognozu bolesti <sup>85</sup>.

Mehanizmi koji dovode do narušavanja normalne ekspresije BRCA1 proteina kod sporadičnih karcinoma dojke nisu u potpunosti razjašnjeni <sup>85</sup>. Postoje najmanje četiri mehanizma koji dovode do ovog poremećaja. Po mišljenju nekih autora nedostatak jedarne ekspresije BRCA1 proteina može biti rezultat narušenog odnosa između molekula signalnih puteva koji su uključeni u transport proteina iz citoplazme u jedro. Transkripcija *BRCA1* je delimično regulisana metilacijom ostrvca CpG na 5' kraju gena, tako da oštećenje metilacije ovog regiona u smislu hipermetilacije, koje se dešava kod 11% sporadičnih karcinoma dojke, može da dovede do tzv. pritajene genske

ekspresije. Takođe, gubitak heterozigotnosti na lokusu BRCA1 korelira sa redukovanom ekspresijom BRCA1 proteina, mada se ne viđa često kod sporadičnih karcinoma dojke<sup>85</sup>. Podaci objavljeni 2003. godine od strane Baltassare i saradnika su pokazali da se protein HMGA1b (engl. *High-mobility group protein B1*) direktno vezuje za promotor *BRCA1* gena dovodeći do inhibicije njegove transkripcije. To znači da je protein HBGA1 inhibitor aktivnosti i da dovodi do smanjenja ekspresije *BRCA1* gena što dovodi do smanjenja ekspresije BRCA1 proteina naročito kod agresivnijih sporadičnih formi karcinoma dojke<sup>129</sup>.

Na osnovu rezultata naše studije u koju je bilo uključeno 60 uzoraka karcinoma dojke, proizilazi da se pozitivna ekspresija javlja u 37 (61.7%) tumora dojke, tj. u 15 tumora luminalnog A tipa (15/24, 62.5%), 18 (18/26, 69.2%) luminalnog B tipa, 2 (2/4, 50%) trostruko negativnog i dva tumora HER-2 pozitivnog tipa (2/6, 33.3%). Rezultati drugih autora o pozitivnoj ekspresiji BRCA1 proteina su veoma različiti, s obzirom da se ovaj poremećaj zapaža kod 19-50% sporadičnih karcinoma dojke<sup>84,85</sup>, ali generalno pokazuju manju učestalost u odnosu na rezultate ove studije. Ovako različiti literaturni podaci posledica su pre svega upotrebe različitih antitela na BRCA1 protein, među kojima se po preporuci Lee i saradnika, Perez-Valles i saradnika za imunohistohemijsko bojenje na parafinskim uzorcima tumora kao najsenzitivnije i najspecifičnije antitelo koristi MS110 (Ab-1) koje reaguje sa N-terminalnim krajem proteina i ne reaguje sa antigenima krvnih grupa niti sa EGFR<sup>85,130</sup>, a koje je korišćeno i u ovoj studiji. Rezultati naše studije koji idu u prilog činjenici da se značajna pozitivna ekspresija BRCA1 javlja i u sporadičnim karcinomima dojke su u saglasnosti sa novim rezultatima De Leeneer i saradnika iz 2012. godine koji su takođe pokazali da ekspresija BRCA1 proteina može biti modifikovana i povećana ne samo kod ispitanica sa pozitivnom porodičnom anamnezom nego i sa sporadičnim formama karcinoma dojke<sup>131</sup>.

Na osnovu naših ranijih rezultata pokazano je da je ekspresije BRCA1 i TOP2A proteina u karcinomima luminalnog A, luminalnog B i trostruko negativnog tipa udružena sa manjom veličinom tumora do 2 cm u dijametru, umerenom diferentovanošću karcinoma histološkog gradusa G2, negativnim statusom regionalnih limfnih čvorova i odsustvom metastaza. Za razliku od ovih tumora, u karcinomima HER-2 pozitivnog tipa pozitivna ekspresija BRCA1 proteina povezana je u najvećem

broju slučajeva sa većim dijametrom tumora, preko 5 cm i pozitivnim statusom regionalnih limfnih čvorova<sup>99</sup>.

Mnogobrojne studije su pokušale da dovedu u vezu ekspresiju proteina BRCA1 sa stepenom infiltracije regionalnih limfnih čvorova, veličinom tumora, histološkim gradusom, sa starosnim grupama ispitanica, pri čemu su dobijeni rezultati veoma kontradiktorni. Rezultati naše studije nisu pokazali statistički značajnu razliku u ekspresiji BRCA1 proteina u odnosu na ispitivane starosne kategorije ali se može reći da postoji učestalija povezanost pozitivne ekspresije BRCA1 kod ispitanica mlađeg doba u luminalnom A, luminalnom B i trostruko negativnom tipu karcinoma dojke, odnosno starijeg životnog doba u HER-2 pozitivnom tipu karcinoma dojke.

#### **V.2.8. TOP2A protein kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke**

TOP2A je enzim koji je uključen u proces transkripcije, replikacije i reparacije specifičnih regiona DNK<sup>132</sup>. Gen koji kodira njegovu sintezu nalazi se na položaju 17q21 na kome se takođe nalazi još nekoliko poznatih onkogeni koji su često amplifikovani u ćelijama karcinoma dojke. *TOP2A* genske aberacija kao i proteinska ekspresija predstavljaju kliničke indikatore uspešnosti primenjene hemoterapije antraciklina<sup>132</sup>. Do danas nije sa sigurnošću dokazano šta je važnije za predviđanje odgovora na terapiju, proteinska ekspresija ili stepen genskih aberacija<sup>132</sup>. Ranije studije su pokazale da visok nivo ekspresije TOP2A proteina značajno korelira sa nivoom ekspresije sopstvene iRNK. Na osnovu malog broja *in vivo* studija sprovedenih na različitim vrstama karcinoma, potvrđeno je da stepen proteinske ekspresije korelira sa brojem genskih kopija što je i u korelaciji sa stepenom senzitivnosti na primenjenu antraciklinsku terapiju. Nasuprot ovim tvrdnjama postoje i studije koje nisu pokazale značajnu korelaciju između genske i proteinske ekspresije TOP2A<sup>132</sup>. Klinički značaj delecije *TOP2A* gena takođe nije potpuno razjašnjen s obzirom da je ispitivan u znatno manjem opsegu zbog svoje manje učestalosti u odnosu na amplifikacije *TOP2A* gena. Takođe, nije potpuno jasno da li delecija *TOP2A* gena dovodi do smanjenja opšteg preživljavanja kao i perioda preživljavanja bez pojave recidiva nakon primenjene terapije antraciklinima<sup>132</sup>.

Rezultati naše studije su pokazali da se prosečno najveći stepen ekspresije TOP2A proteina javlja kod karcinoma luminalnog B (18/26, 69.2%) i HER-2 pozitivnog tipa (4/6, 66.7%) karcinoma dojke, kao i da se statistički značajna razlika u zastupljenosti pozitivne ekspresije TOP2A javlja između tumora luminalnog A i luminalnog B tipa. Meng je u svojoj studiji pokazao da se pozitivna ekspresija TOP2A proteina javlja u slučajevima kada postoji i genska aberacija *TOP2A* gena (amplifikacija ili delecija) <sup>132</sup>. Rezultati naše studije su takođe pokazali da je pozitivna ekspresija TOP2A proteina češće udružena sa niskim (9/15, 60%) i visokim nivoom (8/9, 80%) *TOP2A* genske amplifikacije kao i sa delecijom *TOP2A* gena (4/5, 80%) u odnosu na negativnu ekspresiju TOP2A proteina. Međutim, postoji i mali broj tumora u kojima je negativna ekspresija TOP2A proteina udružena sa *TOP2A* genskim aberacijama, što je različito u odnosu na Mengovu studiju <sup>132</sup>. Rezultate slične našim postavio je i Bhargava u svojoj studiji u kojoj je pokazao da se pozitivna ekspresija TOP2A proteina javlja u 18 od 25 (72%) karcinoma sa *TOP2A* genskim aberacijama, dok se negativna ekspresija bez obzira na genski status javlja kod 7 karcinoma (7/25, 28%) <sup>133</sup>. Naime, rezultati naše studije su pokazali da od ukupno 29 tumora sa zabeleženim *TOP2A* genskim aberacijama, u 21 tumoru postoji i pozitivna ekspresija TOP2A proteina (21/29, 72.4%), dok je u 8 tumora negativna ekspresija TOP2A bila udružena sa genskim aberacijama (8/29, 27.6%). Korelacija između ekspresije TOP2A proteina i *HER-2* genskog statusa takođe je išla u prilog dominantnije vezanosti pozitivne ekspresije TOP2A proteina i genske amplifikacije *HER-2* (11/17, 64.7%), dok je negativna ekspresija TOP2A proteina u 6 tumora korelirala sa *HER-2* genskom amplifikacijom (6/17, 35.3%).

#### **V.2.9. Genski status *HER-2* i *TOP2A* kod četiri molekularna tipa karcinoma dojke**

U normalnim diploidnim, tumorski nepromenjenim ćelijama, gen *HER-2* je prisutan u vidu dve kopije, isto kao i gen *TOP2A* <sup>35</sup>. U tumorskim ćelijama karcinoma dojke dolazi do genskih aberacija koje najčešće pogađaju gene *HER-2* i *TOP2A*. Za gen *HER-2* je karakteristična amplifikacija, dok je za *TOP2A* pored amplifikacije svojstvena i delecija. Amplifikacija ili delecija gena *TOP2A* u tumorskim ćelijama najčešće je povezana sa genskom amplifikacijom *HER-2* <sup>35,41</sup>.

Ova povezanost između *HER-2* i *TOP2A* nastaje usled fizičke blizine njihovih gena koji su smešteni na dugom kraku hromozoma 17. Većina ranijih studija ukazuje da se koamplifikacija gena *HER-2* i *TOP2A* istovremeno javlja u oko 30-40% karcinoma dojke<sup>112,133</sup>. Nešto manji broj karcinoma iz naše studije karakterisao se istovremenim prisustvom amplifikacije oba gena (9/60, 15%) što je u saglasnosti sa rezultatima Bouchalove studije u kojoj je koamplifikacija zabeležena u 14.5% karcinoma dojke<sup>114</sup>. Koamplifikacija oba gena, i *HER-2* i *TOP2A* dominantno je odlikovala karcinome pacijentkinja *HER-2* pozitivnog tipa karcinoma dojke (4/6, 66.7%), gde je istovremeno prisutan i najveći stepen pozitivne korelacije proteinske ekspresije *HER-2* receptora i genskih modifikacija *HER-2* i *TOP2A*. Amplifikacije *TOP2A* gena su u tri slučaja bile udružene sa pozitivnom ekspresijom *TOP2A* proteina, dok su u dva slučaja bile udružene sa odsustvom njegove ekspresije.

