INTERAKCIJA PROTEINA SONIC HEDGEHOG S RECEPTORIMA ESTROGENA I ANDROGENA U KARCINOMIMA DOJKE

Budimir, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:789421

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivan Budimir

INTERAKCIJA PROTEINA SONIC HEDGEHOG S RECEPTORIMA ESTROGENA I ANDROGENA U KARCINOMIMA DOJKE

Doktorska disertacija

Osijek, 2022. godina

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivan Budimir

INTERAKCIJA PROTEINA SONIC HEDGEHOG S RECEPTORIMA ESTROGENA I ANDROGENA U KARCINOMIMA DOJKE

Doktorska disertacija

Osijek, 2022. godina

Mentor rada: doc. prim. dr. sc. Zlatko Vlajčić, specijalist opće kirurgije, subspecijalist plastične, rekonstrukcijske i estetske kirurgije, subspecijalist onkološke kirurgije.

Rad ima 127 stranica.

Predgovor

Doktorski rad „Interakcija proteina Sonic hedgehog s receptorima estrogena i androgena u karcinomima dojke“ izrađen je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Istraživanje mehanizama rezistencije na terapiju u svrhu otkrivanja novih biomarkera i kombinacije terapija za hormonski ovisne karcinome dojke“ (izvor financiranja Terry Fox Research Institute, voditelj projekta doc.dr.sc. Petar Ozretić). Nastao je u suradnji Laboratorija za nasljedni rak Instituta Ruđer Bošković, Klinike za plastičnu kirurgiju i Kliničkog zavoda za patologiju Kliničke bolnice Dubrava.

Zahvaljujem se mentoru doc.dr.sc. Zlatku Vlajčiću i komentoru doc.dr.sc. Krešimiru Martiću, kolegi izv.prof.dr.sc. Domagoju Eljugi te djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju KB Dubrava s dr. Tomasović-Lončarić. Doc.dr.sc. Petru Ozretiću, voditelju Laboratorija za nasljedni rak Instituta Ruđer Bošković, na savjetima i realizaciji te ostalim djelatnicima.

Sadržaj

POPIS KRATICA V
1. UVOD 1
1.1. Karcinom dojke općenito 1
1.2. Molekularni podtipovi karcinoma dojke 2
1.3.Receptor androgena 4
1.4. Uloga receptora androgena u karcinomu dojke 5
1.4.1. Uloga receptora androgena u estrogen receptor-pozitivnim karcinomima dojke 5
1.4.2. Uloga receptora androgena u HER2-pozitivnim karcinomima dojke 5
1.4.3. Uloga receptora androgena u trostruko negativnim karcinomima dojke 6
1.5.Hedgehog signalni put 6
1.5.1. Mehanizmi aktivacije signalnog puta 8
1.6. Uloga HH-GLI signalnog puta u razvoju embrija 8
1.7. Uloga HH-GLI signalnog puta u razvoju dojke 9
1.8. Uloga HH-GLI signalnog puta u odraslom organizmu 10
1.9. Uloga HH-GLI signalnog puta u razvoju karcinoma 10
1.10. Uloga HH-GLI signalnog puta u karcinomu dojke 11
1.10.1. Uloga u estrogen receptor-pozitivnim karcinomima 11
1.10.2. Uloga u HER2-pozitivnim karcinomima 12
1.10.3. Uloga u trostruko negativnim karcinomima 12
1.11. Hedgehog proteini 12
1.11.1. Sonic hedgehog protein 13
1.11.2. Interakcija sonic hedgehog proteina s receptorom androgena u karcinomu prostate 14
2.HIPOTEZA 15
3.CILJ ISTRAŽIVANJA 16
4. MATERIJALI I METODE 17
4.1. Ustroj studije 17
4.2. Ispitanici 17
4.3.Metode 18
4.3.1. Određivanje ekspresije receptora androgena 18
4.3.2. Određivanje ekspresije sonic hedgehog proteina 19
4.3.3. Dokazivanje fizičke interakcije proteina sonic hedgehog s receptorom androgena i estrogena pomoću PLA metode 20

4.4. Statističke metode 22
5. REZULTATI 24
5.1. Kliničko-patološke karakteristike bolesnica s karcinomom dojke 24
5.2. Ekspresija proteina SHH i AR u uzorcima tkiva karcinoma dojke 26
5.2.1. Ekspresija proteina SHH u uzorcima tkiva karcinoma dojke 26
5.2.2. Ekspresija AR u uzorcima tkiva dojke 31
5.3. Povezanost ekspresije SHH i AR s kliničko-patološkim značajkama karcinoma dojke 35
5.3.1. Razlike u vrijednosti SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja svih bolesnica 35
5.4. Korelacija između ekspresije receptora androgena i proteina sonic hedgehog 71
5.5. Utjecaj kliničkih parametara i ekspresije SHH i AR na ishod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima karcinoma dojke 72
5.5.2. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke 76
5.6. Interakcija proteina Shh s receptorom androgena i receptorom estrogena 91
6. RASPRAVA 96
7. ZAKLJUČCI 106
8. SAŽETAK 107
9. SUMMARY 109
10. LITERATURA 111
11. ŽIVOTOPIS 126

POPIS KRATICA

AR – receptor androgena

DHH – desert hedgehog

ER – receptor estrogena

HER – receptor ljudskog epidermalnog faktora rasta

IHH – indian hedgehog

IRS – imunoreaktivni skôr

LumA – luminal A karcinom dojke

LumB – luminal B karcinom dojke

LumB/HER2- - luminal B receptor HER2 negativan karcinom dojke

LumB/HER2+ - luminal B receptor HER2 pozitivan karcinom dojke

PLA – proximity ligation assay

PR – receptor progesterona

SHH – sonic hedgehog

TNBC – trostruko negativan karcinom dojke

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimeraze

1. UVOD

1.1. Karcinom dojke općenito

Karcinom dojke je drugi najčešći dijagnosticirani karcinom globalno gledano, uključujući države sa srednjim i niskim dohotkom (1-3). Incidencija je najviša u Sjevernoj Americi, Australiji i Novom Zelandu te u zapadnoj i sjevernoj Europi, dok je najniža u Aziji i subsaharskoj Africi. U Europskoj Uniji karcinom dojke je najčešće dijagnosticirana maligna bolest te je 2020.godine otkriveno više od 355 000 slučajeva (4). Prema zadnjim objavljenim podatcima Registra za rak, u Hrvatskoj je u 2020. godini zabilježeno 2894 novih slučajeva raka dojke (stopa incidencije 120,3/100 000), a od ove zloćudne bolesti u 2020. godini umrlo je 832 žene (stopa mortaliteta 32,8/100 000) (4).

Iako je identificiran niz genetskih i okolišnih faktora koji utječu na rizik za nastanak karcinoma dojke, etiologija još uvijek nije u potpunosti razjašnjena i još uvijek nema učinkovitih metoda za primarnu prevenciju. Značajnim faktorima rizika smatraju se reproduktivni i menstrualni faktori, obiteljska anamneza, osobna anamneza benigne bolesti dojke, prekomjerna tjelesna težina, nedovoljna tjelesna aktivnost, konzumacija alkohola i hormonska nadomjesna terapija.

Karcinom dojke izrazito je heterogena skupina tumora. Razlikuju se 24 histološka tipa i podtipa karcinoma dojke, a svaki od njih ima određene histološke, histokemijske, imunohistokemijske i molekularne karakteristike te određenu prognozu.

Po utvrđivanju dijagnoze karcinoma dojke, osim određivanja histološkog podtipa (duktalni, lobularni, medularni, papilarni, apokrini), također se određuje i imunofenotip. To podrazumijeva određivanje prisutnosti/odsutnosti određenih molekula/receptora na površini tumorskih stanica (5).

Prvenstveno se određuje izraženost hormonskih (estrogenskih ER i progesteronskih PR) receptora u tumorskim stanicama, ali i prisutnost pojačane izraženosti HER2 receptora, receptora za epidermalni faktor rasta.

Estrogenski i/ili progesteronski receptor-pozitivnim tumorom smatra se onaj u kojem je više od 1 % tumorskih stanica pozitivno na ER i/ili PR, što se određuje imunohistokemijskim bojanjem tkivnih preparata.

HER2-pozitivnim karcinomom smatra se onaj u kojem je prisutna prekomjerna ekspresija proteina HER2. Verifikacija prekomjerne ekspresije radi se imunohistokemijski te se potvrđuje uniformnim bojenjem visokog intenziteta u više od 30 % stanica invazivne tumorske komponente (IHC 3+). U slučaju nejasnog rezultata imunohistokemije, status se određuje traženjem amplifikacije gena za HER2 (ERRB2) metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH).

Pri planiranju kirurškog i postoperativnog liječenja te praćenju zloćudnog potencijala karcinoma dojke koriste se brojni prognostički čimbenici. Neki su vezani uz pacijenticu, poput dobi, komorbiditeta, općeg stanja te hormonskog statusa, dok su ostali vezani uz tumor. Prediktivni čimbenici vezani uz tumor su njegova veličina, status limfnih čvorova aksile, prisutnost udaljenih metastaza (TNM stadij) (6), multilokularnost, histološki tip tumora, status hormonskih receptora (ER i PR), HER2 status (IHC, SISH, FISH), limfovaskularna invazija.

Kroz dugi niz godina praćenja pacijentica i tijekom brojnih istraživanja došlo je do spoznaje kako su biološke značajke tumora, poput statusa hormonskih receptora, mnogo važnije od numeričkih kao što su veličina i broj zahvaćenih limfnih čvorova (7, 8).

1.2. Molekularni podtipovi karcinoma dojke

Posljednjih nekoliko godina ostvaren je značajan napredak u genskoj analizi karcinoma dojke što je dovelo do spoznaje kako isti mogu biti podijeljeni u biološki i klinički smislene skupine. Prilikom genske analize tumorskih stanica (Slika 3.) pokazalo se da postoje značajne razlike u izraženosti određenih gena kod različitih karcinoma dojke, stoga se karcinomi dojke mogu prema tim razlikama podijeliti u četiri skupine (7-10). S obzirom na prethodno spomenutu mogućnost podjele te činjenicu kako genska analiza (OncoTypeDx, MammaPrint) iziskuje značajna financijska sredstva, za većinu zemalja prihvaćeno je da se imunohistokemijski imunofenotip karcinoma dojke određuje prema četiri osnovna biljega koji odgovaraju molekularnoj klasifikaciji.

Tako se molekularni podtipovi karcinoma dojke određuju temeljem izraženosti hormonskih receptora (ER, PR), membranskog proteina HER2 te Ki67 (proliferacijskog indeksa), a prema kojima se određuje daljnja terapija i prognoza.

MOLEKULARNI PODTIPOVI

LUMINALNI TIP A najčešći je tip tumora, a ujedno i najmanje agresivan. Kod ovih tumora izraženi su receptori estrogena i progesterona (ER i PR), dok je indeks proliferacije nizak i prisutan u manje od 20 % tumorskih stanica. Uglavnom se javlja kod pacijentica starije životne dobi. Tu obično spadaju tumori nižeg gradusa te su dobro diferencirani, što je vezano uz bolji ishod liječenja i prognozu. Dobra izraženost hormonskih receptora čini ove tumore osjetljivima na hormonsku terapiju.

LUMINALNI TIP B tumori izražavaju hormonske receptore, pri čemu je ER pozitivan, a PR najčešće pozitivan u manje od 20 % stanica ili čak negativan. Međutim, za razliku od luminalnih tip A tumora, ovi tumori imaju viši indeks proliferacije, Ki67, koji je izražen u 20 % i više tumorskih stanica. Ovu grupu možemo podijeliti na dvije podgrupe, a to su HER2 pozitivni i HER2 negativni. U ovom radu spomenute podgrupe vođene su odvojeno jer se značajno razlikuju u molekularnim mehanizmima, a radi jednostavnosti, u daljnjem tekstu one će se navoditi kao luminalni tip B/HER2- za HER2 negativne te luminalni tipB/HER2+ za HER2 pozitivne luminalne tip B tumore.

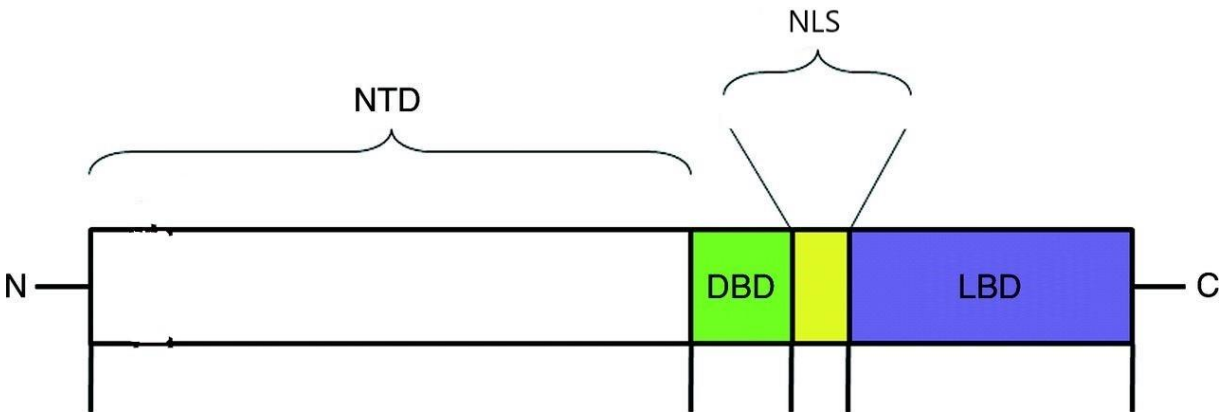
Ovi tumori, unatoč sličnosti luminalnom tipu A tumoru, imaju lošiju prognozu. Kod ovih tumora primjenjiva je endokrina terapija, ali se kombinira s citotoksičnom terapijom zbog visokog proliferacijskog indeksa ili s anti-HER2 terapijom kod HER2 pozitivnih tumora. Luminalni podtipovi čine oko 80 % ukupnog broja karcinoma dojke.

HER2 POZITIVAN tumor ne izražava hormonske receptore (ni ER ni PR), ali izražava HER2, receptor za epidermalni faktor rasta 2. Stoga je ovaj tip tumora izrazito agresivan te često visokog gradusa i slabije je diferenciran. Učestalija pojava ovog tumora je kod mlađih žena (ispod 40 godina života), no anti-HER2 ciljana terapija znatno poboljšava ishod bolesti. HER2 pozitivni tumori čine oko 20 % karcinoma dojke.

TROSTRUKO NEGATIVAN (TNBC) ili engl. „Basal like“ ne izražava niti ER, ni PR, a niti HER2. Ovaj tip tumora karakterizira izrazita agresivnost i slaba diferenciranost, a zbog nedostatka ciljnih molekula nema ni ciljane terapije za njega. Veći je rizik razvoja u mlađoj životnoj dobi, kao i kod HER2 pozitivnih tumora (ispod 40 godina života). Kod ovog tumora prisutan je nasljedni faktor, s obzirom na to da se većina BRCA1 mutacija i poremećaja ekspresije nalazi u ovom tipu tumora. TNBC čine oko 20 % svih karcinoma dojke.

1.3.Receptor androgena

Receptor androgena je član obitelji nuklearnih receptora steroidnih hormona koju čini s receptorom estrogena, receptorom glukokortikoida, receptorom progesterona i receptorom mineralokortikoida. Djeluje kao transkripcijski faktor ovisan o ligandu, a sastoji se od tri glavne funkcionalne domene: aminoterminalna nestrukturirana transaktivacijska domena, centralna domena koja se veže na DNA i karboksiterminalna domena na koju se veže ligand (Slika 1.). Između domena koje vežu DNA i ligand nalazi se fleksibilna regija u kojoj se nalazi signal za lokalizaciju u jezgri. U neaktivnom stanju, receptor androgena vezan je za „heat-shock"-protein i nalazi se u citoplazmi. Nakon vezanja androgena, receptor mijenja konformaciju, translocira se u jezgru i potiče transkripciju ciljnih gena (11).



Slika 1. Struktura receptora androgena. NTD - N terminalna domena, DBD - DNA vezujuća domena, LBD - ligand vezujuća domena, NLS- signal za lokalizaciju u jezgri. Slika je preuzeta i prilagođena s *https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/215/2/221.xml*

1.4. Uloga receptora androgena u karcinomu dojke

Receptor androgena je član „superobitelji“ steroidnih receptora te je izražen u mnogim ljudskim tkivima, od kojih tkivo dojke ima treću najveću ekspresiju (12, 13). Primijećeno je da 70 - 90 % karcinoma dojke eksprimira receptor androgena (AR) te kako bi isti mogao biti prediktivni i prognostički čimbenik, a ujedno i ciljna meta u liječenju. Unatoč brojnim istraživanjima, mehanizmi djelovanja AR u karcinomu dojke te naročito među različitim podtipovima karcinoma dojke su varijabilni i bez trenutnog konsenzusa. Njegova prognostička i prediktivna vrijednost samim time ostaje nedefinirana (14, 15).

Androgenima se smatraju steroidni hormoni koji reguliraju aktivnost receptora androgena njegovim vezanjem (16). Sposobnost vezanja AR imaju testosteron (T) i dihidrotestosteron (DHT) (16, 17). Testosteron se u tkivu dojke pomoću 5α-reduktaze konvertira u DHT ili aromatazom u 17β-estradiol (E2) (18). Određena istraživanja su utvrdila kako je koncentracija DHT tri puta veća, a 5α-reduktaze četiri do osam puta veće u karcinomskom tkivu dojke nego u netumorskom tkivu (16, 18).

1.4.1. Uloga receptora androgena u estrogen receptor-pozitivnim karcinomima dojke

Ustanovljeno je kako je ekspresija AR prisutna u 70 – 95 % slučajeva te kako pozitivno korelira s povoljnim karakteristikama tumora (19). Snažnija ekspresija prisutna je u manjim tumorima, nižeg histološkog gradusa, slabije proliferativnosti i boljim odgovorom na terapiju (20).

Bozovic-Spasojevic i suradnici su meta-analizom prikazali kako izraženost AR značajno poboljšava preživljenje slobodno od bolesti (DFS) i ukupno preživljenje (OS) u ER+ karcinoma dojke(21).

1.4.2. Uloga receptora androgena u HER2-pozitivnim karcinomima dojke

Ekspresija AR ustanovljena je u 30 – 60 % HER2-pozitivnih karcinoma (22, 23). Prema prirodi, HER2-pozitivni karcinomi imaju lošiju prognozu, no u slučaju ekspresije receptora HER2, ER i AR ustanovljeno je kako su tumori manje agresivni s povoljnijim ishodom liječenja (24).

Također, meta-analiza autora Bozovic-Spasojevic i sur. pokazala je kako je ekspresija AR u HER2 molekularnom podtipu povezana s lošijim ishodom (21).

1.4.3. Uloga receptora androgena u trostruko negativnim karcinomima dojke

U ovom podtipu je ekspresija AR najraznolikijeg značenja, a prisutna je u 10 – 53 % slučajeva (20, 23, 25). Određene studije pokazale su različito značenje među različitim etničkim skupinama (povoljnija prognoza u stanovnika Nigerije i SAD-a, a lošija među stanovnicima Indije, Norveške i Irske.) (19, 26). Također, dokazano je kako liječenje tamoksifenom poboljšava ishod u TNBC s izraženim AR, dok neke studije tvrde kako je u AR+ lošiji odgovor na neoadjuvantnu kemoterapiju te je veća vjerojatnost lokalnog recidiva nakon zračenja (27). Dio ove raznolikosti značenja svakako se može pripisati nestandardiziranosti određivanja ekspresije AR, različitim „cut-off“ vrijednostima i metodama imunohistokemije, a za dio su svakako potrebna daljnja istraživanja.

1.5.Hedgehog signalni put

Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI) je visoko konzervirani put prijenosa signala od stanične membrane do jezgre. Do njegovog otkrića došlo je tijekom genetičkih analiza segmentalnog razvoja vinske mušice (Drosophila melanogaster) tijekom 80-ih godina prošlog stoljeća (28, 29). U embrionalnom razvoju ključan je za diferencijaciju mnogih tkiva i organa. Kod odraslih je važan za održavanje matičnih stanica i tkivne homeostaze (30, 31), no sve se više prepoznaje kako njegova aberantna aktivnost ima ulogu u razvoju tumora (32).

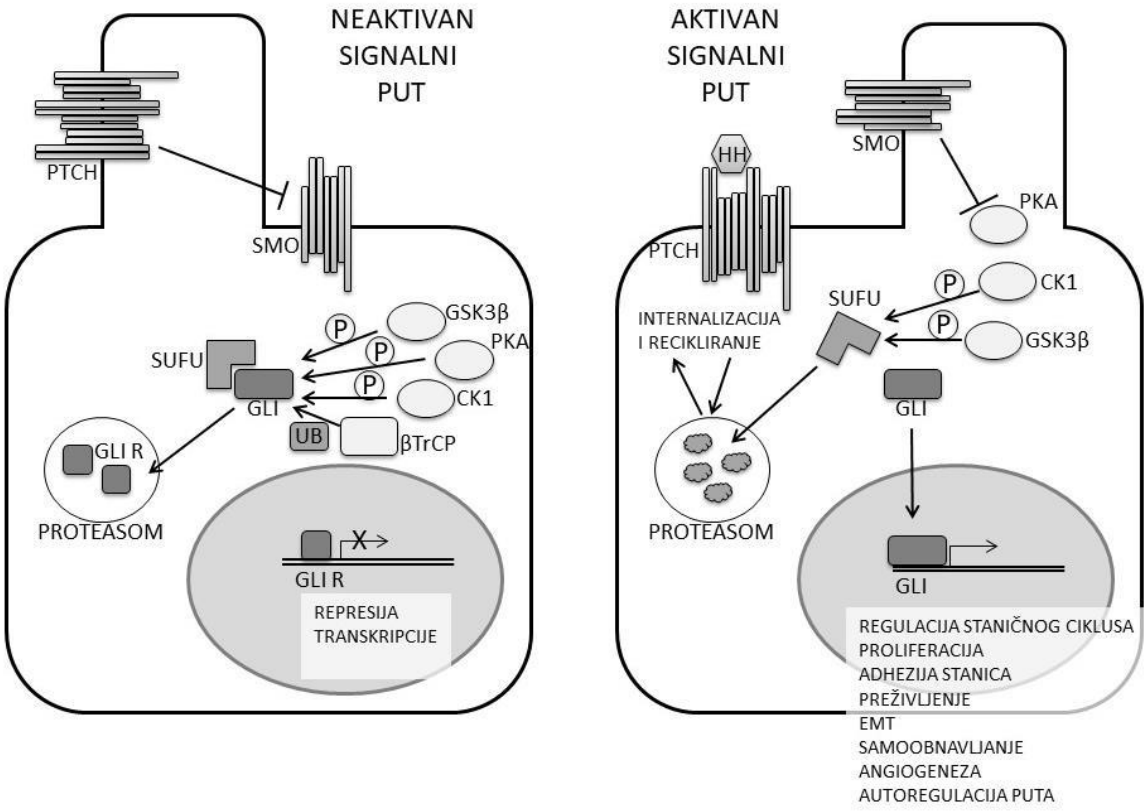
Ono što je kod kralješnjaka neophodno za aktivnost ovog signalnog puta je primarna cilija. Dugačak, nepokretan organel koji se nalazi na apikalnoj površini gotovo svih stanica, potreban za pravilan prijenos signala (33). U primarnoj ciliji nalaze se signalne molekule kao što su transmembranski receptori koji omogućavaju odgovore na izvanstanične podražaje (34).

Komponente koje čine ovaj signalni put u sisavaca su tri liganda Hedgehog (HH): Desert, Indian i Sonic Hedgehog (DHH, IHH i SHH), dva transmembranska receptora Patched 1 (PTCH1) i Patched 2 (PTCH2), transmembranski protein sličan receptorima povezanim s Gproteinima

Smoothened (SMO) te tri faktora transkripcije - GLI1, GLI2 i GLI3, koji su regulirani proteinom Suppressor of Fused (SUFU) (Slika 2.).

U sisavaca signalni put funkcionira tako da se u HH sekrecijskoj stanici posttranslacijski modificira HH prekurzor dodavanjem kolesterola i palmitata iz palmitinske kiseline. Protein Disp (eng. Dispatched) omogućava otpuštanje proteina HH iz stanica u kojima nastaje. Vezanjem HH liganda na svoj receptor Ptch prestaje represija Smo, što dovodi do otpuštanja GLI sa SuFu. Po otpuštanju GLI proteina isti se translocira u jezgru, nakon čega slijedi transkripcija ciljnih gena.

GLI1 protein djeluje isključivo kao promotor transkripcije, dok GLI2 i GLI3 mogu biti transkripcijski promotori ili represori (35). U odsutnosti stimulacije ligandoma HH, protein Smo je suprimiran od strane proteina Ptch, što sprječava daljnji prijenosa signala te ne dolazi do transkripcije ciljnih gena. GLI protein tada ostaje u citoplazmi vezan za SuFu (Slika 2.).



Slika 2. Signalni put Hedgehog-GLI. Slika je preuzeta i prilagođena iz Levanat i sur. 2017.

1.5.1. Mehanizmi aktivacije signalnog puta

Prethodno opisani put aktivacije smatra se kanonskom signalizacijom. Ovdje dolazi do vezanja HH proteina na transmembranski receptor PTCH, aktivacije SMO i otpuštanja GLI proteina sa SuFu i njihove translokacije u jezgru te transkripcije ciljnih gena.

Nekanonskom signalizacijom smatramo sve tkivne i stanične odgovore na proteine HH, a koji nisu posredovani aktivnošću GLI transkripcijskim faktorima. Razlikujemo dva glavna načina nekanonske signalizacije. U prvom mehanizmu PTCH1 protein djeluje neovisno o nizvodnim komponentama, dok u drugom mehanizmu protein SMO djeluje neovisno o transkripcijskim faktorima GLI (36).

Jedan od potencijalnih nekanonskih mehanizama aktivacije ovog signalnog puta opisali su autori Sabol i sur., u njihovom istraživanju ligand SHH aktivirao je receptor estrogena u staničnom modelu karcinoma dojke, što predstavlja potencijalni mehanizam aktivacije receptora estrogena u uvjetima bez estrogena (37).

1.6. Uloga HH-GLI signalnog puta u razvoju embrija

Tijekom embrionalnog razvoja beskralješnjaka i kralješnjaka odnosno kod embrionalnog razvoja sisavaca signalni put HH-GLI je od krucijalne važnosti. Za vrijeme različitih faza razvoja, Hedgehog proteini mogu djelovati kao mitogeni, morfogeni i diferencijacijski čimbenici na različitim mjestima (38). Prilikom embriogeneze kralješnjaka HH-GLI signalni put aktiviran je u razvoju gotovo svih organa (udovi, kost i hrskavica, mišići, lateralna simetrija, srce, neuroni, mali mozak, oko, gušterača, crijeva, pluća, spolni organi) (39, 40).

Za vrijeme embrionalnog razvoja ligand signalnog puta SHH eksprimiran je u notokordu, sudjeluje u oblikovanju neuralne cijevi, probavnog sustava, pluća, folikula dlake, pupoljaka ekstremiteta te simetriji lijeve i desne strane tijela (41). IHH je uključen u formiranje crijeva i morfogenezu kosti (41). DHH je ključan za pravilan razvoj testisa te je najviše eksprimiran u Sertolijevim stanicama sjemenika gdje ima i ključnu ulogu u diferencijaciji spolnih stanica (42, 43). Ovaj razvojni put također utječe na razvoj gušterače te diferencijaciju ganglijskih stanica i sazrijevanje retinoblasta (44, 45).

Stoga ne iznenađuje kako svaka deregulacija ovog signalnog puta može dovesti do ozbiljnih poremećaja tijekom razvoja i mnogih kongenitalnih malformacija i sindroma (46).

Mutacije u genu *SHH* tako dovode do holoprozencefalije i ciklopije (47-49). Jedan od primjera za to je ciklopija kod ovaca što je dovelo do otkrića prvog poznatog inhibitora Hh-Gli signalnog puta. 1957. godine u Idahu, USA, uočeno je da su ovce koje su se hranile planinskim ljiljanom *Veratrum californicum* češće janjile malformiranu janjad nego ovce koje se njime nisu hranile. Naknadnom biokemijskom analizom biljke deset godina kasnije utvrđeno je da je za malformacije zaslužan alkaloid izoliran iz biljke. Djeluje kao inhibitor spomenutog signalnog puta te sprječava diobu embrionalnog mozga na dvije hemisfere, što rezultira i razvojem jednog oka, ciklopije, stoga je alkaloid nazvan ciklopamin.

Gorlinov sindrom uzrokovan je mutacijom u genu PTCH1. Karakteriziran je nizom malformacija kao što su holoprosencefalija, ciklopija, malformacije šaka i stopala, malformacije kralješnice, rascijepljeno nepce i usne (50), a i podložnošću određenim tumorima kao što su meduloblastom i bazocelularni karcinom (BCC) (51).

Također, promjene u GLI proteinima dovode do sindaktilije (52), polidaktilije tipa A (53) i Pallister-Hall sindroma (54) te poremećajima u razvoju traheje, bubrega i makrocefalije (55, 56).

1.7. Uloga HH-GLI signalnog puta u razvoju dojke

Komponente HH-GLI signalnog puta su različito aktivne tijekom različitih faza razvoja mliječne žlijezde (57-63). Poznato je kako se mliječna žlijezda formira tijekom embrionalnog razvoja, raste tijekom adolescencije i diferencira tijekom laktacije (64). Istraživanje Hatsella i sur. pokazalo je kako je za primjeren razvoj pupoljaka mliječne žlijezde u miševa potrebna represija Gli1 od strane Gli3 jer je uočen nedostatak pupoljaka u miševa s forsiranom ekspresijom Gli1 i nedostatkom Gli3 (57). Tijekom puberteta su za duktalnu morfogenezu neophodne i kanonska i nekanonska signalizacija jer se vidjelo kako je morfogeneza neprimjerena kod miševa kod kojih je forsirano aktivirana samo jedna od signalnih kaskada (65-69). Po završetku puberteta sve komponente Hh-Gli signalnog puta slabo su eksprimirane (58, 63, 70). Iz svega navedenog može se zaključiti kako je tijekom embrionalnog razvoja dojke HH-GLI signalni put

uglavnom suprimiran, važan i aktivan tijekom morfogeneze duktusa u pubertetu te ponovno snižene aktivnosti u formiranoj žlijezdi odrasle osobe.

1.8. Uloga HH-GLI signalnog puta u odraslom organizmu

U odraslom organizmu signalni put HH-GLI je uglavnom inaktivan, ali uz zadržanu mogućnost aktivacije u matičnim i progenitorskim stanicama te se prema potrebi može aktivirati. Matične stanice su pluripotentne stanice koje se sporo dijele, no s obzirom na to da iz njih mogu nastati pojedini tipovi tkiva, važne su u obnavljanju brojnih tipova tkiva (71). Zbog opisanog svojstva ovaj signalni put je aktiviran u cijeljenju rana te je od iznimne važnosti u tom procesu (72). Njegova ključna funkcija stoga je u održavanju homeostaze organa u odraslom organizmu i njihove obnove nakon oštećenja. Brojna istraživanja dokazala su povezanost signalnog puta HH-GLI s nizom somatskih matičnih stanica, kao što su matične stanice dojke (73), živčane matične stanice (74), eritropoetske stanice (75) i matične stanice jetre u kojima je ključan za obnavljanje nakon akutne ozljede (76-78).

U ostalim tkivima, osim u pluripotentnim matičnim stanicama, ovaj signalni put prisutan je samo u primarnim cilijama. Prethodno spomenute primarne cilije su stanične organele na površini stanica čija je funkcija primanje signala iz okoline. Zbog toga su neophodne za funkciju ovog signalnog puta te je ustanovljeno kako se nalaze u raznim stromalnim stanicama (79).

1.9. Uloga HH-GLI signalnog puta u razvoju karcinoma

Posljednjih nekoliko godina popularan je novi koncept razvoja tumora prema kojemu se smatra da unutar svakog tumora postoji skup stanica koje se ponašaju kao matične stanice odnosno stanice koje se sporo dijele, no u slučaju potrebe mogu znatno ubrzati diobu i na taj način stvarati nove populacije tumorskih stanica (80).

Za tumorske matične stanice karakteristično je da su kontrolirane signalnim putevima uključenim u rast, preživljenje, migraciju te razvoj otpornosti na lijekove, a HH-GLI je jedan od tih signalnih puteva (81-89). Zbog toga se novi antitumorski lijekovi razvijaju s namjerom njihovog djelovanja u vidu ciljanog blokiranja ovakvih signalnih puteva (90).

Za neke tumore, kao što su adenokarcinom gušterače i multipli mijelom, već su opisane matične stanice te je potvrđeno da u njihovom održavanju ulogu igra signalni put HH-GLI (89, 91). Glioblastomi, po kojima su proteini GLI dobili ime, također nastaju kao izravna posljedica poremećaja u ovom signalnom putu (92). Bazocelularni karcinomi koji nisu vezani uz Gorlinov sindrom isto tako su posljedica poremećaja HH-GLI signalnog puta (93). Također, u zadnjih nekoliko godina poremećaji ovog signalnog puta uočeni su u brojnim drugim tipovima tumora. Do sada je to uočeno u sljedećim tumorima: melanom (94, 95), trihoepiteliom (96), rabdomiosarkom i rabdomiom (97), tumor probavnog trakta (98), tumor prostate (99), mikrocelularni karcinom pluća (100, 101), skvamozni karcinom pluća (102), karcinom gušterače (103), karcinom mokraćnog mjehura (104, 105), adenom hipofize (106, 107), karcinom dojke (108), karcinom jajnika (109-113) te kronična mijeloična leukemija (114).

1.10. Uloga HH-GLI signalnog puta u karcinomu dojke

Uloga HH signalnog puta u nastanku karcinoma dojke te njegova prediktivna i prognostička uloga, kao i potencijalna terapijska vrijednost, ovise o molekularnim i histološkim karakteristikama karcinoma (115). Visoke razine ekspresije SHH su verificirane u tkivu karcinoma dojke u odnosu na zdravo tkivo (116). Snažna ekspresija SHH i DHH pozitivno korelira s gradusom tumora, limfangionvazijom, zahvaćenošću limfnih čvorova, metastazama, recidivima i ekspresijom Ki67 (117-119). Isto tako, uočena je povezanost ekspresije HH proteina s lošom prognozom i smanjenjem ukupnog preživljenja (117, 120).

1.10.1. Uloga u estrogen receptor-pozitivnim karcinomima

Estrogen je glavni regulator razvoja i progresije ER+ karcinoma dojke (121). Poznato je da povećava staničnu proliferativnost i povećava udio tumorskih matičnih stanica (CSC-cancer stem cells) (122-124). Smatra se kako su CSC zaslužne za metastaziranje tumora i rezistenciju na antihormonalnu terapiju. Jedna od studija dokazala je da estrogen povećava ekspresiju GLI1 i GLI2 u ER+ staničnim linijama karcinoma dojke, dok je inhibicija GLI1 i GLI2 spojem GANT61 rezultirala smanjenjem formiranja CSC u staničnim linijama (125). Također je

dokazano da estrogen povećava ekspresiju SHH i GLI1 te nuklearnu translokaciju GLI1 i invazivnost ER+ tumorskih stanica (116). Stoga se može zaključiti kako HH signalni put promovira invazivnost odnosno djeluje kao medijator transformacije neinvazivnog u invazivni fenotip.

1.10.2. Uloga u HER2-pozitivnim karcinomima

Kod HER2-pozitivnih karcinoma nekoliko istraživanja je potvrdilo prisutnost snažne ekspresije SHH i GLI1 u karcinomima u odnosu na zdrave kontrole, no bez značajne korelacije s kliničko-patološkim značajkama (126, 127). Istraživanjima na staničnom modelu karcinoma dojke dokazalo se da inhibicija Hedgehog acyl-transferaze, jednog od glavnog enzima prilikom sinteze SHH, dovodi do smanjenja rasta HER2-pozitivnih tumorskih stanica (118, 128, 129).

1.10.3. Uloga u trostruko negativnim karcinomima

Za ovaj molekularni podtip nekoliko kliničkih studija potvrdilo je kako je povećana ekspresija SHH i SMO povezana s većim nuklearnim gradusom, dok su viši stadiji bolesti povezani s ekspresijom SMO i GLI (116, 117).

Kod TNBC uočena je visoka zastupljenost matičnih karcinomskih stanica, što se opet povezalo s većom incidencijom relapsa i metastaza (130, 131). Također je zamijećeno da snažnija ekspresija SHH povećava staničnu proliferaciju te invazivnost u 'in vitro' uvjetima te kako kanonska signalizacija doprinosi rastu tumora i metastaziranju promocijom tumorske neoangiogeneze (132, 133). Na animalnom modelu također je dokazana povezanost sklonosti TNBC stvaranju koštanih metastaza s ekspresijom SHH (134, 135).

1.11. Hedgehog proteini

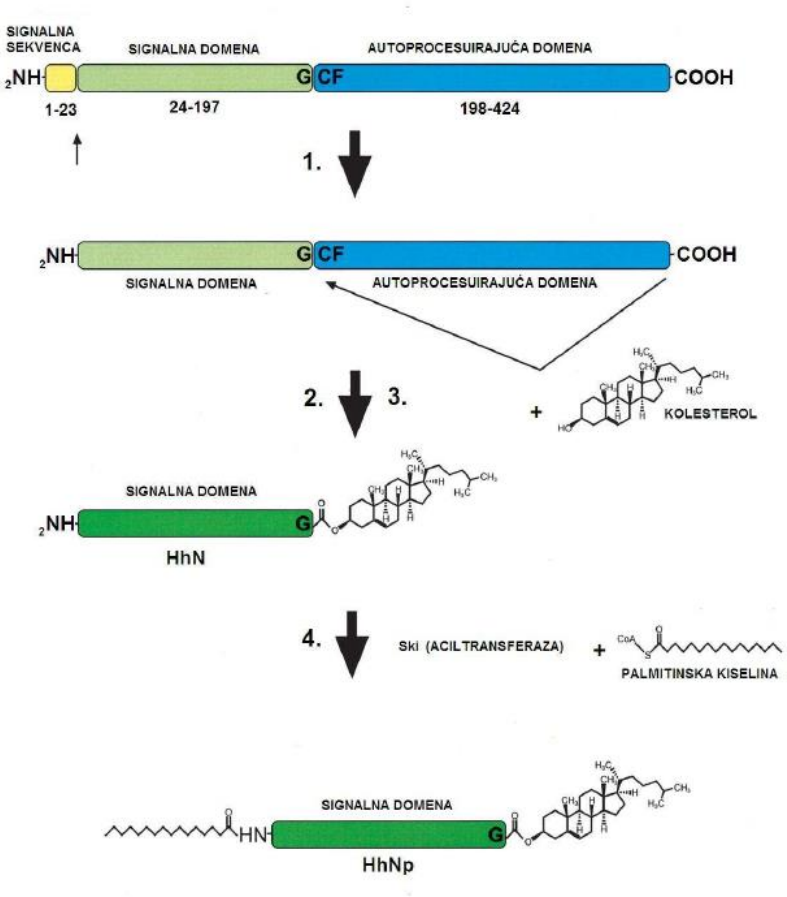
U kralješnjaka su identificirana tri homologa HH proteina, a nazvani su: Sonic hedgehog (SHH), Indian hedgehog (IHH) i Desert hedgehog (DHH) (136-138). Svaki od tri spomenuta proteina ima sposobnost vezanja Ptch1 i aktiviranja signalnog puta HH-GLI (139).

IHH sudjeluje kod razvoja hrskavice, crijeva i mliječnih žlijezdi (140-142), dok u razvoju sjemenika i kosti sudjeluju DHH i IHH (143, 144).

1.11.1. Sonic hedgehog protein

Do sada je najviše istražen i najbolje okarakteriziran protein SHH (Slika 3.) (42). SHH protein je HH protein s najjačom aktivnošću i najširom ekspresijom u tkivima u odnosu na ostale HH ligande (139). Uključen je u razvoj različitih organa i tkiva tijekom razvoja kao što su središnji živčani sustav, ekstremiteti, crijeva, pluća, zubi i folikula dlaka (40).

Prije otpuštanja aktivnog oblika iz stanica, HH proteini prolaze procese sazrijevanja (Slika 3.). Nakon translacije, prvo se uklanja N-terminalna signalna sekvenca s polipeptida koji se potom autokatalitički cijepa između glicina i cisteina, pri čemu nastaje N-terminalni fragment. Na N-terminalni fragment se potom na njegovom C-kraju na glicin veže kolesterol, pri čemu nastaje fragment koji je povezan s nizom poznatih signalizirajućih aktivnosti (145). Nakon toga slijedi proces palmitoilacije. Za cistein se na N-terminalnom kraju pomoću enzima Skinny (Ski) hedgehog aciltransferaze veže palmitoilna skupina palmitinske kiseline što dovodi do formiranja aktivnog HH proteina (146). Aktivni oblik HH proteina zatim se veže na svoj transmembranski receptor Ptch i aktivira daljnju signalizaciju (147-149). U cijelom ovom procesu poznata su još dva proteina sa značajnom ulogom. Protein Dispatched (Disp) koji omogućava otpuštanje proteina HH iz stanica u kojima nastaje (150) te protein HHip (eng. Hedgehog interacting protein) koji može vezati HH protein i na taj način odvlačiti HH od svojeg pravog receptora, što dovodi do sprječavanja aktivacije signalnog puta (151).



Slika 3. Shematski prikaz posttranslacijskog procesiranja i sazrijevanja proteina HH. Protein pune duljine sadrži signalnu i autoprocesirajuću domenu. Autoprocesirajuća domena inicira cijepanje i vezanje kolesterola na novonastali C-kraj. Zatim aciltransferaza HHAT katalizira vezanje palmitinske kiseline na N-kraj, čime nastaje zreli signalni peptid HHNp (SHH-N). Slika je preuzeta i prilagođena iz Varjosalo i Taipale, 2008.

1.11.2. Interakcija sonic hedgehog proteina s receptorom androgena u karcinomu prostate

Trnski i suradnici dokazali su interakciju SHH s AR na staničnom modelu androgen neovisnog karcinoma prostate (152). U njihovom istraživanju prisutno je vezanje molekule kolesterola vezane za C-terminalni kraj SHH na ligand vezujuće mjesto receptora androgena. Rezultati istraživanja sugeriraju kako je ova interakcija potencijalni mehanizam preživljavanja karcinomskih stanica u uvjetima bez androgena odnosno gdje AR nije stimuliran androgenom. Navedena interakcija u ovom slučaju također predstavlja potencijalnu terapijsku metu.

2.HIPOTEZA

Interakcija proteina sonic hedgehog s receptorom androgena i/ili estrogena u tkivu dojke povezana je s kliničko-patološkim karakteristikama molekularnih podtipova karcinoma dojke.

3.CILJ ISTRAŽIVANJA

1) Odrediti ekspresiju proteina SHH na arhivskim uzorcima tkiva različitih molekularnih podtipova karcinoma dojke.

2) Odrediti ekspresiju receptora androgena (AR) na arhivskim uzorcima tkiva različitih molekularnih podtipova karcinoma dojke.

3) Na staničnim linijama karcinoma dojke (MCF-7 i SkBr3) koje pokazuju različitu ekspresiju proteina SHH i receptora androgena i estrogena dokazati fizičku interakciju proteina SHH s tim receptorima.

4) Povezati razinu ekspresije proteina SHH i receptora androgena s kliničko-patološkim karakteristikama molekularnih podtipova karcinoma dojke.

5) Povezati razinu ekspresije proteina SHH, receptora androgena i kliničko-patoloških karakteristika s ukupnim preživljenjem pacijentica s različitim molekularnim podtipom karcinoma dojke.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao presječno s povijesnim podatcima, a za odabir pacijentica čije arhivsko tkivo će se koristiti u istraživanju korišten je bolnički informacijski sustav KB Dubrava u Zagrebu.

4.2. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na arhivskom materijalu Kliničkog zavoda za patologiju KB Dubrava. Odabrani su uzorci karcinoma dojke žena operiranih u periodu od 2010. do 2015. godine. U tom periodu pregledani su i analizirani podatci svih pacijentica kirurški liječenih na Klinici za plastičnu kirurgiju KB Dubrava, a s otpusnim dijagnozama karcinoma dojke. Uvidom u nalaze patologa u bolničkom informacijskom sustavu, arhivski uzorci su konsekutivno razvrstavani u skupine prema molekularnom podtipu karcinoma dojke dok nije prikupljen planirani broj uzoraka.

Planirano je ukupno analizirati 180 uzoraka tkiva različitih molekularnih podtipova karcinoma dojke, podijeljenih na sljedeći način:

- luminal A: 50 uzoraka
- luminal B/HER2-: 30 uzoraka
- luminal B/HER2+: 30 uzoraka
- TNBC: 50 uzoraka
- HER2-enriched: 20 uzoraka

Ovakva podjela odgovara raspodjeli broja uzoraka za pojedini podtip raka dojke prema radu u kojem je na osnovi tog broja uzoraka dobivena statistički značajna razlika u ekspresiji proteina sonic hedgehog, uz snagu studije od 0,8 i odabranu razinu značajnosti $P < 0.05$ (120).

Također su bili prikupljeni i sljedeći kliničko-patološki podatci iz prisutne medicinske dokumentacije: TNM-stadij, razina ekspresije estrogenskih (ER), progesteronskih (PR), HER2-receptora i proliferacijskog markera Ki67 te prisutnost limfangioinvazije.

Podatci o preživljenju bili su prikupljeni iz bolničkog informacijskog sustava te telefonskim pozivima pacijenticama. Dobiveni podatci korišteni su za računanje ukupnog preživljenja koje se mjerilo od datuma operacije do datuma smrti od bilo kojeg uzroka ili zadnje provjere.

U istraživanju su planiraju korištene dvije trajne stanične kulture raka dojke: MCF-7 kao pozitivna kontrola koja je model za podtip luminal A i koja eksprimira protein SHH i receptore androgena i estrogena te kao negativna kontrola SKBR3 koja je model za podtip HER2-enriched i koja ne eksprimira niti jedan od navedenih proteina (37, 153, 154).