Postoji pozitivna korelacija između genske amplifikacije na nivou iRNK i ekspresije proteinske forme *HER-2* receptora. Literaturni podaci ukazuju da je kod 96.5% slučajeva karcinoma dojke koje odlikuje prekomerna ekspresija proteina označena sa 3, ista uzrokovana amplifikacijom *HER-2* gena<sup>133</sup>. Naime, amplifikacija gena *HER-2* uslovljava povećan sadržaj proteina *HER-2* na površini maligne ćelije 10 do 100 puta u odnosu na okolne zdrave epitelne ćelije dojke<sup>112</sup>. Prekomerna ekspresija *HER-2* receptora bila je istovremeno zastupljena kod 50% (16/32) tumora sa istovremenom amplifikacijom *HER-2* gena iz naše studije. Naime, skoro polovinu karcinoma luminalnog B (11/26, 42.3%) i većinu karcinoma *HER-2* pozitivnog tipa (5/6, 83.4%) karakterisalo je istovremeno prisustvo prekomerne ekspresije *HER-2* receptora i amplifikacija *HER-2* gena, dok je odsustvo i jednog i drugog karakterisalo karcinome pacijentkinja dve preostale molekularne grupe.

Ispitivanja su takođe pokazala da implementiranjem cDNK za *HER-2* u ćelije sa neamplifikovanim genima *HER-2* dolazi do razvoja biološki agresivnijeg tipa tumora koji se manifestuje povećanom ćelijskom proliferacijom, tumorogenezom, angiogenezom i izraženijim metastatskim potencijalom<sup>42</sup>.

Prekomerna ekspresija *HER-2* receptora i amplifikacija njegovog gena uglavnom je, ali ne i obavezno, udružena sa ekspresijom *TOP2A* enzima. Polovinu genskih modifikacija *TOP2A* čine genske amplifikacije koje su udružene sa amplifikacijom *HER-2* gena, dok drugu polovinu čine delecije *TOP2A* gena<sup>134</sup>.

Rezultati naše studije su pokazali vrlo zanimljivu specifičnost koja se odnosi na udruženost genskih modifikacija dva navedena gena. Naime, amplifikacija *TOP2A* gena bila je zastupljenija kod ispitivanih karcinoma u odnosu na amplifikaciju *HER-2* gena. S obzirom da se nekoliko nedavno sprovedenih studija odnosilo na ispitivanje genske modifikacije oba gena u kontekstu samostalnosti i individualnosti *TOP2A* kao posebnog prognostičkog i prediktivnog faktora, može se naglasiti da su naši rezultati u skladu sa ovim ispitivanjima<sup>36,112,134</sup>. Bez obzira na molekularnu klasifikaciju karcinoma dojke, u slučajevima kada se pogleda opšta populacija infiltrativnih duktalnih karcinoma, statistički značajno veći procenat karcinoma kod kojih ne postoji ekspresija ER-R i PR-R odgovara karcinomima sa prekomernom ekspresijom HER-2 proteina, što su takođe pokazali i rezultati naše studije<sup>39</sup>.

Rezultati naše studije su pokazali da je delecija, kao poseban vid genske modifikacije, bila jako slabo zastupljena sa svega 8.4%, dok je amplifikacija *TOP2A* gena bila znatno zastupljenija, kod čak 40% karcinoma koje je obuhvatila ova studija. Najveći broj karcinoma kod kojih je detektovana delecija, (4/5, 80%) se istovremeno karakterisao intermedijernom (2) vrednošću ekspresije HER-2 proteina i spada u grupu luminalnog B tipa. Takođe, svi tumori sa zabeleženom delecijom imali su istovremeno i pozitivnu ekspresiju *TOP2A* proteina (5/5, 100%).

Imajući u vidu činjenicu da se amplifikacija ili delecija gena *TOP2A* najčešće javlja u karcinomskim ćelijama u kojima već postoji amplifikacija gena *HER-2*, sasvim je jasno da ovaj vid genske aberacije predstavlja primarnu i osnovnu promenu na hromozomskom regionu 17q12-q21<sup>36</sup>. Nakon inicijalne amplifikacije gena *HER-2* dolazi do dodatnih genskih rearanžmana koji obuhvataju amplifikaciju u telomeričnom regionu hromozoma ili intersticijalnu deleciju, pri čemu obe uključuju gen *TOP2A*<sup>36,42</sup>. Pokazano je da su strukturne amplifikacije na hromozomu 17q12-q21 slične onim koje se javljaju na regionu hromozoma 20q11-q13 i 11q13 u karcinomima dojke<sup>42</sup>. Amplifikacioni region se sastoji od odvojenih amplikona koji vode poreklo od više različitih gena<sup>42</sup>.

Delecija *TOP2A* gena udružena sa niskim nivoom amplifikacije *HER-2* gena zastupljena je samo u jednom karcinomu luminalnog B tipa. Delecija gena *TOP2A* u ćelijama karcinoma dojke pruža i informacije o pojavi strukturnih mutacija koje se odnose na promenu broja hromozoma. Uglavnom se u karcinomskim ćelijama javljaju 2

do 3 genske kopije *TOP2A* i 4 do 5 kopija hromozoma 17 (odnos 1:2)<sup>111</sup>. Aneuploidija je proces koji se javlja kasnije i predstavlja sekundarni mehanizam hromozomskih aberacija u odnosu na početne genske aberacije u tumorskim ćelijama dojke<sup>111</sup>.

Najveća razlika u stepenu zastupljenosti *HER-2* i *TOP2A* genskih aberacija zabeležena je u karcinomima luminalnog A tipa, gde dominiraju modifikacije *TOP2A* gena. U prilog našim rezultatima ide studija Hagen iz 2007. godine koja je takođe pokazala da su genske aberacije *TOP2A* učestalije od *HER-2* i da se *TOP2A* gen može smatrati nezavisnim prognostičkim markerom u karcinomu dojke<sup>135</sup>.

#### **V.2.10. Prognostički značaj genskog statusa *HER-2* i *TOP2A* u karcinomu dojke**

U poslednje vreme se posebna pažnja posvećuje određivanju genske amplifikacije *HER-2* i *TOP2A* kao jednim od najznačajnijih prediktivnih i prognostičkih markeri u karcinomu dojke<sup>111</sup>. Neke novije studije ukazuju da je za predviđanje odgovora na specifičnu terapiju (predikciju) veza između stepena genske amplifikacije *TOP2A* i *HER-2* mnogo značajnija u odnosu na prekomernu ekspresiju proteinskih formi, mada postoje i potpuno suprotna mišljenja. S obzirom da je koamplifikacija dominantan mehanizam aberacije oba gena, prisutna u većini karcinoma dojke, prognostički značaj odvojene genske amplifikacije i njihov uticaj na terapiju antraciklinima teško je utvrditi<sup>111</sup>.

Eksperimenti na humanim ćelijskim linijama su pokazali da prekomerna ekspresija *TOP2A* izaziva apoptozu<sup>108</sup>. U našoj studiji je takođe pokazan trend pozitivne korelacije između stepena *TOP2A* genske amplifikacije i indeksa apoptoze u luminalnom A i *HER-2* pozitivnom tipu karcinoma dojke, s obzirom da je najveći apoptotski indeks zabeležen u karcinomima pacijentkinja luminalnog A tipa u kojima je i amplifikacija *TOP2A* gena znatno zastupljenija u odnosu na *HER-2* gensku amplifikaciju. S druge strane, literaturni podaci ukazuju da je visok stepen ekspresije *TOP2A* povezan sa visokim indeksom proliferacije<sup>42,108</sup> što je u suprotnosti sa našim rezultatima.

Postoji i teorija o prognostičkom značaju veze između amplifikacije *TOP2A* i histološkog gradusa tumora kao i broja Ki67 imunoreaktivnih ćelija<sup>108</sup>. Naime, dokazano je da pacijentkinje kod kojih je registrovana genska amplifikacija *TOP2A* i

ekspresija ER-R i PR-R ispoljavaju bolji odgovor na terapiju antraciklinima, dok grupa pacijentkinja kod kojih je registrovana delecija *TOP2A* gena, a koje imaju eksprimirane steroidne receptore imaju lošiju prognozu ishoda bolesti i slabiji odgovor na terapiju antraciklinima <sup>104</sup>. Terapijski tretman antraciklinima ima smanjeni efekat kod pacijentkinja sa niskim nivoom amplifikacije *TOP2A* <sup>104</sup>.

Detaljnom analizom amplifikovanih genskih kopija FISH metodom primećena je intratumorska ćelijska heterogenost, tj. prisustvo dve različite populacije ćelija sa suprotnim vidom genskih aberacija (amplifikacija i delecija) istog gena <sup>43</sup>. U istom tumoru se mogu naći ćelije i sa amplifikacijom i one sa delecijom *TOP2A* gena. Prema rezultatima nekih studija dominantnija je genska amplifikacija *TOP2A* u odnosu na deleciju, mada postoje i potpuno suprotni rezultati <sup>43</sup>. Naši rezultati su pokazali da je genska amplifikacija *TOP2A* (24/60, 40%) dominantniji vid genske aberacije u odnosu na deleciju (5/60, 8.4%) ovog gena. Ovakav fenomen predstavlja jedno od mogućih objašnjenja za alelsku nestabilnost koja se javlja u neposrednoj blizini lokusa *TOP2A*. Ovaj vid intratumorske ćelijske heterogenosti koja se odnosi na lokus *TOP2A* gena ima značaja u pogledu predviđanja odgovora na terapiju. Naime, dokazano je da je amplifikacija *TOP2A* gena povezana sa hipersenzitivnošću na delovanje citotoksičnih lekova (doksorubicina). Za razliku od tumora kod kojih postoji amplifikacija, ispitanice čiji tumori imaju gensku deleciju pokazuju povećan stepen rezistentnosti na delovanje terapije inhibitorima *TOP2A* <sup>136</sup>. Tumori u kojima postoje dva različita ćelijska klona, ćelije sa amplifikacijom i druge sa delecijom, imaju lošiji odgovor na primenjenu terapiju. Ovaj efekat se javlja zbog grupe ćelija kod kojih postoji registrovana delecija gena *TOP2A* a koje su rezistentne na delovanje inhibitora topoizomeraze <sup>43,136</sup>.