4.3.Metode

4.3.1. Određivanje ekspresije receptora androgena

Za određivanje ekspresije receptora androgena iz parafinskih blokova učinjeni su rezovi od 2-3 µm, nakon čega je uslijedila deparafinizacija u termostatu. Nakon deparafinizacije slijedi predigestija u termo kupelji PT - link (DAKO, Glostrup, Danska), uz primjenu „EnVision target solution“ (DAKO, Glostrup, Danska). Imunohistokemijsko bojanje učinjeno je koristeći automatizirani imunohistokemijski sistem DAKO Autostainer (DAKO, Glostrup, Danska). U svrhu imunohistokemijskog bojanja korišteno je Androgen protutijelo, mišje monoklonalno clone AR441, lot 11237713 (DAKO, Glostrup, Danska), u razrjeđenju 1:75. Za detekciju izražaja imunohistokemijskog bojenja korištena je indirektna Avidin biotin kompleks tehnika EnVision detection kit (DAKO, Glostrup, Danska.) Zatim slijedi kontrastiranje hemalaunom (1 min) te provlačenje kroz uzlazni niz alkohola (70 % - 100 %), ksilol i pokrivanje stakala. Kao pozitivna kontrola upotrijebljeno je tkivo ljudske dojke uklopljeno u parafin.

Svi pripremljeni uzorci mikroskopski su analizirani Olympus BX53 mikroskopom (Olympus, Tokyo, Japan) od strane patologa te je količina odnosno udio obojenih jezgara tumorskog tkiva izražena kao postotak pozitivnosti receptora androgena za određeni uzorak.

4.3.2. Određivanje ekspresije sonic hedgehog proteina

U ovom radu su za određivanje ekspresije proteina SHH iz parafinskih blokova bili učinjeni rezovi od 2-3 µm, nakon čega je uslijedila deparafinizacija u termostatu. Nakon deparafinizacije slijedi predigestija u Ventana BenchMark Ultra aparatu (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska) uz termo postolja i ULTRA Cell Conditioning Solution (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska). Imunohistokemijsko bojanje bilo je učinjeno korištenjem automatiziranog imunohistokemijskog sistema Ventana BenchMark (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska). Za vizualizaciju je korišten ultraViewUniversal DAB detekcijski kit Ventana Medical Systems (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska).

Kit detektira primarna mišja ili kunićeva protutijela koja su vezana na antigen u uzorku tkiva fiksiranom u formalinu i uklopljenom u parafin (FFPE, Formalin-Fixed Paraffin-Embeded). ultraViewUniversal DAB detekcijski kit sastoji se od: ultraViewUniversal DAB inhibitora (3 % vodikov peroksid) ,ultraViewUniversal HRP Multimera (koktel HRP-om obilježenih sekundarnih protutijela; kozja protiv mišjih IgG i IgM i kozja protiv kunićevih), ultraViewUniversal DAB kromogena, ultraViewUniversal vodikov peroksida, ultraViewUniversal bakra (bakrov sulfat u acetatnom puferu). U svrhu imunohistokemijskog bojanja bilo je korišteno SHH protutijelo, zečje poliklonalno, IgG, B1314 (Santa Cruz Biotehnology, Dallas, USA), u razrjeđenju 1:50. Nastali kompleks je vizualiziran pomoću hidrogen peroksida i DAB kromogena koji stvara smeđi precipitat vidljiv pod svjetlosnim mikroskopom. Zatim je uslijedilo kontrastiranje hemalaunom (1 min) te provlačenje kroz uzlazni niz alkohola (70 % - 100 %), ksilol i pokrivanje stakala. Kao pozitivna kontrola bilo je upotrijebljeno tkivo uretera uklopljeno u parafin.

Ovako pripremljeni uzorci bili su mikroskopski analizirani Olympus BX53 mikroskopom (Olympus, Tokyo, Japan) od strane patologa. Kod očitavanja ekspresije proteina SHH evaluiran je intenzitet obojenja i postotak obojenih stanica. Planirana ljestvica intenziteta je 0 - 3 (0 - negativan, 1 - slabi intenzitet, 2 – srednji intenzitet, 3 – jaki intenzitet). Ako isti preparat pokazuje različite intenzitete obojenja, prvo će biti određeno koji dio tumorskog tkiva (postotak stanica) je obojen jačim intenzitetom, dok je preostali dio tumora obojen slabijim intenzitetom. Ukupna ekspresija proteina SHH izrazit će se kao imunoreaktivni skôr kojeg čini zbroj umnoška iznosa jačeg intenziteta obojenja s postotkom stanica s jačim intenzitetom i umnoška iznosa slabijeg intenziteta s postotkom stanica sa slabijim intenzitetom.

4.3.3. Dokazivanje fizičke interakcije proteina sonic hedgehog s receptorom androgena i estrogena pomoću PLA metode

Postojanje fizičke interakcije proteina SHH s receptorom androgena i estrogena provjereno je pomoću takozvane metode ligacije u neposrednoj blizini (eng. *proximity ligation assay*, PLA) (155) na modelu *in vitro* karcinoma dojke. Metoda PLA se temelji na stvaranju produkta DNA pomoću amplifikacije kotrljajućeg kruga (eng. *rolling circle amplification*) na mjestima gdje dolazi do interakcije dva proteina od interesa. Proteini se obilježavaju oligonukleotidima i ako su u interakciji (međusobnoj udaljenosti manjoj od 40 nm) nastali produkt DNA će se obilježiti probom koja nosi fluorescentnu boju Texas Red koja fluorescira crvenom bojom ($\lambda_{emisije}$ 624 nm) te se pod mikroskopom mjesto interakcije proteina vidi kao crvena točka. Za lokalizaciju interakcije unutar stanice (jezgra ili citoplazma), za protubojanje koristi se fluorescentna boja DAPI koja boji DNA, to jest stanične jezgre plavom bojom ($\lambda_{emisije}$ 460 n).

U svrhu izrade ove doktorske disertacije korištene su dvije trajne stanične linije karcinoma dojke: MCF-7 (86012803; ECACC, Wiltshire, UK) kao pozitivna kontrola koja je model za podtip luminal A i koja eksprimira protein SHH i receptore androgena i estrogena te kao negativna kontrola SkBr3 (EP-CL-0211, Elabscience, Houston, Texas, SAD) koja je model za podtip HER2-enriched i koja ne eksprimira niti jedan od navedenih proteina (37, 153, 154). Stanične linije dobivene su ljubaznošću dr. sc. Ane Čipak Gašparović (Institut Ruđer Bošković, Zagreb). Stanične linije MCF-7 i SkBr3 uzgajane su u mediju DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka), uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum*, FBS) (Merck KGaA). Medij DMEM je kompletiran dodatkom 1 mM natrijevog piruvata, 1 % otopine antibiotika penicilina i streptomicina i 4 mM L-glutamina (Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Stanične linije uzgajane su u inkubatoru pri kontroliranim uvjetima: 5 % CO_2 i temperaturi od 37 °C.

Za izvođenje metode PLA stanice su nasađene na predmetno stakalce *Milli EZSlide 8-well glass slides* (Merck KGaA), koje sadrži osam komorica za rast stanica, pri gustoći od 3 x 10^4 stanica po komorici. Nakon 24 sata od nasađivanja stanica, komorice su tri puta isprane PBS-om (eng. *Phosphate-Buffered Saline*) (1,7 mM KH_2PO_4, 136 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2,7 mM KCl, pH 7,2) te su potom stanice fiksirane dodavanjem 3,6 % otopine paraformaldehida (Kemika, Zagreb, Hrvatska) 15 minuta na sobnoj temperaturi. Komorice su ponovno tri puta isprane PBS-om, dodan je metanol (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska) te je ponovljena inkubacija pri istim

uvjetima i trostruko ispiranje PBS-om. U međuvremenu je pripremljena 1 x otopina *Dako Target Retrieval Solution Citrate* (Agilent Technologies, CA, SAD) i zagrijana u mikrovalnoj pećnici do vrenja. Ista je potom nakapana u svaku od komorica i inkubirana pola sata na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije komorice su još jednom isprane PBS-om, uklonjena je plastična pregrada s predmetnog stakalca koja odvaja komorice te su rubovi između komorica obrubljeni flomasterom *Dako Pen* (Agilent Technologies) koji ostavlja hidrofobni trag. Nakon toga slijedi blokiranje i svi ostali koraci pripreme stanica za vizualizaciju, koristeći reagense iz komercijalnog kita *Duolink In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit* (DUO92101, Sigma Aldrich, Missouri, SAD) i protokol *Duolink PLA Fluorescence Protocol* prema uputama proizvođača reagensa kita. Najprije je kratko vorteksirana otopina za blokiranje *Duolink Blocking Solution*, potom je po 40 µL iste dodano u svaku od komorica te je predmetno stakalce inkubirano sat vremena u inkubatoru za rast stanica na 37 °C položeno u Petrijevu zdjelicu s filter-papirom prethodno navlaženim destiliranom vodom, kako bi se spriječilo isušivanje komorica sa stanicama. Po inkubaciji, višak otopine uklonjen je s predmetnog stakalca i u svaku od komorica dodano je 40 µL otopine odgovarajuće kombinacije primarnih antitijela razrijeđenih do željene koncentracije u otopini *Duolink Antibody Diluent*. Primarna antitijela inkubirana su preko noći na 4 °C. Popis korištenih primarnih antitijela i razrjeđenja nalazi se u Tablici 1. Kao tehnička negativna kontrola koristile su se iste stanice netretirane primarnim antitijelima ili će se umjesto antitijela anti-SHH koristiti antitijelo anti-tubulin γ jer tubulin γ ne bi trebao stupati u interakciju s AR i ER. Nakon prekonoćne inkubacije, ostatak otopina primarnih antitijela uklonjen je s predmetnog stakalca i isto je potom isprano dva puta po 5 minuta u 1 x puferu *Wash Buffer A* na sobnoj temperaturi. Za to vrijeme pripremljena je otopina prethodno vorteksiranih proba PLA PLUS i MINUS, u razrjeđenju 1:5 u otapalu *Duolink Antibody Diluent* (za reakcijski volumen od 40 µL dodano je 8 µL probe MINUS i 8 µL probe PLUS u 24 µL otapala *Duolink Antibody Diluent*). Tako pripremljene probe dodane su u komorice i inkubirane sat vremena u inkubatoru na 37 °C. Po uklanjanju otopine proba s predmetnog stakalca, ponovljeno je dvostruko ispiranje stakalca u puferu *Wash Buffer A* i pripremljena je otopina za ligaciju. Najprije je pufer *Duolink Ligation Buffer* razrijeđen 5 x u vodi visoke čistoće (za reakcijski volumen od 40 µL dodano je 8 µL 5x pufera *Ligation Buffer* u 32 µL vode) te je potom u tako pripremljeni pufer dodana ligaza, iz istog komercijalnog seta, u omjeru 1:40 (za reakcijski volumen od 40 µL dodano je 1 µL ligaze u 39 µL 1x pufera *Ligation Buffer*). Ligacijska smjesa dodana u komorice inkubirana je 30 minuta u inkubatoru na 37 °C. Nakon ligacije slijedi

korak amplifikacije, odnosno nakon ispiranja ligacijske smjese slijedi priprema 1 x pufera *Amplification Buffer* razrjeđivanjem 5 x pufera *Amplification Buffer* u vodi visoke čistoće. U 1 x pufer *Amplification Buffer* potom je dodana polimeraza u omjeru 1:80 (za reakcijski volumen od 40 µL dodano je 0,5 µL polimeraze u 39,5 µL 1 x pufera *Amplification Buffer*). Tako pripremljena smjesa dodana je u komorice i inkubirana 100 minuta na 37 °C. Posljednji korak pred pripremu predmetnog stakalca za vizualizaciju su finalna ispiranja. Nakon uklanjanja amplifikacijske smjese, stakalce je isprano dva puta po 10 minuta u 1 x puferu *Wash Buffer B* i potom još jednom u 0,01 x puferu *Wash Buffer B* na jednu minutu. Isprano predmetno stakalce potom je uklopljeno s pokrovnicom, koristeći 10 µL medija za uklapanje *Prolong Gold Antifade mounting medium with DAPI* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD) po komorici, i ostavljeno da se osuši preko noći na 4 °C u neprozirnoj kutiji. Idućeg dana rub pokrovnog stakalca obrubljen je neprozirnim lakom za nokte te je stakalce pohranjeno u neprozirnoj kutiji na -20 °C do vizualizacije na laserskom pretražnom konfokalnom mikroskopu Leica SP8 X FLIM (Leica Microsystems, Wetzlar, Njemačka).

Tablica 1. Popis korištenih primarnih antitijela za PLA

ANTIGEN	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ	PODRIJETLO	RAZRJEĐENJE
Sonic hedgehog	Santa Cruz Biotechnology	(E-1) sc-365112	miš	1:50
Receptor estrogena α	Cell Signaling Technology	D6R2W	kunić	1:100
Receptor androgena	Cell Signaling Technology	D6F11	kunić	1:400
Tubulin γ	Santa Cruz Biotechnology	(C-11) sc-17787	miš	1:100

4.4. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Hi-kvadrat testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilk testom. Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu distribuciju, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kontinuiranih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. U slučaju 3 i više nezavisnih skupina testirane su analizom varijance (ANOVA) ili Kruskal-Wallisovim testom (Post hoc Conover), ovisno o normalnosti raspodjele.

Povezanost normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli ocijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije *r*, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ (rho). ROC (engl. *Receiver Operating Characteristic*) analiza primijenjena je za određivanje optimalne granične vrijednosti receptora androgena AR i proteina SHH, površine ispod ROC krivulje (engl. *area under the curve*, AUC), specifičnosti, osjetljivosti ispitanih parametara u slučaju lošeg ishoda, pojave recidiva ili metastaza. Za statističku analizu preživljenja korištene su Kaplan-Meierove krivulje u kombinaciji s long rank testom. Univarijantni i multivarijantni Cox model korišteni su za izdvajanje prediktora koji su značajno povezani s preživljenjem (ukupnim, do pojave metastaza i recidiva). Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na Alpha = 0,05.

Statistička obrada rezultata provedena je pomoću programa MedCalc® Statistical Software version 20.100 (*MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; https://www.medcalc.org; 2022*) i SPSS (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

5. REZULTATI

5.1. Kliničko-patološke karakteristike bolesnica s karcinomom dojke

Istraživanje je provedeno na 186 bolesnica s karcinomom dojke. Medijan dobi ispitanica je 60 godina, u rasponu od 28 do 87 godina. S obzirom na molekularni podtip, 73 (39,2 %) bolesnica je s podtipom LumB, a najmanje ih je s podtipom HER2, 16 (8,6 %) bolesnica. Tablica 2. detaljno prikazuje obilježja bolesnica čiji su uzorci tkiva karcinoma dojke korišteni u ovom istraživanju.

Tablica 2. Osnovna obilježja bolesnica čiji su uzorci tkiva korišteni u istraživanju

Dob (godine) [Medijan (interkvartilni raspon)]	60 (51 – 71)
Dobna skupina [n (%)]	
≤ 50 godina	46 (24,9)
> 50 godina	139 (75,1)
ER [n(%)]	
Ne	64 (35)
Da	121 (65)
PR [n(%)]	
Ne	79 (43)
Da	106 (57)
HER2 [n (%)]	
Ne	143 (76,9)
Da	43 (23,1)
Molekularni podtip [n (%)]	
LumA	49 (26,3)
LumB	73 (39,2)
LumB/ HER2-	46 (24,7)
LumB/ HER2+	27 (14,5)
HER2	16 (8,6)
TNBC	48 (25,8)
Ki67 [Medijan (interkvartilni raspon)]	28 (17 – 40)
Ki67 [n (%)]	
< 20 %	52 (28,0)
≥ 20 %	134 (72,0)
Histotip [n (%)]	
Invasive carcinoma	161 (86,6)
Carcinoma in situ + invasive carcinoma	25 (13,4)

Tablica 2. Osnovna obilježja bolesnica čiji su uzorci tkiva korišteni u istraživanju - nastavak

Veličina tumora (cm) [Medijan (interkvartilni raspon)]	2 (1,2 – 2,7)
Veličina tumora podjela [n (%)]	
T1 (0 – 2 cm)	106 (57,0)
T2 (2,1 – 5 cm)	70 (37,6)
T3 (> 5 cm)	9 (4,8)
N [n (%)]	
N0	113 (61,1)
N1	47 (25,4)
N2	14 (7,6)
N3	11 (5,9)
M [n (%)]	
M0	184 (98,9)
M1	2 (1,1)
Broj izvađenih čvorova [Medijan (interkvartilni raspon)]	4 (2 – 8) (min 1 – max 66)
Broj pozitivnih čvorova [Medijan (interkvartilni raspon)]	0 (0 – 1) (min 0 – max 16)
Prisutna limfovaskularna invazija [n (%)]	69 (37,1)
Recidiv	
Remisija	177 (95,2)
Relaps	8 (4,3)
Metastaze	19 (10,2)
Ishod [n (%)]	
Pozitivan (preživjela)	140 (75,3)
Negativan (preminula)	45 (24,2)

5.2. Ekspresija proteina SHH i AR u uzorcima tkiva karcinoma dojke

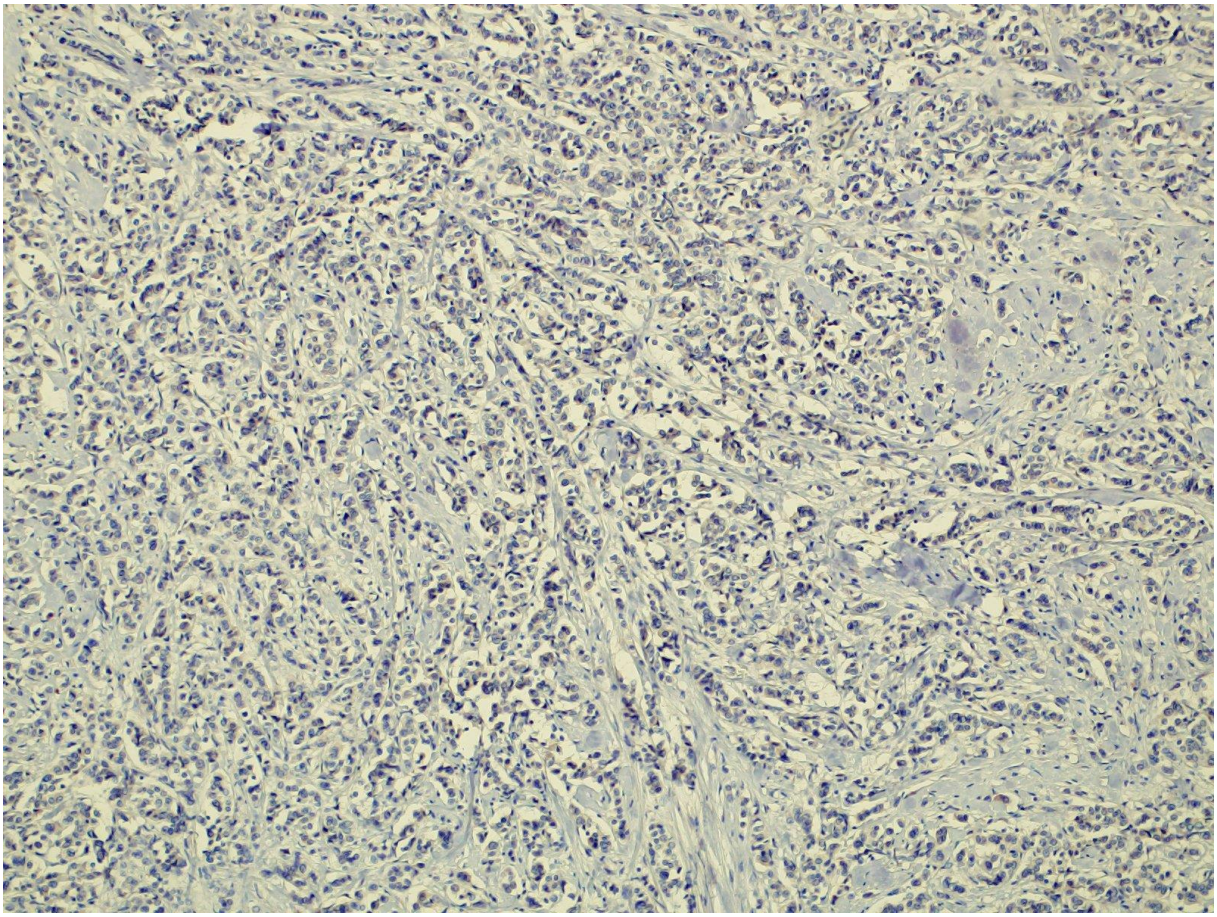
Imunohistokemijskom metodom određena je ekspresija proteina SHH i AR u 186 uzoraka tkiva. Razina ekspresije receptora androgena izražena je kao postotak obojenih jezgara tumorskih stanica, dok je ekspresija SHH izražena kao imunoreaktivni skôr, uzimajući pri tome u obzir intenzitet i postotak obojenih citoplazmi tumorskih stanica. Tablica 3. prikazuje zbirne rezultate.

Tablica 3. Medijan ekspresije proteina SHH i AR u istraživanim uzorcima

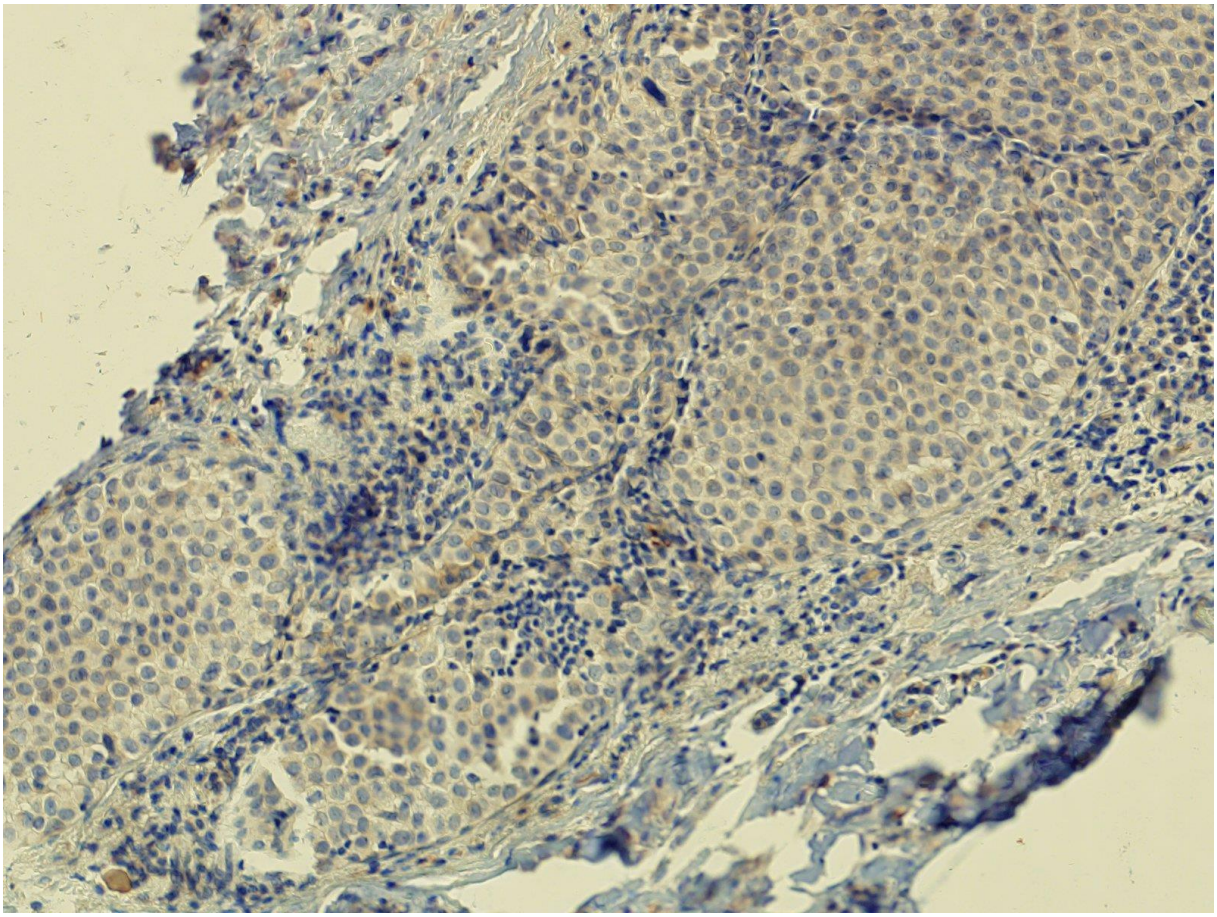
	Medijan (interkvartilni raspon)	Raspon minimum - maksimum
SHH imunoreaktivni skôr	150 (100 – 190)	0 – 300
AR % pozitivnih jezgara	80 (50 – 90)	0 – 100

5.2.1. Ekspresija proteina SHH u uzorcima tkiva karcinoma dojke

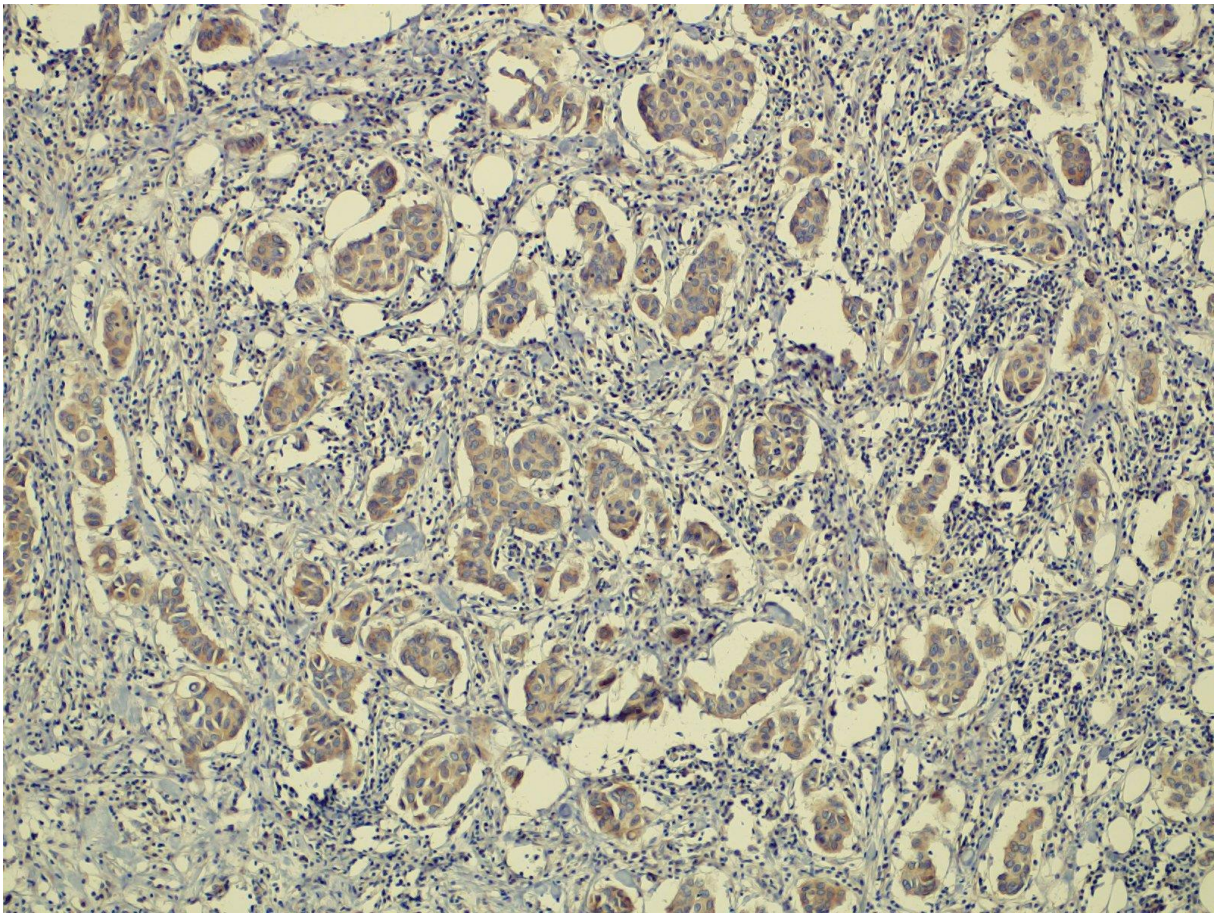
Analiza je pokazala da je ekspresija proteina SHH bila prisutna u 98 % (183/186) uzoraka. Medijan ekspresije je 150, a raspon 0 - 300. Slike 4.- 7. prikazuju reprezentativne primjere obojenja različitog SHH imunoreaktivnog skôra.



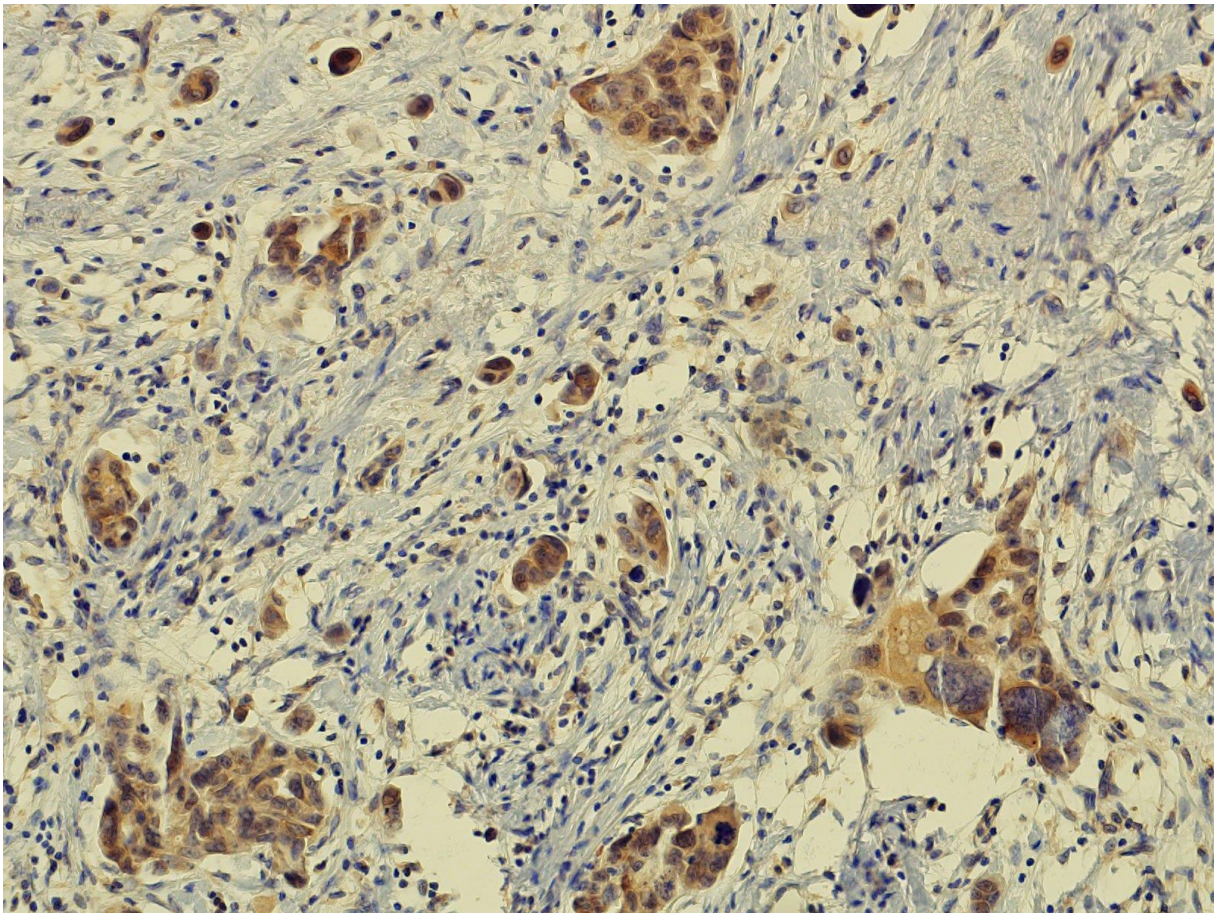
Slika 4. Prikaz intenziteta citoplazmatskog obojenja SHH koje odgovara SHH imunoreaktivnom skôru 0 (povećanje 100 x)



Slika 5. Prikaz intenziteta citoplazmatskog obojenja SHH koje odgovara SHH imunoreaktivnom skôru 100 (povećanje 200 x)



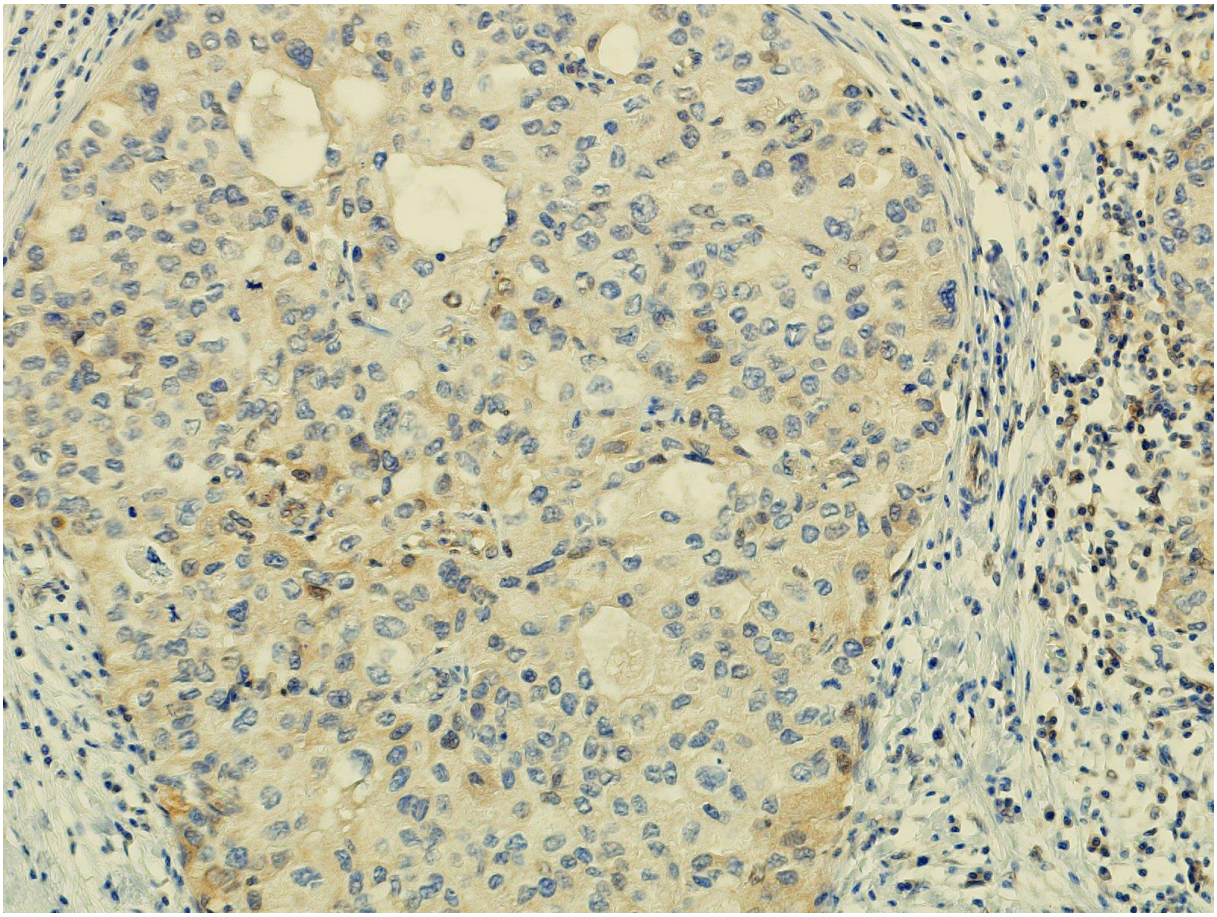
Slika 6. Prikaz intenziteta citoplazmatskog obojenja SHH koje odgovara SHH imunoreaktivnom skôru 200 (povećanje 100 x)



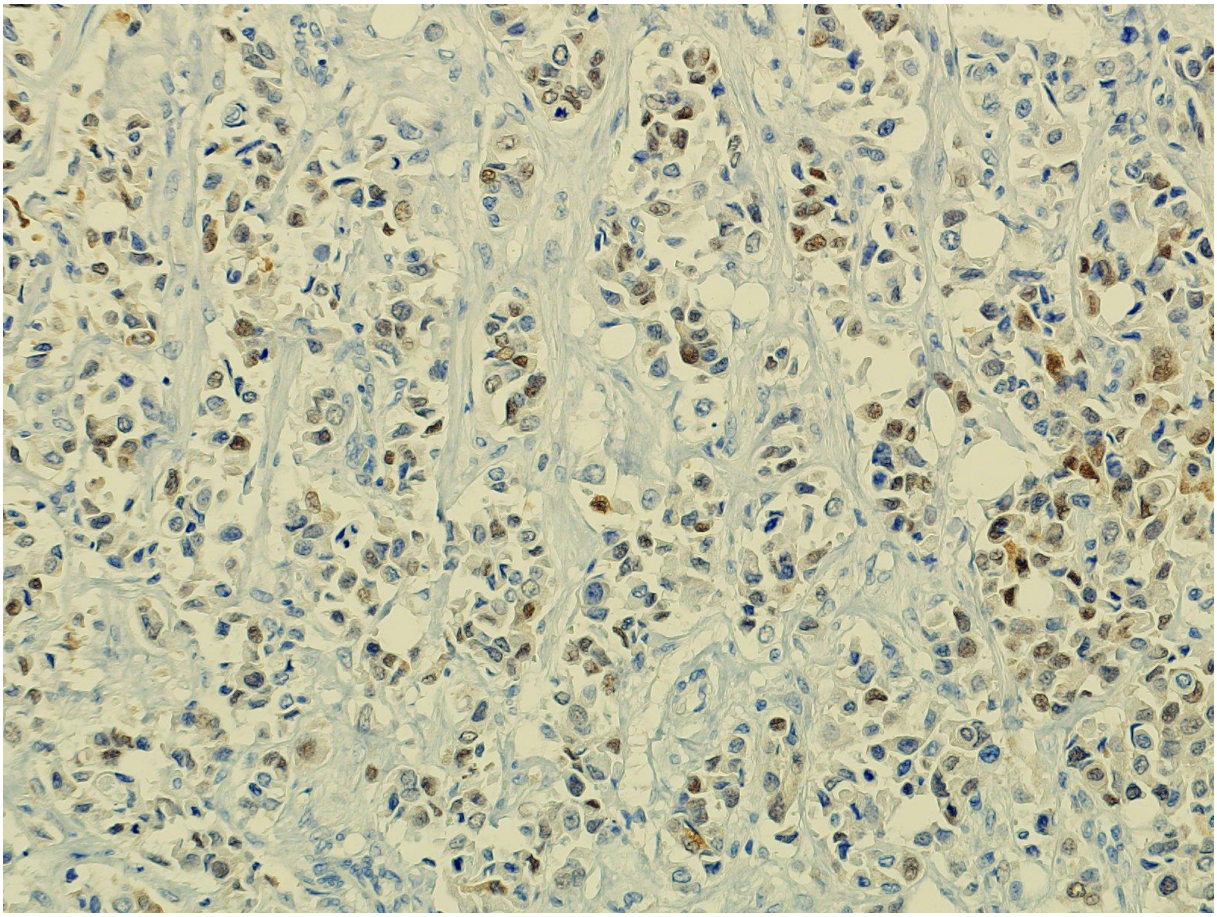
Slika 7. Prikaz intenziteta citoplazmatskog obojenja SHH koje odgovara SHH imunoreaktivnom skôru 300 (povećanje 200 x)

5.2.2. Ekspresija AR u uzorcima tkiva dojke

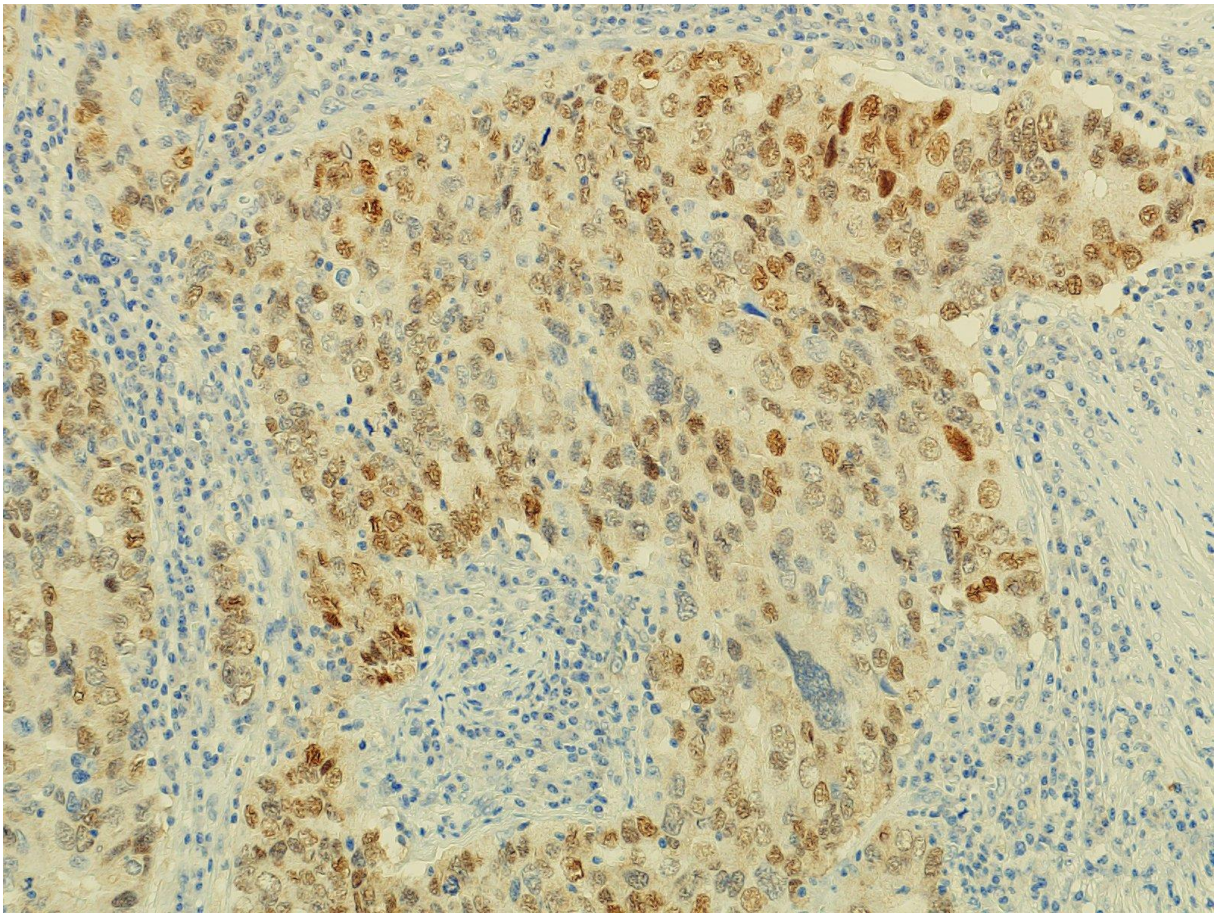
Analiza je pokazala kako je pozitivna ekspresija AR prisutna u jezgrama tumorskih stanica u 91 % (169/186) uzoraka. Medijan ekspresije je 80 %, a raspon 0 - 100. Slike 8. - 11. prikazuju reprezentativne primjere obojenja različitih nuklearnih pozitiviteta.



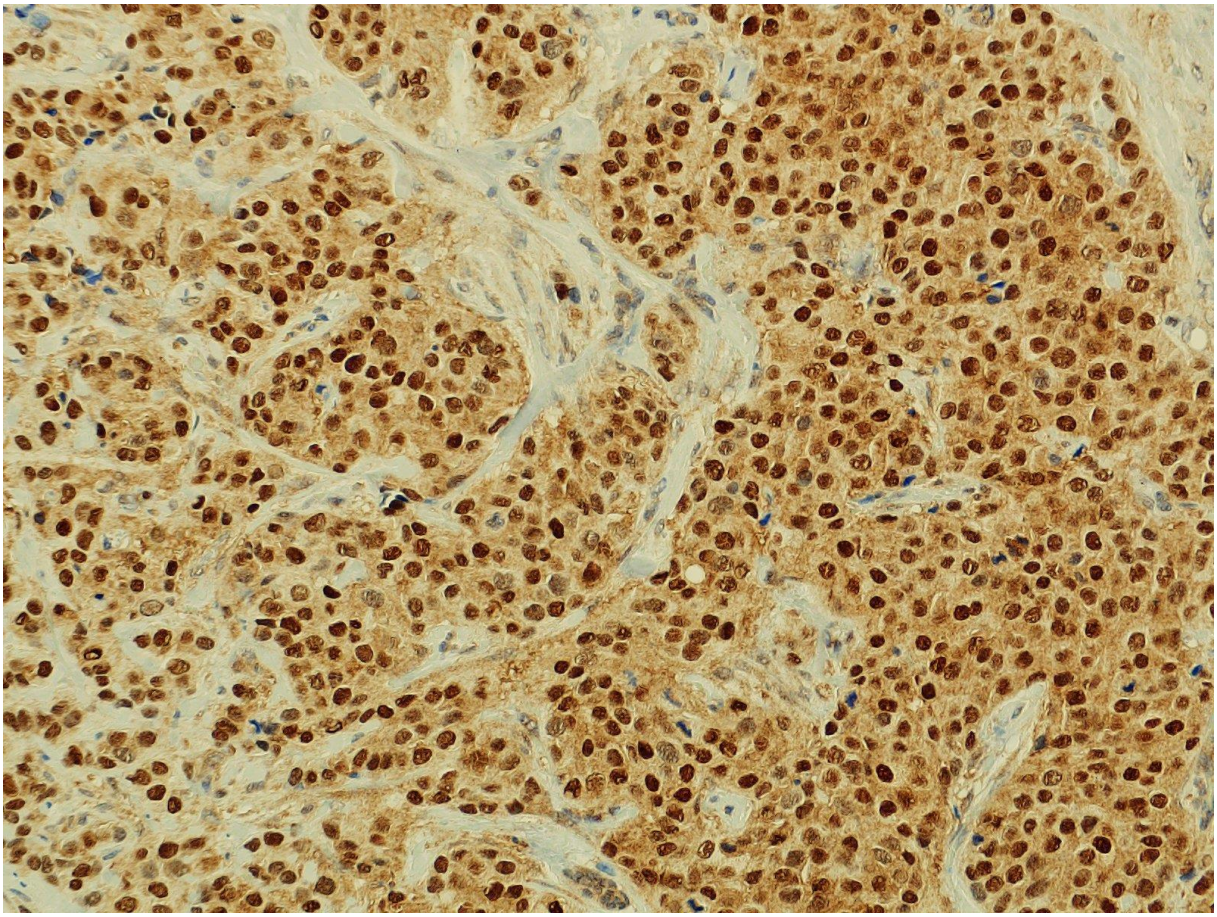
Slika 8. Prikaz postotka nuklearnog obojenja AR jednak 0 % (povećanje 200 x)



Slika 9. Prikaz postotka nuklearnog obojenja AR jednak 30 % (povećanje 200 x)



Slika 10. Prikaz postotka nuklearnog obojenja AR jednak 60 % (povećanje 200 x)



Slika 11. Reprezentativni primjer nuklearnog obojenja receptora androgena vrijednosti 100 % (povećanje 200 x)

5.3. Povezanost ekspresije SHH i AR s kliničko-patološkim značajkama karcinoma dojke

Statističkom analizom istražena je povezanost ekspresije proteina SHH i AR s kliničko-patološkim karakteristikama pacijentica čiji su uzorci tkiva korišteni za imunohistokemijsko bojenje. Pacijentice su podijeljene u podskupine, ovisno o ekspresiji pojedinog receptora (ER, PR, HER2), markera proliferacije(Ki67) te prema pripadnosti određenom molekularnom podtipu karcinoma dojke (LumA, LumB, HER2, TNBC).