Svi ovi navodi idu u prilog hipotezi da prekomerna ekspresija *TOP2A* ukazuje na agresivniji fenotip tumora, kraće preživljavanje pacijentkinja, ali i dobar odgovor na terapiju antraciklinima <sup>43,136</sup>.

Prekomerna ekspresija proteina kao i genska amplifikacija *HER-2* u ćelijama karcinoma dojke ukazuje na agresivniji tok bolesti, loš odgovor na hormonsku terapiju i kraće preživljavanje pacijentkinja <sup>77</sup>. Međutim, ukoliko je registrovana prekomerna ekspresija proteina *HER-2*, postoji mogućnost za dobar odgovor na terapiju monoklonskim humanizovanim antitelom, transtuzumabom, kao i dobar odgovor na antraciklinske lekove. Posebnu kombinaciju ovih lekova čine ciklofosamid,



metotreksat i 5- fluorouracil. Međutim, bez obzira na pozitivan odgovor na terapiju transtuzumabom, ove pacijentkinje pokazuju rezistentnost na delovanje terapije tamoksifenom, koji predstavlja osnovni vid terapije kod pacijentkinja sa eksprimiranim ER-R i PR-R <sup>77</sup>. Utvrđeno je da je prekomerna ekspresija HER-2 i TOP2A generalno povezana sa kraćim preživljavanjem pacijentkinja <sup>77,136</sup>. Uopšteno, najbolju prognozu ishoda bolesti imaju pacijentkinje sa odsustvom ekspresije i HER-2 i TOP2A (petogodišnji period preživljavanja postoji kod oko 85% pacijentkinja sa karcinomima koji su HER-2 i TOP2A negativni) <sup>41</sup>. Prekomerna ekspresija bilo kojeg od ovih markera vodi ka smanjenju prosečnog perioda preživljavanja. Petogodišnje preživljavanje svojstveno je za 60% pacijentkinja kod kojih postoji prekomerna ekspresija HER-2 i oko 64% pacijentkinja sa prekomernom ekspresijom TOP2A <sup>41</sup>. Prosečno preživljavanje kod pacijentkinja sa prekomernom ekspresijom HER-2 proteina iznosi oko 68 meseci, dok je kod pacijentkinja sa ekspresijom TOP2A oko 104 meseca <sup>41</sup>. Najlošiji ishod bolesti javlja se u grupi pacijentkinja kod kojih postoji prekomerna ekspresija oba ova markera: prosečno preživljavanje iznosi oko 45 meseci, dok se petogodišnje preživljavanje beleži kod oko 33% obolelih <sup>41</sup>.

Na osnovu četvorogodišnjeg praćenja ispitanica u ovoj studiji „opšte preživljavanje“ je zabeleženo kod 58 ispitanica dok je smrtni ishod nastupio kod 2 ispitanice. Interesantan je podatak da je smrtni ishod u oba slučaja zabeležen kod pacijentkinja iz grupe luminalnog A tipa karcinoma dojke. Prema literaturnim navodima najkraće preživljavanje javlja se kod pacijentkinja iz HER-2 pozitivnog i trostruko negativnog tipa karcinoma dojke što u našoj studiji nije slučaj <sup>41,77,136</sup>. Međutim, bez obzira na smrtni ishod, najveći broj pacijentkinja sa trostruko negativnim tipom karcinoma dojke je samoinicijativno prekinuo lečenje tokom 2009. i 2010. godine, i takođe imao najkraći period preživljavanja, što takođe ukazuje na agresivnost tumorske promene i teško podnošenje primenjenog terapijskog protokola od strane ispitanica.

Na osnovu poznatih činjenica može se očekivati da pacijentkinje iz grupe luminalnog B i HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke zbog visoke ekspresije HER-2 receptora i TOP2A enzima, visoke učestalosti modifikacija *HER-2* i *TOP2A* gena, pokažu dobar odgovor na delovanje terapije antraciklinima. Prekomerna ekspresija HER-2 receptora i amplifikacija *HER-2* gena ukazuje na mogućnost dobrog odgovora pacijentkinja iz ove dve molekularne grupe na terapiju Herceptinom. Na osnovu

prekomerne ekspresije HER-2 receptora i prisustva amplifikacije njegovog gena šest pacijentkinja iz naše studije sa luminalnim B i dve pacijentkinja sa HER-2 pozitivnim tipom karcinoma dojke primile su terapiju Herceptinom, dok su tri pacijentkinje odbile ovaj vid terapije. Nasuprot ovim, pacijentkinje iz grupe luminalnog A tipa karcinoma dojke su pokazale dobar odgovor na hormonsku terapiju tamoksifenom i ciklofosfamidom, koja je kod navedenih ispitanica primenjena na osnovu pozitivne ekspresije ER-R i PR-R, a koji indikuju dobar odgovor na hormonsku terapiju. U našoj studiji većina pacijentkinja luminalnog A i B tipa karcinoma dojke podvrgnuta je delovanju kombinacije hemoterapijskih agenasa (AC, CMF), hormonske terapije (tamoksifen, nolvadeks) i terapije zračenjem. Imajući u vidu da ove grupe pacijentkinja karakteriše visok stepen ekspresije steroidnih receptora opravdan je i pozitivan odgovor na terapiju tamoksifenom.

### **V.3. KLINIČKI ZNAČAJ ISPITIVANJA PROTEINSKE EKSPRESIJE I GENSKIH MODIFIKACIJA U KARCINOMU DOJKE**

#### **V.3.1. Značaj ispitivanja proteinskog i genskog statusa HER-2 u karcinomu dojke**

Karcinom dojke ne predstavlja jedno oboljenje već složenu grupu bolesti koja obuhvata više različitih tumorskih tipova, svaki sa različitom prirodom i posebnim zahtevom za specifičnim terapijskim programom<sup>49,137</sup>. Prekomerna ekspresija HER-2 receptora služi za definisanje i distinkciju molekularnih tipova karcinoma dojke<sup>26</sup>. *HER-2* gen spada u grupu gena koji kodiraju transmembranske receptore za faktore rasta, uključujući HER-1, HER-2, HER-3 i HER-4. Intracelularni domen HER-2 receptora poseduje tirozin-kinaznu aktivnost i reguliše značajne aspekte fiziologije, rasta i diferencijacije ćelija. Ekstracelularni domen HER-2 receptora interaguje sa receptorskim ligandima formirajući heterodimere koji obezbeđuju dalje konformacione promene i aktiviranje signalne transdukcije. S obzirom da do danas nije pronađen specifični ligand koji bi se isključivo vezivao samo za HER-2 receptor, pretpostavlja se da je primarna uloga ovog receptora u modulaciji signalnih puteva nakon vezivanja liganada za ostale članove HER receptorske familije. Amplifikacija *HER-2* onkogeni koji se nalazi na hromozomu 17 izaziva značajno povećanje ekspresije HER-2 receptora

na površini tumorskih ćelija<sup>137</sup>. Mehanizam kojim dolazi do selektivne amplifikacije samo *HER-2* gena do danas nije poznat. Klinički značaj *HER-2* receptora izašao je u prvi plan u trenutku kada je potvrđeno da *HER-2* pozitivni tumori dojke imaju lošiju prognozu i agresivniji tok bolesti u odnosu na *HER-2* negativne tumore dojke<sup>137</sup>.

Na osnovu rezultata većine studija između 20% i 40% svih invazivnih karcinoma dojke odlikuje pozitivna ekspresija *HER-2* receptora. Amplifikacija gena koja uslovljava prekomernu ekspresiju *HER-2* proteina se odvija za vreme *in situ* faze razvoja tumora. Nakon inicijalnog procesa amplifikacije *HER-2* gena, fenotip koga karakteriše prekomerna ekspresija *HER-2* receptora održava se za sve vreme razvoja primarnog karcinoma kao i kasnije tokom pojave metastaza<sup>137</sup>. Zbog svega navedenog, testiranje stepena ekspresije *HER-2* receptora se obavlja ili kod primarnog tumora ili u metastaskoj fazi njegovog razvoja sa veoma sličnim rezultatima. Karcinomi dojke koje karakteriše pozitivna ekspresija *HER-2* receptora imaju specifične molekularne karakteristike koji ih razlikuju u odnosu na druge tipove karcinoma dojke<sup>136</sup>. Takođe, ove karcinome karakterišu i specifične makroskopske i histološke osobine tokom pojave i razvoja bolesti<sup>42,137</sup>. Populacione studije i retrospektivna analiza su pokazali da se prekomerna ekspresija *HER-2* receptora javlja u slabo diferenciranim tipovima tumora dojke, zajedno sa pozitivnom tumorskom infiltracijom regionalnih limfnih čvorova i visokim indeksom proliferacije kao i stepenom povećane rezistentnosti na standardnu hemoterapijsku kombinaciju<sup>42,137</sup>.

Ispitivanja su pokazala da hemoterapija zasnovana na antraciklinima ima pozitivan efekat naročito kod pacijentkinja sa prekomernom ekspresijom *HER-2* receptora. Polovina *HER-2* pozitivnih tumora dojke takođe ispoljava i pozitivnu ekspresiju *ER-R* i *PR-R*<sup>137</sup>. Međutim, kod *HER-2* pozitivnih tumora dojke, nivo pozitivne ekspresije steroidnih receptora je uglavnom jako nizak, tako da su u tim slučajevima tumori sa pozitivnom ekspresijom *HER-2* receptora rezistentni na antihormonsku terapiju tamoksifenom<sup>137</sup>. Amplifikacija *HER-2* gena se retko javlja izvan tumorskih ćelija karcinoma dojke. Druge vrste tumora koje pokazuju nizak nivo amplifikacije *HER-2* gena, ispoljavaju znatno niži nivo ekspresije *HER-2* receptora u odnosu na tumorske ćelije karcinoma dojke<sup>137</sup>. Rezultati laboratorijskih i kliničkih studija su pokazali da je inhibicija ćelijskog rasta i deoba ćelija pod dejstvom transtuzumaba isključivo ograničena na ćelije koje ekspimiraju *HER-2* receptor<sup>137</sup>.

Zbog svega toga je ispitivanje stepena ekspresije HER-2, i na genskom i na proteinskom nivou, postalo osnovna smernica za selekciju pacijentkinja koje će imati dobar odgovor na terapiju transtuzumabom. S obzirom na veliki uspeh ovih kliničkih studija, testiranje stepena ekspresije HER-2 je uvedeno u rutinsku kliničku praksu kod pacijentkinja oboljelih od karcinoma dojke<sup>137</sup>.