5.3.1. Razlike u vrijednosti SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja svih bolesnica

Statistička analiza pokazala je kako najnižu ekspresiju proteina SHH imaju tumori kategorije T2 (2,1 - 5 cm) u usporedbi s T1 i T3 tumorima (*P* = 0,02) (Tablica 4.).

Tablica 4. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica

Sve bolesnice	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	46	145 (100 – 190)	0	- 20 do 20	0,65
> 50	139	150 (100 – 190)			
ER					
0	65	130 (88 – 200)	10	- 10 do 40	0,22
1	121	160 (110 - 190)			
PR					
0	80	140 (95 – 200)	0	- 10 do 30	0,57
1	106	160 (110 – 190)			
Ki67					
0	52	160 (100 – 190)	0	- 20 do 20	0,97
≥ 20 %	134	140 (100 – 190)			
Histotip					
Invasive carcinoma	161	140 (100 – 190)	10	- 20 do 40	0,44
in situ + invasive carcinoma	25	180 (100 – 200)			
HER2					
Ne	143	140 (100 – 190)	20	0 do 40	0,10
Da	43	180 (120 – 200)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	106	170 (110 – 200)	H = 7,8		
T2 (2,1 – 5 cm)	70	130 (902 – 180)	df = 2		**0,02**†‡
T3 (> 5 cm)	9	190 (135 – 205)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	106	170 (110 – 200)	-10	-30 do 0	0,12
> 2 cm	79	130 (100 – 188)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	176	150 (100 – 190)	30	0 do 80	0,07
> 5 cm	9	190 (135 – 205)			

N

N0	113	140 (100 – 190)			
N1	47	150 (100 – 198)	H = 1,3		0,72†
N2	14	190 (100 – 200)	df = 3		
N3	11	150 (120 – 195)			
N					
N0	113	140 (100 – 190)	0	- 10 do 20	0,52
svi ostali	72	155 (100 – 200)			
N					
N1	47	150 (100 – 198)	10	- 20 do 40	0,44
N2 + N3	25	170 (108 – 200)			
M					
M0	184	150 (100 – 190)	- 20		0,77
M1	2	135			
LVI					
0	117	150 (100 – 190)	0	- 20 do 20	0,77
1	69	150 (100 – 200)			
Molekularni podtip					
HER2	16	175 (110 – 200)			
LumA	49	170 (108 – 190)	H = 5,2		0,15†
LumB	73	150 (110 – 190)	df = 3		
TNBC	48	120 (80 – 190)			
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	46	145 (100 – 180)	10	- 20 do 40	0,38
LumB/HER2+	27	180 (123 – 190)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)
‡na razini P < 0,05 značajno su manje vrijednosti kod T2 u odnosu na T1, T3

Statistička analiza pokazala je kako je u estrogen-negativnih karcinoma ekspresija proteina SHH najniža u tumorima T2 u odnosu na T1 i T2 (*P* = 0,01) (Tablica 5.).

Tablica 5. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s estrogen-negativnim karcinomima dojke

ER0	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	17	110 (68 – 193)	20	- 20 do 70	0,26
> 50	48	140 (100 – 200)			
PR					
0	64	130 (85 – 200)	-	-	-
1	1	110			
Ki67					
0	4	90 (40 – 150)	40		0,22
≥ 20 %	61	130 (98 – 200)			
Histotip					
Invasive carcinoma	65	130 (88 – 200)	-	-	-
in situ + invasive carcinoma	-	-			
HER2					
Ne	49	120 (80 – 190)	40	0 do 80	0,06
Da	16	175 (110 – 200)			
Veličina tumora (T)					

T1 (0 – 2 cm)	26	175 (110 – 200)	H = 8,6		**0,01**†‡
T2 (2,1 – 5 cm)	34	105 (80 – 160)	df = 2		
T3 (> 5 cm)	4	210 (160 – 230)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	26	175 (110 – 200)	- 40	- 70 do 0	0,06
> 2 cm	38	110 (80 – 170)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	60	125 (80 – 190)	60	-	0,07
> 5 cm	4	210 (160 – 230)			
N					
N0	42	125 (100 – 190)			
N1	13	110 (75 – 175)	H = 2,6		0,44†
N2	5	200 (93 – 240)	df = 2		
N3	5	200 (138 – 210)			
N					
N0	42	125 (100 – 190)	10	- 30 do 60	0,68
svi ostali	23	160 (83 – 200)			
N					
N1	13	110 (75 – 175)	50	- 20 do 120	0,15
N2 + N3	10	200 (100 – 220)			
M					
M0	65	130 (88 – 200)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	45	120 (88 – 193)	20	- 20 do 60	0,43
1	20	165 (90 – 200)			
Molekularni podtip					
HER2	16	175 (110 – 200)			
LumA			H = 3,5		0,18†
LumB	1	110 (110 – 110)	df = 2		
TNBC	48	120 (80 – 190)			
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	1	110 (110 – 110)	-	-	-
LumB/HER2+	---	-			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)
‡na razini P < 0,05 značajno su manje vrijednosti kod T2 u odnosu na T1, T3

Analiza je pokazala kako kod pacijentica s ER pozitivnim karcinomima dojke nema razlike u ekspresiji proteina SHH u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 6.).

Tablica 6. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s estrogen-pozitivnim karcinomom dojke

ER1	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	29	180 (110 – 193)	0	- 30 do 20	0,73
> 50	91	150 (113 – 190)			
Histotip					
Invasive carcinoma	96	155 (110 – 190)	0	- 20 do 30	0,60
in situ + invasive carcinoma	25	180 (100 – 200)			
HER2					

Ne	94	155 (100 – 190)	0	- 20 do 30	0,57
Da	27	180 (123 – 190)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	80	165 (110 – 195)	H = 3,5 df = 2		0,73†
T2 (2,1 – 5 cm)	36	150 (100 – 185)			
T3 (> 5 cm)	5	180 (135 – 193)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	80	165 (110 – 195)	0	- 20 do 20	0,84
> 2 cm	41	150 (108 – 190)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	116	160 (105 – 190)	10	- 30 do 70	0,50
> 5 cm	5	180 (135 – 193)			
N					
N0	71	160 (103 – 190)			
N1	34	165 (110 - 200)	H = 1,9 df = 3		0,60†
N2	9	180 (108 - 200)			
N3	6	130 (120 - 150)			
N					
N0	71	160 (103 – 190)	0	- 20 do 20	0,83
svi ostali	49	150 (110 – 200)			
N					
N1	34	165 (110 - 200)	- 10	- 50 do 20	0,60
N2 + N3	15	140 (113 – 195)			
M					
M0	119	160 (110 – 190)	- 30		0,58
M1	2	135			
LVI					
0	72	170 (110 – 190)	0	- 30 do 20	0,64
1	49	150 (100 – 200)			
Molekularni podtip					
HER2					
LumA	49	170 (108 – 190)	0	- 20 do 20	0,77
LumB	72	155 (110 – 190)			
TNBC					
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	45	150 (100 – 185)	10	- 20 do 40	0,43
LumB/HER2+	27	180 (123 – 190)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako je u progesteron-negativnih karcinoma ekspresija proteina SHH najniža u skupini T2 tumora u odnosu na T1 i T3 (*P* = 0,004) (Tablica 7.).

Tablica 7. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s progesteron-negativnim karcinomom dojke

PR0	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	21	110 (68 – 193)	30	- 10 do 70	0,18
> 50	59	150 (100 – 200)			
ER					
0	64	130 (85 – 200)	10	- 20 do 70	0,39
1	16	185 (105 – 200)			

Ki67					
0	11	150 (85 – 200)	0	- 60 do 60	0,89
≥ 20 %	69	140 (98 – 200)			
Histotip					
Invasive carcinoma	77	140 (98 – 200)	10	-	0,71
in situ + invasive carcinoma	3	200			
HER2					
Ne	59	130 (80 – 200)	20	- 10 do 70	0,23
Da	21	180 (100 – 20)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	38	180 (110 – 200)	H = 10,9		**0,004**†‡
T2 (2,1 – 5 cm)	26	105 (80 – 160)	df = 2		
T3 (> 5 cm)	5	200 (180 – 225)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	38	180 (110 – 200)	- 40	- 70 do 0	**0,04**
> 2 cm	41	110 (80 – 185)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	74	135 (80 – 200)	60	0 do 120	**0,04**
> 5 cm	5	200 (180 – 225)			
N					
N0	49	130 (80 - 190)			
N1	17	140 (88 - 200)	H = 4,1		0,25†
N2	9	200 (108 - 205)	df = 3		
N3	5	200 (138 - 210)			
N					
N0	49	130 (80 - 190)	30	0 do 70	0,11
svi ostali	31	180 (100 – 200)			
N					
N1	17	140 (88 - 200)	30	- 20 do 100	0,21
N2 + N3	14	200 (110 – 200)			
M					
M0	80	140 (95 – 200)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	56	130 (85 - 200)	20	- 10 do 60	0,24
1	24	175 (105 – 200)			
Molekularni podtip					
HER2	16	175 (110 – 200			
LumA	7	190 (113 – 200	H = 3,9		0,27†
LumB	9	180 (95 – 200	df = 3		
TNBC	48	120 (80 - 190)			
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	4	170 (125 – 200)	- 10		0,61
LumB/HER2+	5	180 (43 – 200)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)
‡na razini P < 0,05 značajno su manje vrijednosti kod T2 u odnosu na T1, T3

Statistička analiza pokazala je kako pacijentice s progesteron-pozitivnim karcinomima dojke koje su i HER2-pozitivni imaju statistički značajno nižu ekspresiju proteina SHH u odnosu na HER2-negativne (*P* = 0,03) (Tablica 8.).

Tablica 8. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s progesteron-pozitivnim karcinomom dojke

PR1	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	25	180 (100 – 193)	- 10	- 40 do 10	0,35
> 50	80	150 (110 – 185)			
ER					
0	1	110	-	-	-
1	105	160 (110 – 190)			
Ki67					
0	41	160 (100 – 190)	0	- 20 do 20	0,95
≥ 20 %	65	150 (118 – 183)			
Histotip					
Invasive carcinoma	84	150 (110 – 190)	0	- 20 do 40	0,60
in situ + invasive carcinoma	22	175 (100 – 180)			
HER2					
Ne	84	90 (80 – 100)	- 10	- 20 do 0	**0,03**
Da	22	80 (60 – 90)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	68	160 (110 – 190)	H = 0,08 df = 2		0,96†
T2 (2,1 – 5 cm)	34	150 (100 – 190)			
T3 (> 5 cm)	4	160 (130 – 185)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	68	160 (110 – 190)	0	- 20 do 20	0,96
> 2 cm	38	150 (110 – 190)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	102	160 (110 – 190)	10		0,77
> 5 cm	4	160 (130 – 185)			
N					
N0	64	160 (110 – 190)	H = 1,7 df = 3		0,65†
N1	30	155 (100 – 190)			
N2	5	130 (95 – 185)			
N3	6	130 (120 – 150)			
N					
N0	64	160 (110 – 190)	- 10	- 30 do 10	0,43
svi ostali	41	150 (100 – 183)			
N					
N1	30	155 (100 – 190)	- 20	- 60 do 30	0,39
N2 + N3	11	130 (105 – 165)			
M					
M0	104	160 (110 – 190)	- 20		0,63
M1	2	135			
LVI					
0	61	170 (110 – 190)	- 10	- 30 do 10	0,37
1	45	140 (100 – 193)			
Molekularni podtip					
HER2					
LumA	42	165 (110 – 190)	0	20 do 20	0,81
LumB	64	150 (110 – 180)			
TNBC					
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	42	145 (100 – 180)	20	- 10 do 50	0,24

LumB/HER2+	22	175 (130 – 190)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s karcinomom dojke u kojemu je Ki67 manji od 20 % nema razlike u ekspresiji proteina SHH u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 9.).

Tablica 9. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s Ki67 manjim od 20 %

Ki67 < 20 %	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	7	180 (85 – 180)	10	- 65 do 70	0,54
> 50	45	160 (100 – 200)			
PR					
0	11	150 (85 – 200)	0	- 40 do 70	0,97
1	41	160 (100 - 190)			
ER					
0	4	90 (40 – 150)	70		0,21
1	48	165 (100 – 190)			
Histotip					
Invasive carcinoma	46	155 (100 – 190)	0	- 50 do 70	0,83
in situ + invasive carcinoma	6	180 (70 – 200)			
HER2					
Ne	49	90 (80 – 100)	- 20		0,05
Da	3	70			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	39	180 (113 – 200)	H = 1,7		0,06†
T2 (2,1 – 5 cm)	12	100 (85 – 140)	df = 3		
T3 (> 5 cm)	1	190 (190 – 190)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	39	180 (113 – 200)	- 50	- 90 do 0	0,05
> 2 cm	13	100 (88 – 158)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	51	160 (100 – 190)	-	-	-
> 5 cm	1	190			
N					
N0	37	160 (100 – 190)			
N1	13	180 (108 – 200)	H = 3,04		0,39†
N2	1	80 (80 – 80)	df = 3		
N3	1	90 (90 – 90)			
N					
N0	37	160 (100 – 190)	0	- 30 do 50	0,84
svi ostali	15	170 (93 – 198)			
N					
N1	13	180 (108 – 200)	- 90		0,13
N2 + N3	2	85			
M					
M0	52	160 (100 – 190)	-	-	-

M1		-			
LVI					
0	40	165 (100 – 190)	- 10	- 60 do 30	0,53
1	12	140 (85 – 190)			
Molekularni podtip					
HER2	2	150 (100 – 200)			
LumA	47	170 (103 – 190)	H = 5,67		0,13†
LumB	1	80 (80 – 80)	df = 3		
TNBC	2	40 (0 – 80)			
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	-	-	-	-	-
LumB/HER2+	1	80 (80 – 80)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s karcinomom dojke u kojemu je Ki67 veći ili jednak 20 % nema razlike u ekspresiji proteina SHH u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 10.).

Tablica 10. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s Ki67 većim ili jednakim 20 %

Ki67 ≥ 20 %	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					†
≤ 50	39	140 (100 – 200)	0	-20 do 30	0,76
> 50	94	140 (110 – 190)			
PR					†
0	69	140 (98 – 200)	10	- 10 do 30	0,52
1	65	150 (118 – 183)			
ER					
0	61	130 (98 – 200)	10	- 10 do 40	0,34
1	61	160 (118 – 190)			
Histotip					
Invasive carcinoma	115	140 (100 – 190)	10	- 20 do 50	0,42
in situ + invasive carcinoma	19	170 (108 – 195)			
HER2					
Ne	94	130 (100 – 190)	20	0 do 50	0,05
Da	40	180 (125 – 200)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	67	150 (110 – 198)	H = 3,9		0,14†
T2 (2,1 – 5 cm)	58	135 (100 – 180)	df = 2		
T3 (> 5 cm)	8	190 (130 – 210)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	67	150 (110 – 198)	- 10	- 30 do 10	0,49
> 2 cm	66	140 (100 – 190)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	125	140 (100 – 190)	30	- 10 do 80	0,11
> 5 cm	8	190 (130 – 210)			
N					
N0	76	140 (100 – 185)	H = 2,7		0,44†
N1	34	140 (90 – 190)	df = 3		
N2	13	200 (108 – 200)			

N3	10	160 (120 – 200)			
N					
N0	76	140 (100 – 185)	10	- 20 do 30	0,56
svi ostali	57	150 (100 – 200)			
N					
N1	34	140 (90 – 190)	20	- 10 do 60	0,16
N2 + N3	23	180 (120 – 200)			
M					
M0	132	145 (100 – 195)	- 10		0,81
M1	2	135			
LVI					
0	77	140 (100 – 190)	10	- 10 do 30	0,51
1	57	150 (108 – 200)			
Molekularni podtip					
HER2	14	175 (120 – 200)			
LumA	2	155 (120 – 190)	H = 3,4		0,27†
LumB	72	155 (110 – 190)	df = 3		
TNBC	46	120 (80 – 190)			
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	46	145 (100 – 180)	15	- 10 do 40	0,28
LumB/HER2+	26	180 (130 – 190)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako je kod bolesnica s HER2-negativnim karcinomom dojke ekspresija proteina SHH najniža u skupini T2 tumora u odnosu na T1 i T3 (*P* = 0,02) (Tablica 11.).

Tablica 11. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s HER2-negativnim karcinomom dojke

HER2 negativan	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					†
≤ 50	34	145 (100 – 190)	0	- 30 do 20	0,86
> 50	108	140 (100 – 190)			
ER					
0	49	120 (80 – 190)	20	0 do 50	0,08
1	94	155 (100 – 190)			
PR					
0	59	130 (80 – 200)	10	- 10 do 40	0,38
1	84	150 (100 – 190)			
Ki67					
0	49	160 (100 – 190)	- 10	- 40 do 10	0,44
≥ 20 %	94	130 (100 – 190)			
Histotip					
Invasive carcinoma	124	130 (100 – 190)	30	0 do 60	0,11
in situ + invasive carcinoma	19	180 (135 – 200)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	89	160 (110 – 193)	H = 3,4		**0,02**†‡
T2 (2,1 – 5 cm)	49	110 (80 – 165)	df = 3		
T3 (> 5 cm)	4	195 (155 – 220)			
Veličina tumora (T)					

0 – 2 cm	89	160 (110 – 193)	- 20	- 50 do 0	0,06
> 2 cm	53	120 (80 – 180)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	138	140 (100 – 190)	50	-	0,12
> 5 cm	4	195 (155 – 220)			
N					
N0	89	130 (100 – 190)			
N1	40	150 (85 – 195)	H = 3,4		0,79†
N2	7	200 (103 – 200)	df = 3		
N3	6	135 (90 – 170)			
N					
N0	89	130 (100 – 190)	0	- 20 do 30	0,82
svi ostali	53	150 (90 – 200)			
N					
N1	40	150 (85 – 195)	0	- 50 do 60	0,69
N2 + N3	13	150 (98 – 200)			
M					
M0	143	140 (100 – 190)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	94	140 (100 – 190)	0	- 20 do 20	0,90
1	49	150 (88 – 200)			
Molekularni podtip					
HER2					
LumA	49	170 (108 – 190)	H = 3,1		0,21†
LumB	46	145 (100 – 180)	df = 2		
TNBC	48	120 (80 – 190)			
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	46	145 (100 – 180)	-	-	-
LumB/HER2+	-	-			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)
‡na razini P < 0,05 značajno su manje vrijednosti kod T2 u odnosu na T1, T3

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s HER2-pozitivnim karcinomom dojke nema razlike u ekspresiji proteina SHH u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 12.).

Tablica 12. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s HER2-pozitivnim karcinomom dojke

HER2 pozitivan	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	12	135 (100 – 190)	20	- 10 do 80	0,15
> 50	31	180 (130 – 200)			
ER					
0	16	175 (110 – 200)	- 10	- 40 do 20	0,56
1	27	180 (123 – 190)			
PR					
0	21	180 (100 – 200)	0	- 30 do 30	0,75
1	22	175 (130 – 190)			

Ki67					
0	3	110	40		0,35
≥ 20 %	40	180 (125 – 200)			
Histotip					
Invasive carcinoma	37	180 (128 – 200)	- 20	- 90 do 10	0,15
in situ + invasive carcinoma	6	140 (100 – 180)			
HER2					
Ne	-	-	-	-	-
Da	43	180 (120 – 200)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	17	180 (128 – 200)	H = 1,5		0,48†
T2 (2,1 – 5 cm)	21	160 (100 – 190)	df = 2		
T3 (> 5 cm)	5	180 (135 – 205)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	17	180 (128 – 200)	- 10	- 40 do 20	0,48
> 2 cm	25	165 (120 – 190)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	38	175 (120 – 200)	20	- 40 do 60	0,47
> 5 cm	5	180 (135 – 205)			
N					
N0	24	175 (100 – 190)			
N1	7	170 (123 – 198)	H = 1,5		0,91†
N2	7	180 (108 – 200)	df = 2		
N3	5	180 (135 – 200)			
N					
N0	24	175 (100 – 190)	10	- 30 do 30	0,51
svi ostali	19	180 (123 – 200)			
N					
N1	7	170 (123 – 198)	0	- 50 do 60	0,76
N2 + N3	12	180 (125 – 200)			
M					
M0	41	180 (120 – 200)	- 40		0,42
M1	2	135			
LVI					
0	23	180 (108 – 198)	0	- 50 do 20	0,86
1	20	165 (120 – 200)			
Molekularni podtip					
HER2	16	175 (110 – 200)			
LumA					
LumB	27	180 (123 – 190)	- 10	- 40 do 20	0,56
TNBC					
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	-	-	-	-	-
LumB/HER2+	27	180 (123 – 190)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s HER2 molekularnim podtipom karcinoma dojke u nema razlike u ekspresiji proteina SHH u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 13.).

Tablica 13. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica prema molekularnom podtipu HER2

HER2	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	2	100	85		0,08
> 50	14	185 (160 – 200)			
ER					
0	16	175 (110 – 200)			
1	0				
PR					
0	16	175 (110 – 200)			
1	0				
Ki67					
0	2	150	0		0,81
≥ 20 %	14	175 (120 – 200)			
Histotip					
Invasive carcinoma	16	175 (110 – 200)	-	-	-
in situ + invasive carcinoma	-	-			
HER2					
Ne	-	-	-	-	-
Da	16	175 (110 – 200)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	8	185 (135 – 200)			
T2 (2,1 – 5 cm)	6	140 (100 – 170)	H = 3,3 df = 2		0,19†
T3 (> 5 cm)	2	210 (200 – 220)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	8	185 (135 – 200)	0	- 70 do 70	> 0,99
> 2 cm	8	165 (110 – 210)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	14	170 (100 – 200)	40		0,09
> 5 cm	2	210			
N					
N0	10	165 (100 – 200)			
N1	2	145 (120 – 170)	H = 3,3		0,27†
N2	1	220 (220 – 220)	Df = 2		
N3	3	200 (185 – 200)			
N					
N0	10	165 (100 – 200)	20	- 30 do 100	0,25
svi ostali	6	190 (170 – 200)			
N					
N1	2	145	55		0,06
N2 + N3	4	200 (190 – 210)			
M					
M0	16	175 (110 – 200)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	11	170 (100 – 200)	20	- 50 do 90	0,46
1	5	180 (158 – 205)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s LumA molekularnim podtipom karcinoma dojke u nema razlike u ekspresiji proteina SHH u odnosu na patološka obilježja bolesnica (Tablica 14.).

Tablica 14. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica prema molekularnom podtipu LumA

LumA	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	6	180 (100 – 180)	10	- 50 do 50	0,71
> 50	43	160 (110 – 198)			
ER					
0	0	-			-
1	49	170 (108 – 190)			
PR					
0	7	190 (113 – 200)	- 10	- 90 do 40	0,43
1	42	165 (110 – 190)			
Ki67					
0	47	170 (103 – 190)	0		0,94
≥ 20 %	2	155			
Histotip					
Invasive carcinoma	43	160 (110 – 190)	0	- 70 do 60	0,91
in situ + invasive carcinoma	6	180 (70 – 200)			
HER2					
Ne	49	170 (108 – 190)	-	-	-
Da	-	-			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	39	180 (113 – 198)	H = 2,5 df = 2		0,29†
T2 (2,1 – 5 cm)	9	120 (100 – 158)			
T3 (> 5 cm)	1	190 (190 – 190)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	39	180 (113 – 198)	- 20	- 70 do 20	0,27
> 2 cm	10	125 (100 – 180)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	48	165 (105 – 190)	-	-	-
> 5 cm	1	190			
N					
N0	35	160 (113 – 190)			
N1	13	180 (108 – 200)	H = 1,7 df = 2		0,42†
N2					
N3	1	90 (90 – 90)			
N					
N0	35	160 (113 – 190)	0	- 30 do 50	0,81
svi ostali	14	175 (100 – 200)			
N					
N1	13	180 (108 – 200)	-	-	-
N2 + N3	1	90			
M					
M0	49	170 (108 – 190)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	38	175 (110 – 190)	- 10	- 60 do 30	0,59
1	11	150 (93 – 195)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s LumB molekularnim podtipom karcinoma dojke nema razlike u ekspresiji proteina SHH u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 15.).

Tablica 15. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica prema molekularnom podtipu LumB

LumB	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	23	170 (103 – 200)	- 10	- 40 do 20	0,50
> 50	49	140 (118 – 180)			
ER					
0	1	110	-	-	-
1	72	155 (110 – 190)			
PR					
0	9	180 (95 – 200)	- 10	- 50 do 50	0,67
1	64	150 (110 – 180)			
Ki67					
0	1	80	-	-	-
≥ 20 %	72	155 (110 – 190)			
Histotip					
Invasive carcinoma	54	140 (110 – 190)	10	- 20 do 50	0,50
in situ + invasive carcinoma	19	170 (108 – 195)			
HER2					
Ne	46	145 (100 – 180)	10	- 20 do 40	0,38
Da	27	180 (123 – 190)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	42	145 (110 – 180)	H = 0,7		
T2 (2,1 – 5 cm)	27	160 (108 – 190)	df = 2		0,72†
T3 (> 5 cm)	4	160 (130 – 190)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	42	145 (110 – 180)	10	- 20 do 40	0,43
> 2 cm	31	160 (123 – 190)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	69	150 (108 – 190)	10		0,66
> 5 cm	4	160 (130 – 190)			
N					
N0	37	160 (100 – 180)			
N1	21	150 (115 – 200)	H = 0,7		0,88†
N2	9	180 (108 – 200)	df = 3		
N3	5	140 (120 – 155)			
N					
N0	37	160 (100 – 180)	0	- 30 do 20	0,83
svi ostali	35	150 (120 – 200)			
N					
N1	21	150 (115 – 200)	0	- 40 do 50	0,92
N2 + N3	14	145 (120 – 200)			
M					
M0	71	160 (110 – 190)	- 20		0,63
M1	2	135			
LVI					

0	35	160 (110 – 180)	0	- 30 do 20	0,94
1	38	145 (120 – 200)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s TNBC molekularnim podtipom karcinoma dojke u nema razlike u ekspresiji proteina SHH u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 16.).

Tablica 16. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica prema molekularnom podtipu TNBC

TNBC	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					†
≤ 50	15	110 (63 – 198)	10	- 40 do 60	0,71
> 50	33	120 (80 – 183)			
ER					
0	48	120 (80 – 190)	-	-	-
1	0				
PR					
0	48	120 (80 – 190)	-	-	-
1					
Ki67					
0	2	40	-	-	-
≥ 20 %	46	120 (80 – 190)			
Histotip					
Invasive carcinoma	48	120 (80 – 190)	-	-	-
in situ + invasive carcinoma	-	-			
HER2					
Ne	48	120 (80 – 190)	-	-	-
Da	-	-			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	17	150 (118 – 223)	H = 5,5		0,07†
T2 (2,1 – 5 cm)	28	100 (75 – 140)	df = 2		
T3 (> 5 cm)	2	180 (120 - 240)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	17	150 (118 – 223)	- 50	- 100 do 0	0,05
> 2 cm	30	105 (80* - 140)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	45	120 (80 – 190)	45	-	0,33
> 5 cm	2	180			
N					
N0	31	120 (80 – 173)			
N1	11	100 (65 – 183)	H = 0,68		0,88†
N2	4	150 (85 – 250)	df = 3		
N3	2	125 (10 – 240)			
N					
N0	31	120 (80 – 173)	- 10	- 50 do 50	0,80
svi ostali	17	100 (68 – 205)			
N					
N1	11	100 (65 – 183)	20	- 80 do 150	0,58

N2 + N3	6	150 (70 – 240)			
M					
M0	48	120 (80 – 190)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	33	120 (80 – 160)	10	- 30 do 70	0,66
1	15	120 (73 – 198)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s LumB/HER2-negativnim molekularnim podtipom karcinoma dojke nema razlike u ekspresiji proteina SHH u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 17.).

Tablica 17. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica prema molekularnom podtipu LumB/HER2-negativan

LumB/HER2-	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	P
Dob					†
≤ 50	13	160 (110 – 205)	- 20	- 70 do 20	0,26
> 50	32	135 (100 – 180)			
ER					
0	65	130 (88 – 200)	10	- 10 do 40	0,32
1	94	155 (100 – 190)			
PR					
0	75	140 (100 – 200)	0	- 20 do 30	0,77
1	84	150 (100 – 190)			
Ki67					
0	51	160 (100 – 190)	0	- 30 do 20	0,65
≥ 20 %	108	140 (100 – 195)			
Histotip					
Invasive carcinoma	33	130 (100 – 180)	40	0 do 80	0,08
in situ + invasive carcinoma	13	170 (145 – 200)			
HER2					
Ne	46	145 (100 – 180)	-	-	-
Da	-	-			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	33	130 (100 – 180)	H = 1,8 df = 2		0,40†
T2 (2,1 – 5 cm)	12	155 (120 – 190)			
T3 (> 5 cm)	1	200 (200 – 200)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	33	130 (100 – 180)	20	- 20 do 70	0,32
> 2 cm	13	160 (130 – 200)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	45	140 (100 – 180)	-	-	-
> 5 cm	1	200			
N					
N0	23	130 (100 - 180)			
N1	16	145 (75 - 190)	H = 0,9		0,84†
N2	3	200 (133 - 200)	df = 3		
N3	3	150 (128 - 165)			
N					

N0	23	130 (100 - 180)	5	- 40 do 40	0,72
svi ostali	22	150 (110 – 200)			
N					
N1	16	145 (75 – 190)	15	- 40 do 90	0,63
N2 + N3	6	160 (120 – 200)			
M					
M0	46	145 (100 – 180)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	23	140 (103 – 180)	0	- 40 do 40	0,82
1	23	150 (105 – 200)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s LumB/HER2-pozitivnim molekularnim podtipom karcinoma dojke nema razlike u ekspresiji proteina SHH u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 18.).

Tablica 18. Razlike u SHH IRS u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica prema molekularnom podtipu LumB/HER2-pozitivan

LumB/HER2+	n	Medijan (IQR) **SHH IRS**	Razlika	95 % CI	P
Dob					
≤ 50	10	175 (100 – 200)	10	- 40 do 80	0,69
> 50	17	180 (130 – 190)			
ER					
0	64	130 (85 – 200)	10	- 10 do 40	0,21
1	76	170 (115 – 190)			
PR					
0	76	135 (85 – 200)	10	- 10 do 40	0,34
1	64	170 (120 – 190)			
Ki67					
0	52	160 (100 – 190)	0	- 20 do 20	0,93
≥ 20 %	88	140 (100 – 195)			
Histotip					
Invasive carcinoma	21	180 (130 – 200)	- 20	- 90 do 20	0,17
in situ + invasive carcinoma	6	140 (100 – 180)			
HER2					
Ne	-	-	-	-	-
Da	27	180 (123 – 190)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	9	180 (128 – 200)	H = 0,6		
T2 (2,1 – 5 cm)	15	170 (108 – 190)	df = 2		0,73†
T3 (> 5 cm)	3	140 (125 – 170)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	9	180 (128 – 200)	- 10	- 50 do 30	0,53
> 2 cm	18	165 (120 – 190)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	24	180 (125 – 195)	- 15		0,53
> 5 cm	3	140			
N					

N0	14	180 (130 – 180)			
N1	5	190 (128 – 200)	H = 1,6		0,67†
N2	6	155 (100 – 200)	df = 3		
N3	2	130 (120 – 140)			
N					
N0	14	180 (130 – 180)	0	- 50 do 20	0,98
svi ostali	13	140 (120 – 200)			
N					
N1	5	190 (128 – 200)	- 20	- 80 do 20	0,37
N2 + N3	8	135 (110 – 190)			
M					
M0	25	180 (120 – 193)	- 40		0,45
M1	2	135			
LVI					
0	12	180 (150 – 185)	- 15	- 60 do 20	0,59
1	15	140 (120 – 198)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako je nuklearna ekspresija receptora androgena značajno veća u estrogen-pozitivnih (P < 0,001) i progesteron-pozitivnih (P < 0,001) tumora, odnosno u luminalnim molekularnim podtipovima (P < 0,001), u karcinoma miješanog histotipa u odnosu na one kod kojih je prisutan samo invazivni histotip (P = 0,01) te kod manjih tumora (P = 0,007) (Tablica 19.).

Tablica 19. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica

Sve bolesnice	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	P^*
Dob				
≤ 50	70 (20 – 90)	10	0 do 20	0,09
> 50	80 (50 – 90)			
ER				
0	20 (0 – 70)	58	40 - 70	**< 0,001**
1	90 (70 – 100)			
PR				
0	50 (2 – 90)	40	20 - 50	**< 0,001**
1	90 (70 – 100)			
Ki67				
0	117,8 (75 – 100)	- 10	- 20 – (- 10)	**0,0001**
> 20 %	84 (20 – 90)			
Histotip				
Invasive carcinoma	80 (40 – 90)	10	0 do 20	**0,01**
in situ + invasive carcinoma	90 (70 – 100)			
HER2				
Ne	80 (40 – 100)	0	- 10 do 10	0,78
Da	80 (60 – 90)			
Veličina tumora (T)				
T1 (0 – 2 cm)	90 (60 – 100)	H = 9,8		**0,007†‡**
T2 (2,1 – 5 cm)	70 (20 – 90)	df = 2		
T3 (> 5 cm)	60 (33 – 83)			
Veličina tumora (T)				

0 – 2 cm	90 (60 – 100)	- 10	-20 do 0	**0,002**
> 2 cm	70 (20 – 90)			
Veličina tumora (T)				
0 – 5 cm	80 (50 – 95)	- 10	- 30 do 0	0,12
> 5 cm	60 (33 – 83)			
N				
N0	80 (40 – 100)			
N1	80 (53 – 90)	H = 0,09		0,99
N2	80 (50 – 100)	df = 3		
N3	80 (63 – 90)			
N				
N0	80 (40 – 100)	0	- 10 do 10	0,97
svi ostali	80 (55 – 90)			
N				
N1	80 (53 – 90)	0	- 10 do 10	0,98
N2 + N3	80 (58 – 90)			
M				
M0	80 (50 – 90)	- 20	-	0,45
M1	65 (n = 2)			
LVI				
0	80 (40 – 90)	0	0 do 10	0,34
1	80 (58 – 93)			
Molekularni podtip				
HER2	65 (40 – 85)			
LumA	90 (80 – 100)	H = 63,4		**< 0,001†§**
LumB	90 (70 – 100)	df = 3		
TNBC	10 (0 – 50)			
Molekularni podtip				
LumB/HER2-	90 (80 – 100)	0	- 10 do 0	0,20
LumB/HER2+	80 (63 – 90)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)
‡na razini P < 0,05 značajno su više vrijednosti T1 u odnosu na ostale
§na razini P < 0,05 značajne su razlike HER2 u odnosu na sve ostale; LumA vs. TNBC

Statistička analiza pokazala je kako je kod estrogen receptor negativnih tumora nuklearna ekspresija receptora androgena značajno viša u HER2-pozitivnih karcinoma (*P* = 0,002) te u HER2 molekularnom podtipu (*P* = 0,006) (Tablica 20).

Tablica 20. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica oboljelih od estrogen-negativnog karcinoma dojke

E0	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob				
≤ 50	10 (0 – 43)	12,5	0 do 40	0,09
> 50	35 (0,5 – 80)			
PR				
0	20 (0 – 70)	-	-	-
1	20 (n = 1)			
Ki67				
0	60 (25 – 90)	- 20		0,17

> 20 %	20 (0 – 70)			
Histotip				
Invasive carcinoma	20 (0 – 70)	-	-	-
in situ + invasive carcinoma	-			
HER2				
Ne	10 (0 – 50)	40	20 do 60	**0,002**
Da	65 (40 – 85)			
Veličina tumora (T)				
T1 (0 – 2 cm)	40 (0 – 80)	H = 0,24		
T2 (2,1 – 5 cm)	15 (2 – 70)	df = 2		0,89†
T3 (> 5 cm)	50 (20 – 65)			
Veličina tumora (T)				
0 – 2 cm	40 (0 – 80)	0	- 20 do 10	0,71
> 2 cm	20 (2 – 70)			
Veličina tumora (T)				
0 – 5 cm	20 (0,5 – 75)	0	-	0,82
> 5 cm	50 (20 – 65)			
N				
N0	20 (0 – 70)			
N1	5 (0 – 55)	H = 4,3		0,23†
N2	50 (8 – 70)	df = 3		
N3	70 (40 – 83)			
N				
N0	20 (0 – 70)	0	- 10 do 20	0,78
svi ostali	30 (1 – 70)			
N				
N1	5 (0 – 55)	25	0 do 60	0,06
N2 + N3	55 (10 – 80)			
M				
M0	20 (0 – 70)	-	-	-
M1	-			
LVI				
0	20 (0 – 70)	0	- 10 do 10	0,84
1	20 (1 – 75)			
Molekularni podtip				
HER2	65 (40 – 85)			
LumA	-	H = 10,1		**0,006†‡**
LumB	20 (20 – 20)	df = 2		
TNBC	10 (0 – 50)			
Molekularni podtip				
LumB/HER2-	20 (20 – 20)	-	-	-
LumB/HER2+	-			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)
‡na razini P < 0,05 značajno su više vrijednosti LumA u odnosu na TNBC

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s estrogen-pozitivnim karcinomom nema statistički značajne razlike u ekspresiji receptora androgena u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 21.).

Tablica 21. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica oboljelih od estrogen-pozitivnog karcinoma dojke

E1	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob				
≤ 50	90 (70 – 100)	0	0 do 10	0,50
> 50	90 (80 – 100)			
PR				
0	90 (85 – 100)	0	- 10 do 10	0,62
1	90 (70 – 100)			
Ki67				
0	90 (80 – 100)	0	- 10 do 0	0,27
> 20 %	90 (70 – 100)			
Histotip				
Invasive carcinoma	90 (75 – 100)	0	0 do 10	0,70
in situ + invasive carcinoma	90 (70 – 100)			
HER2				
Ne	90 (80 – 100)	- 10	- 10 do 0	0,06
Da	80 (63 – 90)			
Veličina tumora (T)				
T1 (0 – 2 cm)	90 (80 – 100)	H = 3,4 df = 2		0,18†
T2 (2,1 – 5 cm)	90 (70 – 100)			
T3 (> 5 cm)	80 (48 – 90)			
Veličina tumora (T)				
0 – 2 cm	90 (80 – 100)	0	- 10 do 0	0,18
> 2 cm	90 (70 - 93)			
Veličina tumora (T)				
0 – 5 cm	90 (75 – 100)	- 10	- 40 do 0	0,11
> 5 cm	80 (48 – 90)			
N				
N0	90 (73 – 100)	H = 0,9 df = 3		0,82†
N1	90 (80 – 90)			
N2	90 (70 – 100)			
N3	85 (70 – 90)			
N				
N0	90 (73 – 100)	0	- 10 do 0	0,43
svi ostali	90 (78 – 93)			
N				
N1	90 (80 – 90)	0	- 10 do 10	0,88
N2 + N3	90 (70 – 98)			
M				
M0	90 (80 – 100)	- 20	-	0,08
M1	65 (n = 2)			
LVI				
0	90 (70 – 100)	0	0 do 10	0,82
1	90 (78 – 100)			
Molekularni podtip				
HER2	-	0	- 10 do 0	0,18
LumA	90 (80 – 100)			
LumB	90 (70 – 100)			
TNBC	-			
Molekularni podtip				
LumB/HER2-	90 (80 – 100)	- 10	- 10 do 0	0,15
LumB/HER2+	90 (70 – 100)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako je kod pacijentica s karcinomom bez ekspresije receptora progesterona ekspresija receptora androgena značajno veća u estrogen-pozitivnim karcinomima (*P* < 0,001), onima kojima je Ki67 < 20 (*P* = 0,007), zatim karcinomima miješanog histotipa (*P* = 0,02), kod HER2-pozitivnih karcinoma (*P* = 0,007), kod N2 i N3 karcinoma sa četiri ili više zahvaćenih limfnih čvorova (*P* = 0,03), a značajno niža u TNBC molekularnom podtipu karcinoma (*P* < 0,001) (Tablica 22.).

Tablica 22. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica oboljelih od progesteron-negativnog karcinoma dojke

PR0	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	21	10 (1,5 – 50)	10	0 do 40	0,12
> 50	59	60 (2,8 – 90)			
ER					
0	64	20 (0 – 70)	50	30 - 80	**< 0,001**
1	16	90 (85 – 100)			
Ki67					
0	11	90 (58 – 98)	- 40	- 70 do -10	**0,007**
> 20	69	40 (10 – 83)			
Histotip					
Invasive carcinoma	77	40 (2 – 90)	50	-	**0,02**
in situ + invasive carcinoma	3	100			
HER2					
Ne	59	20 (0 – 88)	30	10 do 58	**0,007**
Da	21	70 (48 – 90)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	38	65 (10 – 90)	H = 3,1		
T2 (2,1 – 5 cm)	36	20 (2 – 75)	df = 2		0,20†
T3 (> 5 cm)	5	60 (30 – 75)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	38	65 (10 – 90)	- 10	- 40 do 0	0,09
> 2 cm	41	20 (2 – 73)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	74	50 (2 – 90)	0	- 30 do 50	0,94
> 5 cm	5	60 (30 – 75)			
N					
N0	49	40 (2 – 90)			
N1	17	30 (0 – 75)	H = 5,2		0,15†
N2	9	90 (40 – 100)	df = 3		
N3	5	70 (40 – 83)			
N					
N0	49	40 (2 – 90)	0	- 10 do 20	0,56
svi ostali	31	50 (6,3 – 90)			
N					
N1	17	30 (0 – 75)	30	0 do 60	**0,03**
N2 + N3	14	75 (50 – 90)			
M					
M0	80	50 (2 – 90)	-	-	-

M1	-	-			
LVI					
0	56	45 (2 – 90)	0	- 18 do 10	0,97
1	24	50 (4 – 90)			
Molekularni podtip					
HER2	16	65 (40 – 85)	H = 26,6 df = 3		**< 0,001**†‡
LumA	7	90 (73 – 98)			
LumB	9	90 (83 – 100)			
TNBC	48	10 (0 – 50)			
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	4	90 (70 – 95)	0	-	0,60
LumB/HER2+	5	90 (83 – 100)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)
‡na razini P < 0,05 značajno su niže vrijednosti TNBC u odnosu na sve ostale

Statistička analiza pokazala je kako je kod pacijentica s karcinomom s eksprimiranim receptorom progesterona ekspresija receptora androgena značajno niža u karcinoma s pozitivnim receptorom HER2 (*P* = 0,03) (Tablica 23.).

Tablica 23. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica oboljelih od progesteron-pozitivnog karcinoma dojke

PR1	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	25	90 (70 – 100)	0	0 do 10	0,44
> 50	80	90 (80 – 100)			
ER					
0	1	20			-
1	105	90 (70 – 100)			
Ki67					
0	41	90 (78 – 110)	0	- 10 do 0	0,19
> 20	65	90 (70 – 100)			
Histotip					
Invasive carcinoma	84	90 (70 – 100)	0	- 10 do 10	0,96
in situ + invasive carcinoma	22	90 (70 – 100)			
HER2					
Ne	84	90 (80 – 100)	- 10	- 20 do 0	**0,03**
Da	22	80 (60 – 90)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	68	90 (80 – 100)	H = 4,2 df = 2		0,12†
T2 (2,1 – 5 cm)	34	85 (70 – 100)			
T3 (> 5 cm)	4	70 (35 – 85)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	68	90 (80 – 100)	0	- 10 do 0	0,15
> 2 cm	38	80 (70 – 90)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	102	90 (70 – 100)	- 20	-	0,07
> 5 cm	4	70 (35 – 85)			
N					
N0	64	90 (70 – 100)	H = 1,9 df = 3		0,60†
N1	30	90 (80 – 100)			

N2	5	70 (55 – 93)			
N3	6	85 (70 – 90)			
N					
N0	64	90 (70 – 100)	0	- 10 do 10	0,61
svi ostali	41	90 (78 – 93)			
N					
N1	30	90 (80 – 100)	- 10	- 20 do 0	0,19
N2 + N3	11	80 (70 – 90)			
M					
M0	104	90 (70 – 100)	- 20		0,08
M1	2	65			
LVI					
0	61	90 (70 – 100)	0	0 do 10	0,72
1	45	90 (78 – 100)			
Molekularni podtip					
HER2					
LumA	42	90 (80 – 100)	0	- 10 do 0	0,12
LumB	64	85 (70 – 100)			
TNBC					
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	42	90 (80 – 100)	- 10	- 20 do 0	0,09
LumB/HER2+	22	80 (60 – 90)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s karcinomom dojke u kojemu je Ki67 manji od 20 % nema razlike u ekspresiji receptora androgena (Tablica 24.).