Napredak u ispitivanju značaja testiranja HER-2 u kliničkoj i terapijskoj praksi sumirali su u svojim opsežnim studijama Piccart-Gebhart i Romond i kolege<sup>109,138</sup>. Oni su pokazali da trastuzumab može drastično da utiče na poboljšanje opšteg stanja i ishoda bolesti kod pacijentkinja sa HER-2 pozitivnim karcinomima dojke<sup>109,138</sup>. Klinički efekat trastuzumaba je poznat, ali je molekularni mehanizam njegovog delovanja još uvek nedovoljno ispitan. Laboratorijske studije i limitirani podaci dobijeni iz kliničkih studija ukazuju na mnoštvo mogućih mehanizama kojima transtuzumab obavlja svoju aktivnost. Nakon vezivanja za HER-2 receptor, transtuzumab aktivira proces apoptoze, utiče na smanjenje ekspresije HER-2 receptora na površini ćelije, inhibira aktivaciju signalnog i regulatornog puta tokom ćelijskog ciklusa, smanjuje sintezu i ekspresiju VEGF i pospešuje efekat hemoterapije<sup>137</sup>. Ispitivanja su takođe pokazala da pozitivan efekat transtuzumaba izostaje u slučajevima kada nije prisutna prekomerna ekspresija HER-2 receptora<sup>137</sup>. Na osnovu ovih tvrdnji postavljena je osnovna hipoteza da je za pozitivan efekat transtuzumaba neophodna amplifikacija *HER-2* gena kao i prekomerna ekspresija njegovog proteina. Bolje razumevanje biološke uloge transtuzumaba je od ključnog značaja za poboljšanje efekta njegovog tretmana u terapijskom protokolu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke. Optimalno delovanje terapije transtuzumabom zavisi od biološkog mehanizma delovanja koje ovo antitelo ostvaruje u ćelijama karcinoma dojke. Na osnovu dosadašnjih rezultata nije poznato koliki stepen *HER-2* genske amplifikacije je neophodno dostići da bi terapija transtuzumabom imala pozitivan efekat<sup>137</sup>.

Pojava rezistentnosti na transtuzumab je trenutno u fazi ispitivanja sa različitim aspektata, ali potpuno objašnjenje ove pojave nije do sada poznato. Strategije za prevazilaženje problema rezistentnosti na terapiju transtuzumabom uključuju interference sa koreceptorima HER-2 čime se blokira interakcija sa drugim članovima HER receptorske familije ili modulacija signalnih puteva koji su povezani sa ovim receptorom. Ispitivanja na *in vitro* modelima su ukazala na značajnu međusobnu

povezanost HER-2 signalnog puta i signalnog puta u koji su uključeni VEGF i ER-R <sup>136</sup>. Sve je veći broj kliničkih studija o primeni anti-HER-2, anti-VEGF i anti-ER-R terapijskih protokola kod pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na različite nivoe ekspresije ovih bioloških markera <sup>137</sup>. Rastuća biološka raznovrsnost koja leži u osnovi molekularne klasifikacije karcinoma dojke obezbeđuje razvrstavanje pacijentkinja u grupe koje imaju benefit od specifičnih terapijskih kombinacija zbog čega je određivanje stepena amplifikacije i proteinske ekspresije HER-2 jako značajno <sup>137</sup>.

Rezultati ove studije su pokazali da je pozitivna ekspresija HER-2 receptora zastupljena kod više od polovine ispitanica (32/60, 52.4%). Međutim, bez obzira na veliki broj ispitanica sa pozitivnom ekspresijom HER-2 receptora terapijski protokol kod ovih pacijentkinja nije podrazumevao i primenu Herceptina kako bi se moglo očekivati na osnovu kliničke slike i ekspresije ovog markera. Ukupno sedam ispitanica od 32 kod kojih je registrovana pozitivna ekspresija HER-2 receptora podvrgnute su terapiji Herceptinom. Tri ispitanice su zbog opšteg lošeg stanja i tegoba prilikom primene terapije odbile ovaj vid terapije tokom lečenja. Četiri godine nakon primenjene terapije ispitanice koje su podvrgnute ovom vidu terapije imaju uredan nalaz bez pojave recidiva.

### **V.3.2. Značaj ispitivanja proteinskog i genskog statusa TOP2A u karcinomu dojke**

Novije studije uglavnom se fokusiraju na ispitivanje aberacija *HER-2* i *TOP2A* gena u karcinomu dojke. TOP2A enzim predstavlja mesto delovanja antraciklina koji se najčešće primenjuju kao terapijsko sredstvo kod pacijentkinja sa karcinomom dojke koje ispoljavaju pozitivnu ekspresiju ovog enzima <sup>136</sup>. Međutim, pored pozitivnog efekta na tumorske ćelije, antraciklini imaju i toksični efekat izazivajući u ćelijama različita oštećenja putem aktiviranja drugih signalnih puteva i enzimskih reakcija. Nedavno je potvrđeno da TOP2A enzim posreduje u oštećenjima DNK izazvanim antraciklinima <sup>138</sup>. Stabilizacijom kompleksa DNK-TOP2A dolazi do povećanog razdvajanja lanaca DNK i inhibicije ponovnog uspostavljanja dvostrukih lanaca DNK što dovodi do aktiviranja procesa apoptoze <sup>138</sup>. Studije su pokazale takođe da je TOP2A znatno osetljivija na delovanje inhibitora od TOP2B. Ispitivanja na ćelijskim kulturama su pokazala da je nivo osetljivosti ćelija na delovanje antraciklina direktno srazmeran

stepenu ekspresije TOP2A enzima tj. nivou amplifikacije njegovog gena <sup>138</sup>. Iako su literaturni podaci koji se odnose na vezu između nivoa ekspresije TOP2A i stepena delovanja antraciklinske terapije heterogenic, nekoliko studija obuhvaćenih obimnom metaanalizom su pokazale da dobar odgovor na antraciklinsku terapiju uglavnom imaju pacijentkinje sa prekomernom ekspresijom HER-2 receptora i/ili amplifikacijom *HER-2* gena <sup>138</sup>. Međutim, bilo je i studija koje nisu uspele da dokažu značajniju vezu između nivoa ekspresije HER-2 i odgovora na antraciklinsku terapiju <sup>139</sup>. Takođe, u najvećem broju slučajeva u karcinomima dojke u kojima postoji amplifikacija *HER-2* gena može se zabeležiti i amplifikacija ili delecija *TOP2A* gena, pri čemu je amplifikacija nešto učestalija u odnosu na gensku deleciju. Imajući u vidu ovu činjenicu većina istraživača smatra da je genski status *TOP2A* ključan u predviđanju efikasnosti primenjene antraciklinske terapije <sup>138</sup>. S obzirom da se amplifikacija *TOP2A* gena najčešće javlja zajedno sa amplifikacijom *HER-2* gena većina istraživača se slaže oko tvrdnje da najbolji odgovor na antraciklinsku terapiju imaju pacijentkinje sa koamplifikacijom *TOP2A* i *HER-2* <sup>140</sup>. U prilog ovom navodu idu i rezultati Pressove studije koji su pokazali da pacijentkinje sa *TOP2A* i *HER-2* koamplifikacijom, tretirane doksorubicinom i ciklofosfamidom, ispoljavaju dobar odgovor kao i prilikom primene terapije ciklofosfamidom i transtuzumabom, pri čemu im je opšte preživljavanje znatno duže nego kod pacijentkinja kod kojih je primenjena samo terapija transtuzumabom <sup>140</sup>. Takođe, delecija *TOP2A* gena u ovoj studiji nije imala nikakve jasne veze sa stepenom terapijskog odgovora <sup>140</sup>. Knoop je takođe potvrdio da pacijentkinje imaju bolji odgovor i duži period preživljavanja kada se tretiraju CEF u odnosu na CMF terapijski protokol <sup>141</sup>. Međutim, veća senzitivnost tumora sa amplifikacijom *TOP2A* gena ne može se povezati sa ekspresijom TOP2A enzima s obzirom da je nivo njegove ekspresije odraz različitih ćelijskih procesa. Naime, dokazano je da genska amplifikacija *TOP2A* ne dovodi uvek do prekomerne ekspresije TOP2A enzima, kao i da su genska amplifikacija i prekomerna ekspresija TOP2A svojstvene za različite molekularne tipove karcinoma dojke <sup>141</sup>. Bartlett je pokušao da objasni pojavu heterogenosti rezultata koji se odnose na vezu između *TOP2A* statusa i efekta antraciklinske terapije <sup>77</sup>. Glavni zaključak njegove studije ukazuje da je za dobar odgovor na antraciklinsku terapiju presudna duplikacija centromeričnog regiona hromozoma 17 na kome se nalaze *HER-2* i *TOP2A*, a da genski status ova dva molekula nema značaja za ukupan efekat terapijskog protokola <sup>77</sup>. U

njegovoj studiji amplifikacija *HER-2* gena bila je udružena sa delecijom gena za *TOP2A* i dupliranjem centromeričnog regiona hromozoma 17, ali je benefit od antraciklinske terapije bio ispoljen samo kod pacijentkinja kod kojih je postojalo dupliranje centromeričnog regiona. Ovim se barem delimično može objasniti heterogenost dobijenih rezultata kada su u pitanju efekti terapijskih protokola i njihova veza sa *TOP2A* i *HER-2* statusom<sup>77</sup>.

Jedan od problema koji je vezan za *TOP2A* genski status jeste i veliko neslaganje između rezultata dobijenih iz više različitih studija, pri čemu je stepen razmimoilaženja oko 31%<sup>140</sup>. Naime, neke studije su pokazale da pacijentkinje sa ekspresijom *TOP2A* enzima dobro odgovaraju na terapiju antraciklinima, ali da im je period preživljavanja skraćen u odnosu na grupu pacijentkinja koja nije bila podvrgnuta ovom terapijskom protokolu<sup>140</sup>. Studije koje su sprovedene na ispitanicama sa pozitivnom ekspresijom hormonskih receptora i negativnom ekspresijom *HER-2* receptora su pokazale da nivo iRNK za *TOP2A* značajno korelira sa opštim preživljavanjem kod pacijentkinja nakon tretmana doksorubicinom<sup>140</sup>. Poređenjem efekata pojedinačnih terapijskih agenasa, utvrđeno je da nivo ekspresije *TOP2A* značajno korelira sa delovanjem doksorubicina u odnosu na docetaksel<sup>140</sup>.