Tablica 24. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica oboljelih od karcinoma dojke s Ki67 manjim od 20 %

Ki67 < 20 %	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	7	70 (70 – 100)	0	- 10 do 30	0,55
> 50	45	90 (80 – 100)			
ER					
0	4	60 (25 – 90)	20		0,13
1	48	90 (80 – 100)			
PR					
0	11	90 (58 – 98)	0	- 10 do 20	0,36
> 1 50	41	90 (78 – 100)			
Histotip					
Invasive carcinoma	46	90 (80 – 100)	0	- 30 do 10	0,51
in situ + invasive carcinoma	6	80 (70 – 100)			
HER2					
Ne	49	90 (80 – 100)	- 20	-	0,05
Da	3	70			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	39	90 (80 – 100)	H = 1,03 df = 2		0,60†
T2 (2,1 – 5 cm)	12	85 (60 – 100)			
T3 (> 5 cm)	1	90 (90 – 90)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	39	90 (80 – 100)	0	- 20 do 0	0,32
> 2 cm	13	90 (65 – 100)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	51	90 (73 – 100)	-	-	-
> 5 cm	1	90			
N					
N0	37	90 (70 – 100)	H = 1,2 df = 3		0,75†
N1	13	90 (88 – 93)			
N2	1	70 (70 – 70)			
N3	1	90 (90 – 90)			
N					
N0	37	90 (70 – 100)	0	- 10 do 10	0,79
svi ostali	15	90 (83 – 90)			
N					
N1	37	90 (70 – 100)	- 10	-	0,35
N2 + N3	2	80			
M					
M0	52	90 (75 – 100)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	40	90 (70 – 100)	0	- 10 do 10	0,66
1	12	90 (85 – 100)			
Molekularni podtip					
HER2	2	60 (40 – 80)	H = 4,3 df = 3		0,23†
LumA	47	90 (80 – 100)			
LumB	1	70 (70 – 70)			

TNBC	2	55 (10 – 100)			
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	-	-	-	-	-
LumB/HER2+	1	70 (70 – 70)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako je kod pacijentica s karcinomom dojke u kojemu je Ki67 jednak ili veći od 20 % značajno veća ekspresija AR kod estrogen-pozitivnih (P < 0,001) odnosno progesteron-pozitivnih karcinoma (P < 0,001) i u karcinoma miješanog histotipa (*P* = 0,001), a značajno manja u TNBC molekularnom podtipu karcinoma u odnosu na sve ostale molekularne podtipove (P < 0,001) (Tablica 25.).

Tablica 25. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica oboljelih od karcinoma dojke s Ki67 većim ili jednakim od 20 %

Ki67 ≥ 20 %	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	39	60 (10 – 90)	0	- 2 do 20	0,38
> 50	94	80 (30 – 80)			
ER					
0	61	20 (0 – 70)	60	40 do 70	**< 0,001**
1	73	90 (70 – 100)			
PR					
0	69	40 (10 – 83)	40	30 do 60	**< 0,001**
1	65	90 (70 – 100)			
Histotip					
Invasive carcinoma	115	70 (12,5 – 90)	20	10 do 40	**0,001**
in situ + invasive carcinoma	19	90 (80 – 100)			
HER2					
Ne	94	70 (10 – 90)	10	0 do 20	0,13
Da	40	80 (60 – 90)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	67	80 (50 – 90)	H = 4,34		
T2 (2,1 – 5 cm)	58	70 (10 – 90)	df = 2		0,11†
T3 (> 5 cm)	8	60 (25 - 75)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	67	80 (50 – 90)	- 10	- 20 do 0	0,05
> 2 cm	66	70 (10 – 90)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	125	80 (28 – 90)	- 10	- 40 do 10	0,21
> 5 cm	8	60 (25 – 75)			
N					
N0	76	70 (15 – 90)			
N1	34	80 (30 – 90)	H = 1,2		0,76†
N2	13	90 (40 – 100)	df = 3		
N3	10	75 (60 – 90)			
N					
N0	76	70 (15 – 90)	0	- 5 do 10	0,53
svi ostali	57	80 (50 – 90)			

N					
N1	34	70 (15 – 90)	0	- 10 do 20	0,47
N2 + N3	23	80 (53 – 90)			
M					
M0	132	75 (20 – 90)	- 10		0,69
M1	2	65			
LVI					
0	77	70 (18 – 90)	10	0 do 20	0,09
1	57	80 (50 – 90)			
Molekularni podtip					
HER2	14	65 (40 – 90)			
LumA	2	90 (90 – 90)	H = 50,6		**<**
LumB	72	90 (70 – 100)	df = 3		**0,001†‡**
TNBC	46	7,5 (0 – 50)			
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	46	90 (80 – 100)	0	- 10 do 0	0,26
LumB/HER2+	26	85 (60 – 90)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)
‡na razini P < 0,05 značajne su razlike TNBC u odnosu na sve ostale; HER2 u odnosu na LumB, TNBC; LumA u odnosu na TNBC

Statistička analiza pokazala je kako je kod pacijentica s HER2-negativnim karcinomom dojke značajno veća ekspresija AR u karcinoma dijagnosticiranih nakon 50. godine života (*P* = 0,01), u estrogen-pozitivnih (P < 0,001) odnosno progesteron-pozitivnih (P < 0,00) karcinoma, zatim karcinoma kojima je Ki67 < 20 % (P < 0,001), a značajno niža u T2 tumorima u odnosu na T1 i T3 (*P* = 0,02) te značajno niža u TNBC molekularnom podtipu u odnosu na LumA i LumB (P < 0,001) (Tablica 26.).

Tablica 26. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica oboljelih od HER2-negativnog karcinoma dojke

HER2 negativan	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	34	55 (10 – 90)	20	0 do 30	**0,01**
> 50	108	90 (50 – 100)			
ER					
0	49	10 (0 – 50)	70	60 do 80	**< 0,001**
1	94	90 (80 – 100)			
PR					
0	59	20 (0 – 88)	58	40 do 70	**< 0,001**
1	84	90 (80 – 100)			
Ki67					
0	49	90 (80 – 100)	- 20	- 30 do - 10	**< 0,001**
≥ 20 %	94	70 (10 – 90)			
Histotip					
Invasive carcinoma	124	80 (20 – 95)	10	0 do 30	0,05
in situ + invasive carcinoma	19	90 (73 – 100)			
Veličina tumora (T)					

T1 (0 – 2 cm)	89	90 (50 – 100)	H = 7,4 df = 2		**0,02**†‡
T2 (2,1 – 5 cm)	49	70 (8,8 – 90)			
T3 (> 5 cm)	4	80 (35 – 90)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	89	90 (50 – 100)	- 10	- 20 do 0	**0,007**
> 2 cm	53	70 (8,8 – 90)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	138	80 (40 – 100)	- 3,5		0,58
> 5 cm	4	80 (35 – 90)			
N					
N0	89	80 (28 – 100)	H = 0,02 df = 3		0,99†
N1	40	85 (50 – 90)			
N2	7	90 (20 – 98)			
N3	6	80 (70 – 90)			
N					
N0	89	80 (28 – 100)	0	- 10 do 10	0,96
svi ostali	53	90 (50 – 90)			
N					
N1	40	85 (50 – 90)	0	- 18 do 10	0,87
N2 + N3	13	90 (40 – 93)			
M					
M0	143	80 (40 – 100)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	94	80 (30 – 100)	0	0 do 10	0,47
1	49	90 (50 – 100)			
Molekularni podtip					
HER2					
LumA	49	90 (80 – 100)	H = 0,02 df = 3		**<**
LumB	46	90 (80 – 100)			**0,001**†§
TNBC	48	10 (0 – 50)			
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	46	90 (80 – 100)	-	-	-
LumB/HER2+	-	-			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)
‡na razini P < 0,05 značajne su razlike T1 u odnosu na T2
§na razini P < 0,05 značajne su razlike TNBC u odnosu na LumA, LumB

Statistička analiza pokazala je kako je kod pacijentica s HER2 pozitivnim karcinomom dojke značajno veća ekspresija AR u estrogen-pozitivnih (*P* = 0,03) karcinoma, odnosno u LumB molekularnom podtipu u odnosu na HER2 molekularni podtip (*P* = 0,03), a značajno niža u velikih tumora (*P* = 0,04) (Tablica 27.).

Tablica 27. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica oboljelih od HER2-pozitivnog karcinoma dojke

HER2 pozitivan	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	12	90 (65 – 95)	- 10	- 30 do 0	0,09
> 50	31	70 (60 – 90)			

ER					
0	16	65 (40 – 85)	15	0 do 30	**0,03**
1	27	80 (63 – 90)			
PR					
0	21	70 (48 – 90)	10	- 10 do 20	0,32
1	22	80 (60 – 90)			
Ki67					
0	3	70	10		0,40
≥ 20 %	40	80 (60 – 90)			
Histotip					
Invasive carcinoma					0,21
in situ + invasive carcinoma	6	95 (60 – 100)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	17	90 (68 – 90)	H = 5,2		0,08†
T2 (2,1 – 5 cm)	21	70 (60 – 90)	df = 2		
T3 (> 5 cm)	5	60 (33 – 65)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	17	90 (68 – 90)	- 10	- 30 do 0	0,13
> 2 cm	26	70 (60 – 90)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	38	80 (60 – 90)	- 30	- 50 do 0	**0,04**
> 5 cm	5	60 (33 – 65)			
N					
N0	24	75 (60 – 70)			
N1	7	80 (63 – 88)	H = 0,3		0,96†
N2	7	70 (63 – 98)	df = 3		
N3	5	80 (58 – 83)			
N					
N0	24	75 (60 – 70)	0	- 10 do 10	0,84
svi ostali	19	80 (60 – 90)			
N					
N1	7	80 (63 – 88)	0	- 20 do 20	0,93
N2 + N3	12	75 (60 – 90)			
M					
M0	41	80 (60 – 90)	- 10	-	0,43
M1	2	65			
LVI					
0	23	70 (53 – 90)	10	- 10 do 20	0,31
1	20	80 (70 – 90)			
Molekularni podtip					
HER2	16	65 (40 – 85)			
LumA			15	0 do 30	**0,03**
LumB	27	80 (63 – 90)			
TNBC					
Molekularni podtip					
LumB/HER2-	-	-	-	-	-
LumB/HER2+	27	80 (63 – 90)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako je kod pacijentica s HER2 molekularnim podtipom karcinoma dojke značajno manja ekspresija AR u T2 karcinoma dojke (*P* = 0,001) (Tablica 28.).

Tablica 28. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica u skupini bolesnica s molekularnim podtipom HER2

HER2	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	P
Dob					
≤ 50	2	46	14		0,81
> 50	14	65 (40 – 80)			
ER					
0	16	65 (40 – 85)			-
1	-				
PR					
0	16	65 (40 – 85)			-
1	-				
Ki67					
0	2	60	5		0,87
≥ 20 %	14	65 (40 – 90)			
Histotip					
Invasive carcinoma	16	65 (40 – 85)	-	-	-
in situ + invasive carcinoma	-	-			
HER2					
Ne	-	-	-	-	-
Da	16	65 (40 – 85)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	8	85 (75 – 90)			
T2 (2,1 – 5 cm)	6	35 (30 – 60)	H = 0,3 df = 3		**0,001**†‡
T3 (> 5 cm)	2	50 (40 – 60)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	8	85 (75 – 90)	- 40	- 60 do -20	**0,003**
> 2 cm	8	40 (30 – 60)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	14	70 (40 – 90)	- 20	-	0,42
> 5 cm	2	50			
N					
N0	10	65 (40 – 80)			
N1	2	60 (30 – 90)	H = 0,8		0,85†
N2	1	60 (60 – 60)	df = 3		
N3	3	80 (58 – 88)			
N					
N0	10	65 (40 – 80)	10	- 20 do 48	0,55
svi ostali	6	70 (50 – 90)			
N					
N1	2	60 (30 – 90)	10	-	0,81
N2 + N3	4	70 (55 – 85)			
M					
M0	16	65 (40 – 85)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	11	60 (40 – 78)	10	- 20 do 50	0,36
1	5	80 (53 – 90)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

‡na razini P < 0,05 značajno je veći T1 u odnosu na sve ostale

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s LumA molekularnim podtipom karcinoma dojke nema značajne razlike u ekspresiji AR u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 29.).

Tablica 29. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s karcinomom LumA molekularnog podtipa

LumA	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	6	85 (70 – 100)	0	- 10 do 30	0,74
> 50	43	90 (80 – 100)			
ER					
0	-				-
1	49	90 (80 – 100)			
PR					
0	7	90 (83 – 98)	0	- 10 do 10	0,85
1	42	90 (80 – 100)			
Ki67					
0	47	90 (80 – 100)	0		0,87
≥ 20 %	2	90			
Histotip					
Invasive carcinoma	43	90 (80 – 100)	- 10	- 30 do 10	0,38
in situ + invasive carcinoma	6	80 (70 – 100)			
HER2					
Ne	49	90 (80 – 100)	-	-	-
Da	-	-			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	39	90 (80 – 100)	H = 0,06 df = 2		0,97†
T2 (2,1 – 5 cm)	9	90 (78 – 100)			
T3 (> 5 cm)	1	90 (90 – 90)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	39	90 (80 – 100)	0	- 10 do 10	0,81
> 2 cm	10	90 (80 – 100)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	48	90 (80 – 100)	-	-	-
> 5 cm	1	90			
N					
N0	35	90 (80 – 100)	H = 0,13 df = 2		0,94†
N1	13	90 (88 – 93)			
N2	-	-			
N3	1	90 (90 – 90)			
N					
N0	35	90 (80 – 100)	0	- 10 do 10	0,72
svi ostali	14	90 (90 – 90)			
N					
N1	13	90 (88 – 93)	-	-	-
N2 + N3	1	90			
M					
M0	49	90 (80 – 100)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	38	90 (80 – 100)	0	- 10 do 10	0,59
1	11	90 (90 – 100)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s LumB molekularnim podtipom karcinoma dojke nema značajne razlike u ekspresiji AR u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 30.).

Tablica 30. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s karcinomom LumB molekularnog podtipa

LumB	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	23	90 (70 – 98)	0	- 10 do 10	0,99
> 50	49	90 (70 – 100)			
ER					
0	1	20	-	-	-
1	72	90 (70 – 100)			
PR					
0	9	90 (83 – 100)	0	- 20 do 10	0,44
1	64	85 (70 – 100)			
Ki67					
0	1	70	-	-	-
≥ 20 %	72	90 (70 – 100)			
Histotip					
Invasive carcinoma	54	85 (70 – 90)	10	0 do 10	0,17
in situ + invasive carcinoma	19	90 (80 – 100)			
HER2					
Ne	46	90 (80 – 100)	0	- 10 do 0	0,20
Da	27	80 (63 – 90)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	42	90 (70 – 100)	H = 2,8		0,24†
T2 (2,1 – 5 cm)	27	80 (70 – 98)	df = 2		
T3 (> 5 cm)	4	70 (35 – 85)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	42	90 (70 – 100)	0	- 10 do 0	0,37
> 2 cm	31	80 (70 – 90)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	69	90 (70 – 100)	- 15	-	0,10
> 5 cm	4	70 (35 – 85)			
N					
N0	37	90 (70 – 100)			
N1	21	80 (77,5 – 92,5)	H = 0,5		0,92†
N2	9	90 (70 – 100)	df = 3		
N3	5	80 (67,5 – 92,5)			
N					
N0	37	90 (70 – 100)	0	- 10 do 10	0,79
svi ostali	35	90 (70 – 98)			
N					
N1	21	80 (77,5 – 92,5)	0	- 10 do 10	0,97
N2 + N3	14	90 (70 – 100)			
M					

M0	71	90 (70 – 100)	- 20	-	0,10
M1	2	65			
LVI					
0	35	90 (70 – 98)	0	0 do 10	0,54
1	38	90 (70 – 100)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s TNBC molekularnim podtipom karcinoma dojke nema značajne razlike u ekspresiji AR u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 31.).

Tablica 31. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s karcinomom TNBC molekularnog podtipa

TNBC	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	15	10 (0 – 35)	0	- 5 do 30	0,52
> 50	33	10 (0 – 80)			
ER					
0	48	10 (0 – 50)	-	-	-
1	0				
PR					
0	48	10 (0 – 50)	-	-	-
1					
Ki67					
0	2	55	- 10		0,21
≥ 20 %	46	7,5 (0 – 50)			
Histotip					
Invasive carcinoma	48	10 (0 – 50)	-	-	-
in situ + invasive carcinoma	-	-			
HER2					
Ne	48	10 (0 – 50)	-	-	-
Da	-	-			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	17	2 (0 – 43)	H = 1,1		0,57†
T2 (2,1 – 5 cm)	28	10 (0,5 – 75)	df = 2		
T3 (> 5 cm)	2	35 (0 – 70)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	17	2 (0 – 73)	1	- 2 do 20	0,31
> 2 cm	30	10 (0 – 70)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	45	10 (0 – 50)	0		0,91
> 5 cm	2	35			
N					
N0	31	10 (0 – 48)			
N1	11	0 (0 – 43)	H = 2,9		0,40†
N2	4	30 (6 – 75)	df = 3		
N3	2	40 (10 – 70)			
N					
N0	31	10 (0 – 48)	0	- 10 do 10	0,97

svi ostali	17	10 (0 – 55)			
N					
N1	11	0 (0 – 43)	10	- 10 do 70	0,10
N2 + N3	6	30 (10 – 70)			
M					
M0	48	10 (0 – 50)	-	-	-
M1	-	-			
LVI					
0	33	10 (0 – 55)	0	- 10 do 10	0,97
1	15	10 (0 – 50)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s LumB/HER2-negativnim molekularnim podtipom karcinoma dojke nema značajne razlike u ekspresiji AR u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 32.).

Tablica 32. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s karcinomom LumB/HER2-negativnog molekularnog podtipa

LumB/HER2-	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	13	80 (70 – 93)	0	0 do 20	0,31
> 50	32	90 (80 – 100)			
ER					
0	1	20			-
1	45	90 (80 – 100)			
PR					
0	4	90 (70 – 95)	0		0,98
1	42	90 (80 – 100)			
Ki67					
0					--
≥ 20 %	46	90 (80 – 90)			
HER2					
Ne	46	90 (80 – 100)			
Da					
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	33	90 (78 – 100)	H = 0,4		
T2 (2,1 – 5 cm)	12	80 (75 – 95)	df = 2		0,82†
T3 (> 5 cm)	1	90 (90 – 90)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	33	90 (78 – 100)	0	- 10 do 10	0,60
> 2 cm	13	80 (78 – 93)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	45	90 (78 – 100)	-	-	-
> 5 cm	1	90			
N					
N0	23	90 (73 - 100)			
N1	16	90 (80 - 100)	H = 0,9		0,84†
N2	3	90 (90 - 98)	df = 3		
N3	3	90 (75 - 98)			

N					
N0	23	90 (73 - 100)	0	- 10 do 10	0,64
svi ostali	22	90 (80 - 100)			
N					
N1	16	90 (80 - 100)	0	- 10 do 20	0,54
N2 + N3	6	90 (90 – 100)			
M					
M0	46	90 (80 – 100)			
M1	-	-			
LVI					
0	23	80 (73 – 98)	0	0 do 10	0,30
1	23	90 (80 – 100)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

Statistička analiza pokazala je kako kod pacijentica s LumB/HER2+ molekularnim podtipom karcinoma dojke nema značajne razlike u ekspresiji AR u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica (Tablica 33.).

Tablica 33. Razlike u AR % jezgre u odnosu na kliničko-patološka obilježja bolesnica s karcinomom LumB/HER2-pozitivnog molekularnog podtipa

LumB/HER2+	n	Medijan (IQR) **AR % jezgre**	Razlika	95 % CI	*P**
Dob					
≤ 50	10	90 (70 – 100)	- 10	- 30 do 0	0,20
> 50	17	80 (60 – 90)			
ER					
0	-				
1	27	80 (63 – 90)			
PR					
0	5	90 (83 – 100)	- 10	- 30 do 10	0,20
1	22	80 (60 – 90)			
Ki67					
0	1	70			-
≥ 20 %	26	85 (60 – 90)			
HER2					
Ne	--	-	-	-	-
Da	27	80 (63 – 90)			
Veličina tumora (T)					
T1 (0 – 2 cm)	9	90 (60 – 93)	H = 3,4		
T2 (2,1 – 5 cm)	15	90 (70 – 98)	df = 2		0,18†
T3 (> 5 cm)	3	60 (23 – 75)			
Veličina tumora (T)					
0 – 2 cm	9	90 (60 – 93)	0	- 20 do 10	0,92
> 2 cm	18	80 (70 – 90)			
Veličina tumora (T)					
0 – 5 cm	24	90 (70 – 95)	- 30		0,07
> 5 cm	3	60			
N					
N0	14	90 (60 - 100)	H = 1,7		0,64†
N1	5	80 (68 - 83)	df = 3		

N2	6	80 (70 - 100)			
N3	2	70 (60 - 80)			
N					
N0	14	90 (60 - 100)	- 10	- 20 do 10	0,36
svi ostali	13	80 (68 – 90)			
N					
N1	5	80 (68 - 83)	0	- 20 do 20	0,88
N2 + N3	8	75 (65 – 95)			
M					
M0	25	90 (68 – 93)	- 20		0,20
M1	2	65			
LVI					
0	12	90 (60 – 95)	0	- 20 do 20	0,98
1	15	80 (70 – 90)			

IQR – interkvartilni raspon; *Mann Whitney U test; †Kruskal Wallis test (Post hoc Conover)

5.4. Korelacija između ekspresije receptora androgena i proteina sonic hedgehog

Analiza korelacija pokazala je kako nema statistički značajne povezanosti između ekspresije AR i SHH u pojedinim molekularnim podtipovima karcinoma dojke te u odnosu na kliničko-patološko obilježje (Tablica 34.).

Tablica 34. Povezanost između ekspresije AR i SHH u pojedinim molekularnim podtipovima karcinoma dojke te u odnosu na kliničko-patološko obilježje

Kliničko-patološko obilježje / Molekularni podtip	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)
Svi uzorci	0,079 (0,29)
Invazivni tumor	0,106 (0,18)
Tumor in situ + invazivni	- 0,131 (0,53)
ER = 0	0,111 (0,38)
ER = 1	0,018 (0,85)
PR = 0	0,108 (0,34)
PR = 1	0,036 (0,72)
Ki67 < 20 %	0,137 (0,33)
Ki67 ≥ 20 %	0,067 (0,44)
HER2 = 0	0,106 (0,21)
HER2 = 1	- 0,056 (0,72)
LumA	0,116 (0,43)
LumB	- 0,048 (0,69)
HER2	0,112 (0,68)
TNBC	- 0,017 (0,91)
LumB/HER2-	- 0,02 (0,90)
LumB/HER2+	- 0,076 (0,71)

5.5. Utjecaj kliničkih parametara i ekspresije SHH i AR na ishod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima karcinoma dojke

Analiza površine ispod krivulje ROC korištena je za određivanje vrijednosti ekspresije SHH i AR na osnovi kojih su pacijentice grupirane u kategorije niske i visoke ekspresije (Tablica 35).