Pozitivna ekspresija *TOP2A* proteina je u našoj studiji zabeležena u 34 karcinoma dojke, dok su genske aberacije *TOP2A* prisutne kod 29 tumora, i to u 15 tumora je prisutan nizak nivo amplifikacije, u devet visok nivo amplifikacije i u pet tumora je zabeležena delecija *TOP2A* gena. Pozitivna ekspresija *TOP2A* proteina kao i genske modifikacije dominantno su prisutne u tumorima ispitanica luminalnog B i *HER-2* pozitivnog tipa. Klinički značaj ispitivanja prisustva ekspresije *TOP2A* proteina i genskih aberacija *TOP2A* kod karcinoma dojke odnosi se na predikciju odgovora na terapiju antraciklinima kao i odabir pacijentkinja koje će od ove terapije imati poboljšanje tokom lečenja<sup>140</sup>. Najveći broj ispitanice iz sva četiri molekularna tipa karcinoma dojke bio je podvrgnut hemoterapijskom tretmanu. Naime, sve ispitanice trostruko negativnog (100%) i *HER-2* pozitivnog tipa (100%), kao i 17 ispitanica luminalnog A (70.8%) i 18 ispitanica luminalnog B tipa (69.2%) podvrgnuto je ovom terapijskom protokolu. Smrtni ishod koji je nastupio kao posledica karcinoma dojke zabeležen je kod dve ispitanice iz luminalnog A tipa od kojih je kod jedne primenjena terapija antraciklinima. Godinu dana nakon početka primene terapije jedna od ispitanica

je preminula, dok je kod drugog smrtnog ishoda bolest otkrivena u podmakloj fazi tako da je ispitanica preminula posle hirurške intervencije pre primene bilo kakve terapije. Kod svih ispitanica kod kojih se pojavila metastaza u terapijski protokol je bila uključena i hemoterapija, i kod većine (6/7, 85.7%) je detektovana pozitivna ekspresija TOP2A proteina što ukazuje na lošu prognozu i očigledno teži terapijski i klinički tok bolesti kod navedenih ispitanica.



## VI ZAKLJUČAK

**Na osnovu rezultata ispitivanja ekspresije bioloških markera mogu se izvesti sledeći zaključci:**

Stepen ekspresije **ER-R**, **PR-R** i **HER-2** receptora predstavlja osnovni kriterijum za podelu karcinoma dojke u četiri odgovarajuća molekularna tipa: luminalni A, luminalni B, HER-2 pozitivni i trostruko negativni tip. Podela karcinoma dojke na osnovu stepena ekspresije ER-R, PR-R i HER-2 receptora omogućava specifičnije i preciznije određivanje terapijskog protokola, kao i predviđanje samog toka i ishoda bolesti kod ispitanica sa karcinomom dojke. Pored ekspresije navedenih markera, opšte kliničko-patološke karakteristike karcinoma ukazuju da kod ova četiri tipa karcinoma postoje razlike u toku i napredovanju bolesti, pojavi metastaza, kao i stepenu odgovora na odgovarajući vid primenjene terapije. Rezultati ove studije su pokazali da luminalne tipove karcinoma dojke generalno karakterišu tumori male veličine, odsustvo infiltracije tumorskih ćelija u lokalne limfne noduse, umerena diferentovanost tumora histološkog gradusa G2 i dugačak period opšteg preživljavanja kao i period preživljavanja bez pojave recidiva bolesti. Trostruko negativne i HER-2 pozitivne tipove karcinoma dojke sa druge strane karakterisao je veći dijametar tumora, najčešće slaba diferentovanost tumora histološkog gradusa G3, učestalija zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa tumorskim ćelijama kao i kraće preživljavanje naročito kod ispitanica trostruko negativnog tipa.

Rezultati ispitivanja proteinske ekspresije i genskih modifikacija bioloških markera u našoj studiji pokazali su određene pravilnosti u stepenu i prisustvu ekspresije u odnosu na molekularnu klasifikaciju karcinoma dojke. Tako je ekspresija p53 proteina najviše zastupljena u tumorima trostruko negativnog tipa, Bcl-2 proteina u tumorima ispitanica luminalnog A i luminalnog B tipa, TOP2A protein je imao najveću ekspresiju u tumorima luminalnog B tipa, TOP2A genske aberacije u tumorima ispitanica HER-2 pozitivnog tipa i HER-2 genske aberacije u tumorima luminalnog B i HER-2 pozitivnog tipa karcinoma dojke, dok se ekspresija BRCA1 proteina i apoptotski indeks nisu statistički značajno razlikovali između ispitivanih molekularnih tipova karcinoma dojke.

Visoka ekspresija antiapoptotskog proteina Bcl-2 u tumorima luminalnog A i B tipa sa jedne strane, a tumor supresornog proteina p53 u tumorima trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog tipa sa druge strane, kao i potpuno redukovana ekspresija Bcl-2 proteina (HER-2 pozitivni tip karcinoma dojke) ukazuje na budući tok bolesti, prognozu ishoda same bolesti i značajno doprinose predviđanju odgovora na primenjenu terapiju. S obzirom da ekspresija Bcl-2 proteina ukazuje na dobru prognozu ishoda bolesti, dok ekspresija tumor supresornog proteina p53 udružena sa visokim indeksom proliferacije predstavlja faktor loše prognoze i kraćeg preživljavanja ispitanica, rezultati ekspresije ovih bioloških markera dobijeni u našoj studiji sugerišu dobru prognozu, duže preživljavanje i dobar odgovor na hormonsku terapiju kod ispitanica sa luminalnim tipovima karcinoma dojke, a agresivniji tok bolesti i kraće preživljavanje kod ispitanica sa trostruko negativnim i HER-2 pozitivnim tipom karcinoma dojke.

S obzirom da su genski statusi *HER-2* i *TOP2A* najznačajniji prediktivni i prognostički markeri u karcinomu dojke, na osnovu naših rezultata može se zaključiti da luminalni B i HER-2 pozitivni tip karcinoma dojke imaju učestaliju pojavu genskih aberacija *HER-2* što se može i očekivati na osnovu pozitivne ekspresije HER-2 receptora u ovim tumorima. Genske aberacije *TOP2A* su prisutne pored luminalnog B i HER-2 pozitivnog i u luminalnom A tipu karcinoma dojke. Imajući u vidu učestaliju zastupljenost *TOP2A* genskih aberacija u ispitivanim karcinomima možemo opravdano reći da genske aberacije *TOP2A* predstavljaju nezavisan prognostički marker u karcinomima dojke koji ukazuje na agresivniji tok bolesti i dobar odgovor na terapiju antraciklinima.

Na osnovu rezultata naše studije starost ispitanica ne utiče na nivo ekspresije bioloških markera. Genski statusi *HER-2* i *TOP2A* su pokazali negativnu korelaciju u odnosu na ekspresiju ER-R, PR-R i Bcl-2 proteina, koji su poznati kao faktori dobre prognoze, blažeg toka bolesti kao i dobrog odgovora na hormonsku terapiju. Imajući u vidu ove nalaze i činjenicu da tumori u kojima dominira visok nivo amplifikacije *HER-2* i *TOP2A* istovremeno odlikuje niska ekspresija ER-R, PR-R i Bcl-2 proteina, može se zaključiti da ispitanice sa amplifikacijom *HER-2* i *TOP2A* gena imaju predispoziciju da razviju agresivnije forme tumora, sa težim tokom bolesti, kraćim preživljavanjem i eventualno dobrim odgovorom na antraciklinsku terapiju.

Imajući u vidu činjenicu da su opšte kliničko-patološke karakteristike karcinoma iz grupe luminalnih tipova najčešće korelirale sa niskim nivoom ekspresije p53 proteina, očuvanom ekspresijom Bcl-2 proteina i niskim vrednostima proliferativnog indeksa, nameće se zaključak da ovi tumori imaju blaži tok, sporije napredovanje, manju verovatnoću za pojavu metastaza u odnosu na trostruko negativne i HER-2 pozitivne tipove tumora kao i dobar odgovor na hormonsku terapiju nolvadeksom i tamoksifenom. Za razliku od ovih tumora, karcinome trostruko negativnog i HER-2 pozitivnog tipa karakterisao je visok stepen ekspresije p53 proteina, visok indeks proliferacije tumorskih ćelija i nizak nivo tj. potpuno odsustvo pozitivne ekspresije Bcl-2 proteina što sve ukazuje na agresivniji tok bolesti, brže napredovanje, veću verovatnoću za pojavu metastaza i ponovnog recidiva bolesti kod ispitanica sa ovim tipovima tumora.

Takođe, tumore pacijentkinja iz luminalnog B tipa karcinoma dojke karakterisao je visok procenat slučajeva sa amplifikacijom i delecijom *TOP2A* gena bez obzira na status *HER-2* gena, što opravdava pretpostavku da se genske aberacija *TOP2A* mogu smatrati individualnim prognostičkim markerom predviđanja odgovora na terapiju antraciklinima.

Na osnovu sumiranja svih rezultata može se zaključiti da luminalne tipove karcinoma dojke sa jedne strane, i trostruko negativne i HER-2 pozitivne tipove karcinoma sa druge strane, karakteriše određeni model ekspresije ispitivanih bioloških markera što je značajno za izbor terapije, predviđanje odgovora na terapiju i ishoda same bolesti kod ispitanica sa karcinomom dojke.

## VII LITERATURA

1. Hilakivi–Clarke L. Estrogens, BRCA1, and breast cancer. *Cancer Res* **2000**; 60:4993–5001.
2. Incidenca i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2009. Registar za rak u centralnoj Srbiji, izveštaj br. 11, Institut za zaštitu zdravlja “Dr Milan Jovanović-Batut”, Beograd, **2011**.
3. Mladenović J, Borojević N, Šašić J. Uloga postoperacione zračne terapije u lečenju ranog karcinoma dojke. *Srps arh cel lek* **2002**; 130:345–350.
4. Duffy MJ. Biochemical markers in breast cancer: which ones are clinically useful? *Clin Biochem* **2001**; 34:347–352.
5. Magić MB, Janković R, Radulović S. Molecular genetics of breast cancer: Possible clinical implication. *Arch Oncol* **2002**; 17:168–169.
6. Schnitt SJ. Traditional and newer pathologic factors. *J Nat Cancer Inst Monog* **2001**; 30:22–26.
7. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* **2000**; 21:427–433.
8. Couch FJ, DeShano M, Blackwood A, Calzone Kathleen, Stopfer J, Campeau L, Ganguly A, Rebbeck T, Weber BL. *BRCA1* mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* **1997**; 336: 1409–1415.
9. Lee W-Y, Jin Y-T, Chang T-W, Lin P-W, Su I-J. Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. *Histopatology* **1999**; 34:106–112.
10. Rochefort H. Estrogen-induced genes in breast cancer, and their medical importance. *Bull Acad Natl Med* **1999**; 183:955–968.
11. Ruibal A, Arias J. Clinical-biological impact of pS2 positivity in infiltrating ductal carcinomas of the estrogen receptive breast receptor. *Med Nucl* **2000**; 16:428–433.
12. Šušnjar S, Nešković-Konstantinović Z, Stamatović Lj, Vasović S, Štrbac M, Nikolić-Vukosavljević D, Jovanović D. Združeni sadržaj receptora za estrogen i progesteron u predviđanju odgovora na hemioterapiju i hormonsku terapiju u

karcinomu dojke sa povećanom ekspresijom receptora za humani epidermalni faktor rasta dva. *Srps arh cel lek* **2003**; 131:443–448.

13. Tong D, Schneeberger C, Czerwenka K, Schmutzler RK, Speiser P, Kucera E, Concin N, Kubista E, Leodolter S, Zeillinger R. Messenger RNA determination of estrogen receptor, progesterone receptor, pS2, and plasminogen activator inhibitor-1 by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction in human breast cancer. *Clin Cancer Res* **1999**; 5:1497–1502.
14. Kattlove H, Winn RJ. Ongoing care of patients after primary treatment for their cancer. *CA Cancer J Clin* **2003**; 54:172–196.
15. Ademuyiwa FO, Olopade OI. Racial differences in genetic factors associated with breast cancer. *Cancer Metast Rev* **2003**; 22:47–53.
16. Bergfeldt K, Rydh B, Granath F, Grönberg H, Thalib L, Adami HO, Hall P. Risk of ovarian cancer in breast-cancer patient with a family history of breast or ovarian cancer: a population-based cohort study. *Lancet* **2002**; 360:891–894.
17. Bertolo C, Guerrero D, Vicente F, Cordoba A, Esteller M, Ropero S, Guillen-Grima F, Martinez-Peñuela JM, Lera JM. Differences and molecular immunohistochemical parameters in the subtypes of infiltrating ductal breast cancer. *Adv Anat Pathol* **2008**; 130: 414-424.
18. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* **2000**; 408: 307–310.
19. Marchio C, Reis-Filho JS. Molecular diagnosis in breast cancer. *Diagnos Histopathol* **2008**; 14:202-13.
20. Ellis IO, Pinder SE, Lee AHS, Elston CW. Tumors of the breast. In: *Diagnostic Histopathology of Tumors*, Fletcher DM (ed), second edition, volume 1, Churchill Livingstone, Edinburg, UK, **2002**, pp 865–930.
21. Hamilton A, Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: A review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2. *Ann Oncol* **2000**; 11:647–663.
22. Dajjat S, Neel H, Piette. MDM2: life without p53. *Trends Genet* **2001**; 17:459–464.
23. Culver JOB, Hull JL, Levy-Lahad E, Daly MB, Burke W. *BRCA1* and *BRCA2* hereditary breast/ovarian cancer. University of Washington, Seattle **1998**; 1–11.

24. Tavassoeli FA. World Health Organization: tumours of the breast and female genital organs (Who/IARC classification of tumours) (IARC WHO classification of tumours). **2003**.
25. Calza S, Hal P, Auer G, Bjöhle J, Klaar S, Kronenwett U, Liu ET, Miller L, Ploner A, Smeds J, Bergh J, Pawitan Y. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. *Breast Cancer Res* **2006**; 8: 1-9.
26. Verma S, Bal A, Joshi K, Arora S, Singh L. Immunohistochemical characterization of molecular subtypes of invasive breast cancer: a study from North India. *APMIS* **2012**; 120: 1008-1019.
27. Geyer FC, Rodrigues DN, Weigelt B, Reis-Filho JS. Molecular classification of estrogen receptor-positive/Luminal breast cancers. *Adv Anat Pathol* **2012**; 19:39–53.
28. Lund MJ, Trivers KF, Porter PL, Coates RJ, Leyland-Jones B, Brawley OW, Flagg EW, O'Regan RM, Gabram SG, Eley JW. Race and triple negative threats to breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat* **2009**; 113:357-70.
29. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*, **2008**; 52:108-18.
30. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Dongxia Gao, Samuel Leung , Jacqueline Snider, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with Luminal B breast cancer. *J Nation Cancer Inst* **2009**; 101:736–50.
31. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D. Prognostic factors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* **2000**; 124:966–78.
32. Daly MB, Hull JL, Levy-Lahad E. Breast cancer genetics overview. University of Washington, Seattle **2000**; 1–5.
33. Keen JC, Davidson NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer* **2003**; 97 (Suppl 3):825–33.
34. Burke W. Genetic testing. *New Engl J Med* **2002**; 347:1867–1875
35. Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* **2001**; 61:1–13.

36. Järvinen TA, Liu ET. HER2-neu and topoisomerase II alpha in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2003**; 78:299-311.
37. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. Eds. *TNM Classification of Malignant Tumors*, 7<sup>th</sup> ed. Wiley-Blackwell, Oxford **2009**. 310 pages. ISBN 978-1-4443-3241-4.
38. Silverberg SG. *Atlas of Breast Pathology*. W.B. Saunders Company, Elsevier Science, Philadelphia, Pennsylvania, **2002**.
39. Todorović V. Tumorski antigeni (markeri). U: *Patološka fiziologija*, Milenković P, urednik, Univerzitet u Beogradu, Beograd **2003**, str. 109-122.
40. Micev M. Histogeneza tumora strome gastrointestinalnog trakta – imunohisthemijska i ultrastruktorna studija. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu, **2008** godine.
41. Fritz P, Cabrera C, Dippon J, Gerteis A, Wolfgang S, Walter A, van der Kuip H. c-erbB2 and topoisomerase II alpha protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study. *Breast Cancer Res*, **2005**; 7:374-84.
42. Herd O. Molecular characterization of the HER2-TOP2A amplicon in breast cancer. A dissertation submitted to the Faculty of Health Sciences, University of Witwatersrand, **2009**.
43. Järvinen TA, Tanner M, Barlund M, Borg A, Isola J. Characterization of topoisomerase II alpha gene amplification and deletion in breast cancer. *Gen Chromo Can* **1999**; 26:142–50.
44. Wendorff T, Schmidt B, Heslop P, Austin C, Berger J. The structure of DNA-bound human Topoisomerase II Alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. *J Mol Biol* **2012**; doi:10.1016/j.jmb.2012.07.014.
45. Arriola E, Marchio C, Tan DS, Drury SC, Lambros MD, Natrajan R, Rodriguez-Pinilla SM, Mackay A, Tamber N, Fenwick K, Jones C, Dowsett M, Ashworth A, Reis-Filho JS. Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines. *Lab Invest* **2008**; 88: 491–503.
46. Stanta G, Bonin S, Losi L, Eusebi V. Molecular characterization of intraductal breast carcinomas. *Virchows Arch* **1998**; 432:107–11.

47. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Miller KD. Frequency of estrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7,016 breast carcinoma: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value and mammographic screening. *J Clin Pathol* **2000a**; 53: 688–696.
48. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow IG, Miller KD. Reliability of immunohistochemical demonstration of estrogen receptors in routine practice: inter-laboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring system. *J Clin Pathol* **2000b**; 53:125–130.
49. Kuter I. Breast cancer. *Oncologist* **2001**; 6:338–46.
50. Osin PP, Lakhani RS. The pathology of familial breast cancer: Immunohistochemistry and molecular analysis. *Breast Cancer Res* **1999**; 1:36–40.
51. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Miller KD. Immunohistochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors: correlation of standards achieved on «in house» tumors with achieved on external quality assessment material in over 150 laboratories from 26 countries. *J Clin Pathol* **2000c**; 53: 292–301.
52. Gostissa M, Hofmann TG, Will Hans, del Sal G. Regulation of p53 functions: let's meet at the nuclear bodies. *Curr Opin Cell Biol* **2003**; 15:351–7.
53. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce C: The t(14:18) chromosome translocation involved in B-cell neoplasms results from mistakes in VDJ joining. *Science (Washington DC)* **1985**; 229:1390–1393.
54. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBridde OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ: Cloning of the chromosomal breakpoint of t(14:18) human lymphomas: Clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **1985**; 41:899–906.
55. Vermeulen K, Berneman NZ, Van Bockstaele RD. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* **2003**; 36:165-175.
56. Strasser A, Huang DCS, Vaux DL. The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implication of defects in cell death control for tumor genesis and resistance to chemotherapy. *Biochem Biophys Acta* **1997**; 1333:151–78.
57. Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ* **2001**; 322:1528–1532.
58. Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol* **2000**; 53:55-63.



59. Hall PA. Assessing apoptosis: a critical survey. *Endocrine-Related Cancer* **1999**; 6:3-8.
60. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* **2000**; 407:810-816.
61. Shao C, Folkard M, Held KD, Prise KM. Estrogen enhanced cell-cell signalling in breast cancer cells exposed to targeted irradiation. *BMC Cancer* **2008**; 8:184-193.
62. Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, Pratt C, Howard B, Zapata JM, Frenkel V, Robertson S, Ionov Y, Yamamoto H, Perucho M, Takayama S, Reed JC. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* **1999**; 6:29–40.
63. Xu H, Yu Y, Marciniak D, Rishi AK, Sarkar FH, Kucuk O, Majumdar APN. Epidermal growth factor receptor (EGFR)–related protein inhibits multiple members of the EGFR family in colon and breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **2005**; 4:435-442.
64. Nickerson T, Huynh H, Pollak M. Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**; 237:690–693.
65. Schorr K, Li M, Krajewski S, Reed JC, Furth PA. Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J Mamm Gland Biol Neoplas* **1999**; 4:153-164.
66. Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori S, Tsujimoto H, Imanishi T, Ogaki M, Ohyama T, Yamazaki J, Hagiwara A, Yamaguchi T, Sawai K, Takahashi T. Overexpression of bax sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and etoposide. *Surgery Today* **1997**; 27:676–679.
67. Schott AF, Apel IJ, Nunez G, Clarke MF. Bcl-XL protects cancer cells from p53-mediated apoptosis. *Oncogene* **1995**; 11:1389-1394.
68. Kumar R Vadlamudi RK, Adam L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocrine-Related Cancer* **2000**; 7:257–269.
69. Schöndorf T, Göhring UJ, Becker M, Hoopmann M, Schmidt T, Rützel S, Rein DT, Ulrich U, Fechteler R, Bersch A, Mallmann P, Valter MM. High apoptotic index correlates to p21 and p27 expression indicating a favorable outcome of

- primary breast cancer patients, but lacking prognostic significance in multivariate analysis. *Pathobiology* **2004**; 71:217–222.
70. Duchrow M, Schliiter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif* **1996**; 29:1-12.
  71. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin P, Hayes M, Gelmon K. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* **2010**; 11:174–83.
  72. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* **2005**; 16:1723–39.
  73. Azambuja E, Cardoso F, Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhar MJ, Paesmans M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12.155 patients. *Brit J Can* **2007**; 96:1504–13.
  74. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32.825 patients. *Breast* **2008**; 17:323–334.
  75. Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, Maiorano E, Colleoni M, Price KN, Golouh R, Perin T, Brown RW, Kovács A, Pillay K, Öhlschlegel C, Gusterson BA, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Goldhirsch A, Coates AS. Predictive value of tumor Ki67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **2008**; 100:207–12.
  76. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewska M, Treilleux I, Rupin M, Magherini E, Mackey J, Martin M, Vogel C. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol* **2009**; 27:1168–76.
  77. Bartlett JM, Munro A, Cameron DA, Thomas J, Prescott R, Twelves CJ. Type 1 receptor tyrosine kinase profiles identify patients with enhanced benefit from anthracyclines in the BR9601 adjuvant breast cancer chemotherapy trial. *J Clin Oncol* **2008**; 26:5027–35.

78. Di Leo A, Biganzoli L, Claudino W, Licitra S, Pestrin M, Larsimont D. Topoisomerase II alpha as a marker predicting anthracyclines' activity in early breast cancer patients: ready for the primetime? *Eur J Cancer* **2008**; 44:2791–2798.
79. Pritchard KI, Messersmith H, Elavathil L, Trudeau M, O'Malley F, Dhesy-Thind B. HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy. *J Clin Oncol* **2008**; 26:736–744.
80. Penault-Llorca F, Abrial C, Raoelfi Is I, Chollet P, Cayre A, Mouret-Reynier Ma, Thivat E, Mishellany F, Gimbergues P, Durando X. Changes and predictive and prognostic value of the mitotic index, Ki67, cyclin D1, and cyclo-oxygenase-2 in 710 operable breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist* **2008**; 13:1235–1245.
81. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **2009**; 101:736–750.
82. Culver JOB, Hull JL, Levy-Lahad E, Daly MB, Burke W. *BRCA1* and *BRCA2* hereditary breast/ovarian cancer. University of Washington, Seattle **1998**; 1–11.
83. Daly MB, Hull JL, Levy-Lahad E. Breast cancer genetics overview. University of Washington, Seattle **2000**; 1–5.
84. Narod SA, Foulkes WD. *BRCA1* and *BRCA2*: 1994 and beyond. *Nature Rev Cancer* **2004**; 4:665–676.
85. Lee W-Y, Jin Y-T, Chang T-W, Lin P-W, Su I-J. Immunolocalization of *BRCA1* protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. *Histopathology* **1999**; 34:106–112.
86. Narod SA, Brunet J-S, Ghadirian P, Robson M, Heimdal K, Neuhausen SL, Stoppa-Lyonnet D, Lerman C, Pasini B, de los Rios P, Barbara W, Lynch H. Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: a case-control study. *Lancet* **2000**; 356:1876–1881.
87. Zheng L, Annab LA, Afshari CA, Lee W-H, Boyer TG. *BRCA1* mediates ligand-independent transcriptional repression of the estrogen receptor. *PNAS* **2001**; 98:9587–9592.

88. Barnes DM. Expression and function of *BRCA1* and *BRCA2* in familial and sporadic breast cancer. *Histopathology* **1999**; 34:170–174.
89. Kim S, Rimm D, Cartner D, Khan A, Parisot N, Franco MA, Bale A, Haffty BG. BRCA status, molecular markers, and clinical variables in early, conservatively managed breast cancer. *Breast J* **2003**; 9:167–174.
90. Krainer M, Silva-Arrieta S, FitzGerald MG, Shimada A, Ishioka C, Kanamaru R, MacDonald DJ, Unsal H, Finkelstein DM, Bowcock A, Isselbacher KJ, Haber DA. Differential contributions of BRCA1 and BRCA2 to early-onset breast cancer. *N Engl J Med* **1997**; 336:1416–1421.
91. Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry of the breast. In: *Diagnostic Immunohistochemistry*, Dabbs DJ (ed), Churchill Livingstone, Philadelphia, Pennsylvania, USA, **2002**, pp 536-58.
92. Bartlett J, Mallon E, Cooke T. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? *J Pathol* **2003**; 199:411-417.
93. Ellis IO, Dowset M, Bartlett J, Walker R, Cooke T, Gullick W, Gusterson B, Mallon E, Bartlett Lee P. Recommendation for HER-2 testing in UK. *J Clin Pathol* **2000**; 53:890-892.
94. Leake R, Barnes D, Pinder S, Ellis I, Anderson AT, Adamson R, Rhodes T, Miller K, Walker R. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. *J Clin Pathol* **2000**; 53:634-635.
95. Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhenhuan Z, Kobayashi S, Iwase H. Coexistence of HER-2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res* **2004**; 6:R24-30.
96. Ioachim EE, Malamou-Mitsi V, Kamina SA, Goussia AC, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of bcl-2 protein in breast lesions: correlation with bax, p53, c-erbB-2, EGFR and proliferative indices. *Anti-Cancer Res* **2000**; 20:4221-4226.
97. Lee W-Y, Jin Y-T, Chang T-W, Lin P-W, Su I-J. Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. *Histopathology* **1999**; 34:106–112.

98. Pérez-Vallés A, Martorell-Cebollada M, Nogueira-Vázquez E, García-García JA, Fuster-Diana E. The usefulness of antibodies to the BRCA1 protein in detecting the mutated BRCA1 gene. An immunohistochemical study. *J Clin Pathol* **2001**; 54:476–480.
99. Mitrović O, Mičić M, Čokić V, Koko V, Đikić D, Budeč M, Vignjeviž S, Subotički T. BRCA1 and TOP2A gene amplification and protein expression in four molecular subtypes of breast cancer. *Archives of Biological Sciences* **2013**; 65:511-518.
100. Clark SE, Warwick J, Carpenter R, Bowen RL, Duffy SW, Jones JL. Molecular subtyping of DCIS: heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease. *Brit J Cancer* **2011**; 104:120–127.
101. Nešković–Konstantinović Z, Šušnjar S, Stamatović Lj, Vasović S, Nikolić–Vukosavljević D. Breast cancer biomarkers: Prognosis and prediction. *Arch Oncol* **2002**; 10:153–4.
102. Sismondia P, Bigliaa N, Ponzonea R, Fusoa L, Scafogliob C, Cicatiello L, Ravob M, Weiszb A, Ciminoc D, Altobellid G, Friardd O, De Bortolid M. Influence of estrogens and antiestrogens on the expression of selected hormone-responsive genes. *Maturitas* **2007**; 57:50–5.
103. Baqai T, Shousha S. Oestrogen receptor negativity as marker for high-grade ductal carcinoma *in situ* of breast. *Histopathology* **2003**; 42:440–447.
104. Rody A, Karn T, Ruckha E, Muller V, Gehrmann M, Solbach C, Ahr A, Gatje R, Holtrich U, Kaufmann M. Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2009**; 113:457–66.
105. Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori S, Nakatani H, Tsujimoto H, Imanishi T, Ohgaki M, Ohyama T, Yamazaki J, Hagiwara A, Yamaguchi T, Sawai K, Takahashi T. Overexpression of bax sensitizes human breast cancer MCF-7 cells to radiation-induced apoptosis. *Inter J Cancer* **1996**; 67:101–105.
106. Lim LY, Vidnovic N, Ellisen LW, Leong CO. Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells. *Brit J Cancer* **2009**; 101: 1606–1612.
107. Guarneri V, Barbieri E, Piacentini F, Giovannelli S, Ficarra G, Frassoldati A, Maiorana A, D'Amico R, Conte P. Predictive and prognostic role of p53

- according to tumor phenotype in breast cancer patients treated with preoperative chemotherapy: a single-institution analysis. *Int J Biol Markers* **2010**; 2:104-11.
108. Sarode VR, Han JS, Morris DH, Peng Y, Rao R. A comparative analysis of biomarker expression and molecular subtypes of pure ductal carcinoma in situ and invasive breast carcinoma by image analysis: relationship of the subtypes with histologic grade, Ki67, p53 overexpression, and DNA ploidy. *Intern J Breast Can* **2011**; 2011:1-7.
  109. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Süto T, Gnant M, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci S, Gelber RD. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **2005**; 353:1659-72.
  110. Ioffe OB, Silverberg SG. Infiltrating carcinoma: infiltrating duct carcinoma not otherwise specified and prognostic factors other than histological type. In: *Atlas of the Breast Pathology*, Silverberg SG (ed), W.B. Saunders Company, Elsevier Science, Philadelphia, Pennsylvania, USA, **2002**; pp117–137.
  111. Manna EDF, Teixeira LC, Alvarenga M. Association between immunohistochemical expression of topoisomerase II $\alpha$ , HER2 and hormone receptors and response to primary chemotherapy in breast cancer. *Tumori* **2006**; 92:222-229.
  112. Munawer NH, Aishah S, Zain R, Mohd M, Muhammad R, Masir N, Florence CS, Mohamed K3, Asmiati R, Noor S, Das S. Determination of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) amplification using fluorescence *in situ* hybridization (FISH), chromogenic *in situ* hybridization (CISH) and automated silver *in situ* hybridization (SISH). *AJB* **2011**; 10:16429-16436.
  113. Dowsett M. Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endo-Relat Cancer* **2001**; 8:191–5.
  114. Bouchalova K, Trojanec R, Kolar Z, Cwiertka K, Cernakova I, Mihail V, Hajduch M. Analysis of ERBB2 and TOP2A gene status using fluorescence *in situ* hybridization versus immunohistochemistry in localized breast cancer. *Neoplasma* **2006**; 53:393-401.

115. Su Y, Zheng Y, Zheng W, Zhi Chen KG, Li G, Cai Q, Lu W, Ou Shu X. Distinct distribution and prognostic significance of molecular subtypes of breast cancer in Chinese women: a population-based cohort study. *BMC Cancer* **2011**; 11:292-303.
116. Arun B, Hortobagyi GN. Progress in breast cancer chemoprevention. *Endocrine-Related Cancer* **2002**; 9:15–32
117. Dawson S-J, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, Baglietto L, Severi G, Giles GG, McLean CA, Callagy G, Green AR, Ellis I, Gelmon K, Turashvili G, S Leung, Aparicio S, Huntsman D, Caldas C, Pharoah P. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Brit J Can* **2010**; 103:668–675.
118. Daidone MG, Luisi A, Veneroni S, Benini E, Silvestrini R. Clinical studies of Bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer* **1999**; 6:61-68.
119. Fabian CJ, Kimler BF, Simonsen S, Metheny T, Zalles CM, Hall M. Reduction in breast epithelial cell proliferation after six months of letrozole in high risk women on hormone replacement therapy with random periareolar fine needle aspiration evidence of atypia. 27<sup>th</sup> Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; **2004**.
120. Nabholz JM, Smylie M, Mackey J, Paterson A, Noel D, al-Tweigeri, Janowska A, Delorme F, Riva A. Docetaxel/doxorubicin/cyclophosphamide in the treatment of metastatic breast cancer. *Oncology (Williston Park)* **1997**;11:25-27.
121. Regan MM, Neven P, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Ejlertsen B, Mauriac L, Forbes JF, Smith I, Láng I, Wardley A, Rabaglio M, Price KN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B. Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomized clinical trial at 8.1 years median follow-up. *Lancet Oncol* **2011**; 12:1101–1108.
122. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkinse S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LWMM, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *PNAS*, **2004**; 101:9393-9398.

123. Mottotese M, Buglioni S, Bracalenti C, Cardarelli MA, Ciabocco L, Giannarelli D, Botti C, Natali PG, Concetti A & Venanzi FM. 2000 Prognostic relevance of altered Fas (CD95)-system in human breast cancer. *Intern J Can* **2000**; 89:123–132.
124. Muèschen M, Moers C, Warskulat U, Even J, Niederacher D, Beckmann MW. CD95 ligand expression as a mechanism of immune escape in breast cancer. *Immunology* **2000**; 99:69-77.
125. Alireza A, Raheleh S, Abbass R, Mojgan M, Mohamadreza M, Gholamreza M, Shadi B. An immunohistochemistry study of tissue bcl-2 expression and its serum levels in breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* **2008**; 1138:114-20.
126. Liu Z, S Chen. ER regulates an evolutionarily conserved apoptosis pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**; 400:34-38.
127. Rana A, Rangasamy V, R, Mishra. How estrogen fuels breast cancer. *Future Oncol* **2010**; 6:1369-71.
128. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, SyrjHnen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* **1994**; 30A:2068-73.
129. Baldassarre G, Battista S, Belletti B, Thakur S, Pentimalli F, Trapasso F, Fedele M, Pierantoni G, Croce CM, Fusco A. Negative regulation of *BRCA1* gene expression by HMGA1 proteins accounts for reduced BRCA1 protein levels in sporadic breast carcinoma. *Mol Cell Biol* **2003**; 23:2225–2238.
130. Pérez-Vallés A, Martorell-Cebollada M, Nogueira-Vázquez E, García-García JA, Fuster-Diana E. The usefulness of antibodies to the BRCA1 protein in detecting the mutated BRCA1 gene. An immunohistochemical study. *J Clin Pathol* **2001**; 54:476–480.
131. De Leeneer K, Coene I, Crombez B, Simkens J, Van de Broecke R, Bols A, Stragier B, De Paepe A, Poppe B, Claes K. Prevalence of BRCA1/2 mutations in sporadic breast/ovarian cancer patients and identification of a novel de novo BRCA1 mutation in a patient diagnosed with late onset breast and ovarian cancer: implications for genetic testing. *Breast Cancer Res Treat.* **2012**; 132:87–95.
132. Meng H, Chen R, Li W, Xu L, Xu L. Correlations of TOP2A gene aberrations and expression of topoisomerase II $\alpha$  protein and TOP2A mRNA expression in primary



- breast cancer: A retrospective study of 86 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Pathol Inter* **2012**; 62:391–399.
133. Bhargava R, Lal P, Chen B. HER-2/neu and Topoisomerase II $\alpha$  gene amplification and protein expression in invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol* **2005**;123:889-895.
  134. Olsen KE, Knudsen H, Rasmussen BB, Balslev E, Knoop A, Ejlersten B, Nielsen KV, Schönau A, Overgaard J. Amplification of HER-2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. *Acta Oncol* **2004**; 43:35-42.
  135. Hagen AI, Bofin AM, Ytterhus B, Mæhle LO, Kjellevoid KH, Myhre HO, Møller P, Lønning PE. Amplification of TOP2A and HER-2 genes in breast cancers occurring in patients harbouring BRCA1 germline mutations. *Acta Oncol* **2007**; 46: 199-203.
  136. Orlando L, Curto BD, Gandini S, Ghisini R, Pietri E, Torrisi R, Balduzzi A, Cardillo A, Dellapasqu S, Veronesi P, Viale G, Goldhirsch A, Colleoni M. Topoisomerase II $\alpha$  gene status and prediction of pathological complete remission after anthracycline - based neoadjuvant chemotherapy in endocrine non-responsive Her2/neu-positive breast cancer. *The Breast*, **2008**; 17:506-11.
  137. Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* **2005**; 353: 1652-4.
  138. Romond EH, Perez EA, Bryant J. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **2005**; 353:1673-84.
  139. Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, Salgado R, Verjat T, Lespagnard L, Ma Y, Veys I, Di Leo A, Sotiriou C, Piccart M, Larsimont D. Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther* **2006**; 5:2572-2579.
  140. Press MF, Sauter G, Buyse M, Bernstein L, Guzman R, Santiago A, Villalobos IE, Eiermann W, Pienkowski T, Martin M. Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *J Clin Oncol* **2011**; 29:859-867.
  141. Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, Rasmussen BB, Overgaard J, Nielsen KV, Schonau A, Gunnarsdottir K, Olsen KE, Mouridsen H, Ejlersten B. Retrospective

analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* **2005**; 23:7483-7490.

## I BIOGRAFSKI PODACI

Olivera Mitrović je rođena 31. 7. 1979. u Loznici. Osnovnu školu Nikola Tesla završila je u Pilici, Republika Srpska. Gimnaziju „Vuk Karadžić“ u Loznici završila je sa odličnim uspehom. Na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu (grupa *Opšta biologija*, smer *Histologija i embriologija*) diplomirala je 23. 02. 2004. s prosečnom ocenom 8,91. Diplomski rad «Ekspresija estrogenskog i progesteronskog receptora u infiltrativnom duktalnom karcinomu dojke imunohistohemijskom metodom» odbranila je sa ocenom 10. Poslediplomske studije na istom fakultetu–smer *Histologija i embriologija* upisala je šk. 2004/2005. i položila sve ispite s prosečnom ocenom 10. Magistarsku tezu pod nazivom «Ekspresija grelina i grelinskih receptora GHS-R1a i GHS-R1b u epitelu sluznice želuca tokom prenatalnog razvika čoveka» odbranila je 16. 10. 2008. na Biološkom fakultetu u Beogradu.

Od 27. 7. 2004. godine zaposlena kao istraživač u Institutu za medicinska istraživanja u Beogradu, u Naučnoistraživačkoj grupi za neuroendokrinologiju, Laboratoriji za imunohistohemiju i elektronsku mikroskopiju.

Olivera Mitrović je publikovala 57 radova, među kojima 6 radova kategorije M21, tri rada kategorije M22 i osam radova kategorije M23 objavljenih u celini u međunarodnim časopisima.

Olivera Mitrović je u toku 2005. godine pohađala seminar "Publikovanje u biomedicini" u organizaciji Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije i Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu, koji je održan na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu 1.–2. aprila 2005. godine. Na Medicinskom fakultetu u Nišu od 4. do 5. 11. 2005. godine učestvovala je na naučnom seminaru kontinuirane medicinske edukacije pod nazivom „Multimedijalne tehnologije i savremena metodologija u edukaciji iz oblasti morfoloških nauka“. Od 10. do 13. maja 2006. godine na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Nišu, učestvovala je kao predavač na seminaru kontinuirane medicinske edukacije pod nazivom „Od tkivnog uzorka do mikroskopske fotografije-histološke, histohemijske, imunohistohemijske i elektronmikroskopske metode“. U toku 2006. godine (od 17. do 24. septembra 2006.) pohađala je kurs "Confocal microscopy in neuroscience (Theoretical and applied course)" u organizaciji katedre za fiziologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

## II NAUČNO-ISTRAŽIVAČKI RAD

U toku dosadašnjeg naučnoistraživačkog rada, mr Olivera Mitrović je bila angažovana na sledećim projektima koje je finansiralo ili finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (2004-2010. godina):

1. "Regulatorni peptidi, citokini i faktori rasta neuroendokrino-imunološke osovine u ontogenezi, onkogenezi i inflamaciji digestivnog trakta" (MNZŽS; 1752, 2001-2005);
2. "Lokalna neuroendokrino-imunološka osovina kod inflamacije gastrointestinalnog trakta (GIT) – molekularnopatološka, biohemijska i imunohistohemijska istraživanja" (MNZŽS; 145064, period 2006-2010).
3. „Ispitivanje patogeneze hematoloških maligniteta“ (MNTR; 175053, period 2011-2015)

## III OBJAVLJENI RADOVI

U toku dosadašnjeg rada mr Olivera Mitrović je objavila **56** naučnih publikacija (bez magistarske teze) koje obuhvataju: **17** radova u vodećim međunarodnim časopisima, od kojih **devet** u vodećem (M21 i M22), **tri** rada saopštena na skupu nacionalnog značaja štampana u celini (M63), **20** radova saopštenih na međunarodnim i **16** saopštenih na skupovima nacionalnog značaja.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани **Оливера С. Митровић**

број уписа

### Изјављујем

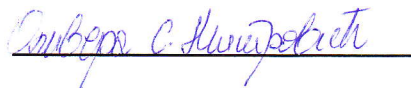
да је докторска дисертација под насловом

**Корелација између протеинске и генске експресије HER-2 и топоизомеразе  
2а код инфилтративног дукталног карцинома дојке**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, септембар, 2013. године

  
\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Оливера С. Митровић**

Број уписа

Студијски програм **Биологија ћелија и ткива**

Наслов рада **Корелација између протеинске и генске експресије HER-2 и топоизомеразе 2а код инфилтративног дукталног карцинома дојке**

Ментори Проф. др Весна Коко и Др Владан Чокић

Потписани **Оливера С. Митровић**

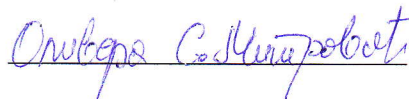
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, септембар, 2013. године



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: **Корелација између протеинске и генске експресије HER-2 и топоизомеразе 2а код инфилтративног дукталног карцинома дојке**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, септембар, 2013. године