Tablica 35. Rezultati analize površine ispod krivulje ROC

SHH	AUC	95 % CI	Senzitivnost	Specifičnost	Granična vrijednost	Youdenov indeks	P
Ishod	0,565	0,491 - 0,638	37,89	72,1	> 180	0,099	0,18
Recidiv	0,542	0,467 - 0,615	25,0	93,2	> 230	0,182	0,73
Metastaze	0,516	0,442 - 0,590	36,8	46,4	> 140	0,168	0,82
AR	AUC	95 % CI	Senzitivnost	Specifičnost	Granična vrijednost	Youdenov indeks	P
Ishod	0,540	0,465 – 0,613	62,2	47,9	≤ 80	0,101	0,40
Recidiv	0,662	0,589 - 0,730	62,5	81,4	≤ 30	0,439	0,17
Metastaze	0,572	0,497 – 0,644	68,4	59,6	≤ 70	0,281	0,32

AUC - površina ispod krivulje operativnih karakteristika; CI – interval pouzdanosti

5.5.1. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s pojavom smrti, recidiva i metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke

Statistička analiza pokazala je kako češće umiru pacijentice koje kasnije obole(P = 0,004), imaju veće tumore (P = 0,001) i koje imaju više pozitivnih limfnih čvorova (P = 0,01) (Tablica 36).

Tablica 36. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s pojavom smrti kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke

Sve bolesnice	Broj (%) bolesnica prema ishodu			P*
	Preživjela	Umrla	Ukupno	
Dob				
≤ 50	42 (30)	4 (9)	46 (25)	**0,004**
> 50	97 (70)	41 (91)	138 (75)	
ER				
0	43 (31)	21 (47)	64 (35)	0,05
1	97 (69)	24 (53)	121 (65)	
PR				
0	55 (39)	24 (53)	79 (43)	0,09

1	85 (61)	21 (47)	106 (57)	
Ki67				
0	38 (27)	14 (31)	52 (28)	0,61
> 20 %	102 (73)	31 (69)	133 (72)	
HER2				
Ne	106 (76)	36 (80)	142 (77)	0,55
Da	34 (24)	9 (20)	43 (23)	
Veličina tumora (T)				
T1 (0 – 2 cm)	90 (64)	16 (36)	106 (57)	**< 0,001**
T2 (2,1 – 5 cm)	48 (34)	22 (49)	70 (38)	
T3 (> 5 cm)	2 (1)	7 (16)	9 (5)	
AR				
≤ 80	73 (52)	28 (62)	101 (55)	0,24
> 80	67 (48)	17 (38)	84 (45)	
SHH				
≤ 180	101 (72)	28 (62)	129 (70)	0,21
> 180	39 (28)	17 (38)	56 (30)	
N				
N0	93 (67)	20 (44)	113 (61)	**0,01**
N1	33 (24)	13 (29)	46 (25)	
N2	8 (6)	6 (13)	14 (8)	
N3	5 (4)	6 (13)	11 (6)	
M				
M0	140 (100)	43 (96)	183 (99)	0,06
M1	0	2 (4)	2 (1)	
LVI				
0	91 (65)	25 (56)	116 (63)	0,25
1	49 (35)	20 (44)	69 (37)	
Molekularni podtip				
HER2	11 (8)	5 (11)	16 (9)	0,15
LumA	37 (26)	12 (27)	49 (26)	
LumB	61 (44)	12 (27)	73 (39)	
TNBC	31 (22)	16 (36)	47 (25)	
Molekularni podtip				
LumB/HER2-	38 (62)	8 (67)	46 (63)	0,77
LumB/HER2+	23 (38)	4 (33)	27 (37)	

*χ^2 test

Statistička analiza pokazala je kako pacijentice s estrogen-negativnim karcinomom dojke (P = 0,02) i s manjom ekspresijom receptora androgena (P = 0,01) češće razvijaju recidiv (Tablica 37.).

Tablica 37. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s pojavom recidiva kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke

Sve bolesnice	Broj (%) bolesnica prema recidivu			P*
	Bez	Recidiv	Ukupno	
Dob				
≤ 50	43 (24)	3 (38)	46 (25)	0,40
> 50	133 (76)	5 (63)	138 (75)	
ER				

0	58 (33)	6 (75)	64 (35)	**0,02**
1	119 (67)	2 (25)	121 (65)	
PR				
0	73 (41)	6 (75)	79 (43)	0,08
1	104 (59)	2 (25)	106 (57)	
Ki67				
0	51 (29)	1 (13)	52 (28)	0,45
> 20 %	126 (71)	7 (88)	133 (72)	
HER2				
Ne	135 (76)	7 (88)	142 (77)	0,68
Da	42 (24)	1 (13)	43 (23)	
Veličina tumora (T)				
T1 (0 – 2 cm)	103 (58)	3 (38)	106 (57)	0,43
T2 (2,1 – 5 cm)	65 (37)	5 (63)	70 (38)	
T3 (> 5 cm)	9 (5)	0	9 (5)	
AR				
≤ 30	33 (19)	5 (63)	38 (21)	**0,01**
> 30	144 (81)	3 (38)	147 (79)	
SHH				
≤ 230	165 (93)	6 (75)	171 (92)	0,12
> 230	12 (7)	2 (25)	14 (8)	
N				
N0	110 (63)	3 (38)	113 (61)	0,25
N1	42 (24)	4 (50)	46 (25)	
N2	13 (7)	1 (13)	14 (8)	
N3	11 (6)	0	11 (6)	
M				
M0	175 (99)	8 (100)	183 (99)	> 0,99
M1	2 (1)	0	2 (1)	
LVI				
0	111 (63)	5 (63)	116 (63)	> 0,99
1	66 (37)	3 (38)	69 (37)	
Molekularni podtip				
HER2	15 (8)	1 (13)	16 (9)	0,07
LumA	48 (27)	1 (13)	49 (26)	
LumB	72 (41)	1 (13)	73 (39)	
TNBC	42 (24)	5 (63)	47 (25)	
Molekularni podtip				
LumB/HER2-	45 (63)	1 (100)	46 (63)	> 0,99
LumB/HER2+	27 (38)	0	27 (37)	

*χ^2 test

Statistička analiza pokazala je kako pacijentice s estrogen-negativnim, progesteron-negativnim karcinomom dojke, karcinomom dojke s Ki67 većim ili jednakim od 20 %, T2 karcinomima, karcinomima s manjom ekspresijom receptora androgena, pacijentice sa zahvaćenim limfnim čvorovima i TNBC molekularnim podtipom češće razvijaju metastaze (Tablica 38).

Tablica 38. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s pojavom metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke

Sve bolesnice	Broj (%) bolesnica prema metastazama			P*
	Bez	Metastaze	Ukupno	
Dob				
≤ 50	43 (26)	3 (16)	46 (25)	0,41
> 50	122 (74)	16 (84)	138 (75)	
ER				
0	51 (31)	13 (68)	64 (35)	**0,001**
1	115 (69)	6 (32)	121 (65)	
PR				
0	65 (39)	14 (74)	79 (43)	**0,004**
1	101 (61)	5 (26)	106 (57)	
Ki67				
< 20 %	51 (31)	1 (5)	52 (28)	**0,02**
≥ 20 %	115 (69)	18 (95)	133 (72)	
HER2				
Ne	127 (77)	15 (79)	142 (77)	0,81
Da	39 (23)	4 (21)	43 (23)	
Veličina tumora (T)				
T1 (0 – 2 cm)	102 (61)	4 (21)	106 (57)	**< 0,001**
T2 (2,1 – 5 cm)	59 (36)	11 (58)	70 (38)	
T3 (> 5 cm)	5 (3)	4 (21)	9 (5)	
AR				
≤ 70	67 (40)	13 (68)	80 (43)	**0,02**
> 70	99 (60)	6 (32)	105 (57)	
SHH				
≤ 230	77 (46)	12 (63)	89 (48)	0,23
> 230	89 (54)	7 (37)	96 (52)	
N				
N0	106 (64)	7 (37)	113 (61)	**0,003**
N1	42 (25)	4 (21)	46 (25)	
N2	9 (5)	5 (26)	14 (8)	
N3	8 (5)	3 (16)	11 (6)	
LVI				
0	106 (64)	10 (53)	116 (63)	0,34
1	60 (36)	9 (47)	69 (37)	
Molekularni podtip				
HER2	14 (8)	2 (11)	16 (9)	**0,001**
LumA	49 (30)	0 (0)	49 (26)	
LumB	67 (40)	6 (32)	73 (39)	
TNBC	36 (22)	11 (58)	47 (25)	
Molekularni podtip				
LumB/HER2-	42 (63)	4 (67)	46 (63)	> 0,99
LumB/HER2+	25 (37)	2 (33)	27 (37)	

*χ^2 test

5.5.2. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke

Statistička analiza pokazala je kako bolesnice kojima je bolest dijagnosticirana prije 50. godine života ranije umiru (*P*=0,007). U slučaju estrogen-negativnog karcinoma ranije umiru (P=0,047), razviju recidive (P=0,0104) i metastaze (P=0,001). Također ranije razviju metastaze ukoliko su karcinomi progesteron-negativni (P=0,004), ako im je Ki67 veći ili jednak 20%, ako imaju veće tumore (P<0,0001), ako imaju manju ekspresiju AR (P=0,017), više zahvaćenih limfnih čvorova (P=0,0004), pripadaju TNBC (P=0,001) odnosno LumB/HER2-negativnom molekularnom podtipu (P=0,001). Veći tumori (P<0,0001) odnosno veći broj zahvaćenih limfnih čvorova (P=0,005) također su povezani s ranijim umiranjem, a veća ekspresija Shh s ranijim razvojem recidiva (P=0,022) (Tablica 39.).

Tablica 39. Povezanost kliničko-patoloških parametara, ekspresije proteina SHH i ekspresije AR s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva, odnosno metastaza

		Preživljenje				
		OS		**RFS**		**MFS**	
	Svi ispitanici	AS (mjeseci)		AS (mjeseci)		AS (mjeseci)	*P*
Dob							
	≤ 50	118,4	**0,007**	120,8	0,50	118,9	0,30
	> 50	96,1		116,2		108,4	
ER							
	0	96	**0,047**	115,5	**0,0104**	103,6	**0,001**
	1	108,4		124,6		120,6	
PR							
	0	98,5	0,119	117	0,0523	106,2	**0,004**
	1	108,3		124,4		120,9	
Ki67							
	< 20%	100,1	0,98	114,89	0,27	114,3	**0,018**
	≥ 20%	104,4		120,35		111,3	
HER2							
	Ne	93,9	0,3	107,8	0,44	102,4	0,78
	Da	108		123,4		115,4	
Veličina tumora (T)							
	T1 (0 – 2 cm)	112,9	**<0,0001**	123,5	0,29	122,3	**<0,0001**
	T2 (2,1 – 5 cm)	98,1		117,4		108,1	
	T3 (> 5 cm)	50,2		101		57,9	
AR% jezgra OS (80), RS (30), MS (70)							
	≤	100	0,19	110,7	**0,001**	108,2	**0,017**
	>	103,1		123,9		111,9	

SHH IRS OS (180), RS (230), MS (140)						
≤	107,3	0,23	122,5	**0,022**	110,8	0,18
>	95		98,8		118,2	
N						
N0	109,7	**0,005**	123,5	0,26	119,6	**0,0004**
N1	98		111,4		111,3	
N2	78,8		108,5		80,1	
N3	73,5		111		85,2	
Molekularni podtip						
HER2	102,3	0,14	118,1	0,052	112,6	**0,001**
LumA	93,3		103,1		-	
LumB	109,8		124,6		116,7	
TNBC	86,4		102,2		90,2	
Molekularni podtip						
LumB/ HER2-	89	0,22	99,4	0,9	94,6	**0,003**
LumB/ HER2+	111,1		126		116,6	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

Statistička analiza pokazala je kako pacijentice oboljele nakon 50. godine života (*P* = 0,007), a koje imaju estrogen-negativni (*P* = 0,02), progesteron negativni karcinom (*P* = 0,04), Ki67 veći ili jednak 20 % (*P* = 0,008), manju ekspresiju AR (*P* = 0,005) i SHH (*P* = 0,04) te TNBC molekularni podtip karcinoma dojke (*P* = 0,01) kraće žive. Također, pacijentice oboljele nakon 50. godine života, a koje imaju Ki67 manji od 20 % (*P* = 0,02) ranije razviju recidive, što je također slučaj s pacijenticama oboljelima prije 50. godine života, a koje imaju LumA molekularni podtip karcinoma dojke (*P* = 0,01). Analiza je pokazala kako dob nema utjecaja na trajanje preživljenja do pojave metastaza (Tablica 40.).

Tablica 40. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke

		Preživljenje					
		OS		**RS**		**MS**	
	Dob	AS (mjeseci)	P	AS (mjeseci)	P	AS (mjeseci)	P
Svi ispitanici	≤ 50	118,4	**0,007**	120,8	0,50	118,9	0,30
	> 50	96,1		116,2		108,4	
ER neg	≤ 50	117,9	**0,02**	115,5	0,86	117,8	0,09
	> 50	86,6		110,8		94,7	
ER poz	≤ 50	117,8	0,16	123,7	0,44	119,1	0,64
	> 50	101,2		118,9		115,5	
PR neg	≤ 50	115,5	**0,04**	117,1	0,82	113,7	0,27
	> 50	90,5		112,6		99,5	

PR poz	≤ 50	119,6	0,09	123,4	0,44	122,6	0,77
	> 50	98,3		115,8		111,9	
Ki67 < 20 %	≤ 50	108,7	0,37	108,6	**0,02**	116,0	0,68
	> 50	91,8		104,0		102,3	
Ki67 ≥ 20 %	≤ 50	118,8	**0,008**	121,5	0,83	117,6	0,18
	> 50	94,3		114,2		103,5	
HER2 neg	≤ 50	96,5	0,05	99,1	0,30	96,4	0,66
	> 50	91,0		108,5		101,9	
HER2 poz	≤ 50	126,0	0,05	126,0	0,51	126,0	0,19
	> 50	97,1		116,5		106,1	
AR % jezgra OS (≤ 80), RS (≤ 30), MS (≤ 70)	≤ 50	119,1	**0,005**	111,5	0,93	114,8	0,41
	> 50	89,2		104,1		96,3	
AR % jezgra OS (> 80), RS (> 30), MS (> 70)	≤ 50	107,3	0,35	124,1	0,74	120,1	0,45
	> 50	101,4		118,1		110,4	
SHH IRS OS (≤ 180), RS (≤ 230), MS (≤ 140)	≤ 50	119,3	**0,04**	122,8	0,73	120,0	0,13
	> 50	99,1		116,6		100,9	
SHH IRS OS (> 180), RS (> 230), MS (> 140)	≤ 50	99,2	0,09	54,3	0,44	116,8	0,82
	> 50	90,2		104,4		112,9	
HER2 da	≤ 50	125,0	0,36	125	0,69	125	0,58
	> 50	96,0		112,5		106,5	
LumA da	≤ 50	97,6	0,66	97,3	**0,01**	-	-
	> 50	92,7		104,0		-	
LumB da	≤ 50	119,1	0,21	126,0	0,46	117,3	0,98
	> 50	100,6		117,9		111,1	
TNBC da	≤ 50	94,6	**0,01**	93,7	0,91	94,5	0,08
	> 50	77,8		102,5		83,3	
LumB/HER2- da	≤ 50	91,8	0,77	100,0	0,50	88,6	0,37
	> 50	87,2		98,7		96,7	
LumB/HER2+ da	≤ 50	126,0	0,11	-	-	126,0	0,27
	> 50	97,9		-		105,9	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

Statistička analiza pokazala je kako histološki podtip karcinoma dojke nema utjecaja na trajanje preživljenja (Tablica 41.).

Tablica 41. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke ovisno o histotipu.

		Preživljenje					
		OS		**RS**		**MS**	
	Histotip	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*
Svi ispitanici	IC	102,0	0,09	119,9	0,25	112,5	0,08
	IC+IS	117,6		126,0		126	
ER neg	IC	-	-	-	-	-	-
	IC+IS	-		-		-	

ER poz	IC	13,6	0,20	120,3	0,45	115,6	0,22
	IC+IS	117,6		126,0		126,0	
PR neg	IC	97,6	0,33	116,7	0,61	105,5	0,42
	IC+IS	88		88,0		88,0	
PR poz	IC	103,6	0,27	120,1	0,45	115,9	0,26
	IC+IS	116,3		126,0		126,0	
Ki67 < 20 %	IC	98,6	0,23	114,7	0,70	144,0	0,71
	IC+IS	89,0		89,0		89,0	
Ki67 ≥ 20 %	IC	102,0	0,21	118,5	0,27	108,2	0,08
	IC+IS	113,9		126,0		126,0	
HER2 neg	IC	92,8	0,23	107,2	0,29	101,0	0,12
	IC+IS	83,2		89,0		89,0	
HER2 poz	IC	104,6	0,22	121,9	0,67	112,8	0,40
	IC+IS	126		126,0		126,0	
AR % jezgra OS (≤ 80), RS (≤ 30), MS (≤ 70)	IC	98,1	0,29	110,4	0,72	105,7	0,23
	IC+IS	114,0		66,0		126,0	
AR % jezgra OS (> 80), RS (> 30), MS (> 70)	IC	101,5	0,26	119,7	0,43	110,9	0,28
	IC+IS	86,9		126		88,0	
SHH IRS OS (≤ 180), RS (≤ 230), MS (≤ 140)	IC	105,6	0,36	120,9	0,32	109,5	0,26
	IC+IS	115,1		126,0		89,0	
SHH IRS OS (> 180), RS (> 230), MS (> 140)	IC	91,9	0,12	94,8	0,46	112,9	0,21
	IC+IS	88,0		68,0		126,0	
HER2 da	IC	-	-	-	-	-	-
	IC+IS	-		-		-	
LumA da	IC	91,9	0,24	102,9	0,69	-	-
	IC+IS	89,0		89,0		-	
LumB da	IC	104,8	0,48	120,2	0,54	110,5	0,16
	IC+IS	113,9		126,0		126,0	
TNBC da	IC	-	-	-	-	-	-
	IC+IS	-		-		-	
LumB/HER2- da	IC	88,8	0,91	98,8	0,53	92,6	0,25
	IC+IS	77,7		87,0		87,0	
LumB/HER2+ da	IC	13,7	0,27	-	-	110,4	0,44
	IC+IS	126,0		-		126,0	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

Statistička analiza pokazala je kako bolesnice u kojih je Ki67 veći ili jednak 20 % imaju dulje preživljenje do pojave metastaza (*P* = 0,02), kao i bolesnice kod kojih je Ki67 veći ili jednak 20 %, a oboljele su od HER2-negativnog karcinoma dojke (*P* = 0,01). Također, bolesnice kod kojih je Ki67 veći ili jednak 20 %, a oboljele su od estrogen-pozitivnog karcinoma (*P* = 0,03) ili od karcinoma s većom ekspresijom receptora androgena (*P* = 0,04) imaju kraće preživljenje do pojave metastaza (Tablica 42).

Tablica 42. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke ovisno o Ki67

		Preživljenje					
		OS		**RS**		**MS**	
	Ki-67	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*
Svi ispitanici	< 20 %	104,5	0,98	120,4	0,27	111,4	**0,02**
	≥ 20 %	100,1		114,9		114,3	
ER neg	< 20 %	97,4	0,66	114,3	0,49	103,8	0,88
	≥ 20 %	88,0		102,0		84,5	
ER poz	< 20 %	109,9	0,54	124,6	0,80	117,0	**0,03**
	≥ 20 %	101,3		114,8		116,0	
PR neg	< 20 %	97,9	0,60	115,6	0,28	104,5	0,39
	≥ 20 %	96,7		103,0		96,5	
PR poz	< 20 %	110,7	0,37	124,4	0,76	117,4	0,06
	≥ 20 %	99,6		114,6		116,0	
HER2 neg	< 20 %	92,6	0,62	106,1	0,20	98,1	**0,01**
	≥ 20 %	92,2		103,1		102,4	
HER2 poz	< 20 %	107,8	0,74	123,2	0,78	114,6	0,57
	≥ 20 %	109,0		116,0		116,0	
AR % jezgra OS (≤ 80), RS (≤ 30), MS (≤ 70)	< 20 %	100,1	0,93	117,8	0,20	106,2	0,35
	≥ 20 %	96,4		116,0		109,5	
AR % jezgra OS (> 80), RS (> 30), MS (> 70)	< 20 %	104,3	0,85	115,3	0,77	108,7	**0,04**
	≥ 20 %	93,7		102,7		104,0	
SHH IRS OS (≤ 180), RS (≤ 230), MS (≤ 140)	< 20 %	107,9	0,69	121,2	0,69	107,6	0,16
	≥ 20 %	99,8		114,3		112,0	
SHH IRS OS (> 180), RS (> 230), MS (> 140)	< 20 %	92,3	0,54	111,6	0,16	114,6	0,06
	≥ 20 %	94,9		104,0		104,0	
HER2 da	< 20 %	101,9	0,68	117,1	0,69	110,8	0,58
	≥ 20 %	102,0		102,0		102,0	
LumA da	< 20 %	98,0	0,50	98,0	0,83	-	-
	≥ 20 %	92,9		103,1		-	
LumB da	< 20 %	109,6	0,65	124,6	0,90	-	-
	≥ 20 %	116,0		116,0		-	
TNBC da	< 20 %	86,8	0,61	101,7	0,62	91,2	0,43
	≥ 20 %	67,5		89,0		60,5	
LumB/HER2- da	< 20 %	-	-	-	-	-	-
	≥ 20 %	-		-		-	
LumB/HER2+ da	< 20 %	110,5	0,68	-	-	-	-
	≥ 20 %	116,0		-		-	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

Statistička analiza pokazala je kako bolesnice s estrogen-negativnim karcinomom imaju raniji razvoj recidiva (*P* = 0,01) i metastaza (*P* = 0,03), dok je raniji razvoj recidiva prisutan i kada uz odsutnost receptora estrogena imaju Ki67 veći ili jednak 20 % (*P* = 0,02) ili ako su HER2-negativni (*P* = 0,02). Bolesnice s estrogen-negativnim karcinomom dojke i velikom ekspresijom receptora androgena (*P* = 0,01) i SHH (*P* = 0,01) imaju kraće ukupno preživljenje. Raniji razvoj metastaza prisutan je kod bolesnica s estrogen-negativnim karcinomom gdje je Ki67 manji od 20 % (*P* < 0,001), koji je i HER2-negativan (*P* < 0,001) te kod kojih je prisutna visoka ekspresija receptora androgena (*P* = 0,02) i SHH (*P* < 0,001), dok je u slučaju gdje je Ki67 veći ili jednak 20 % P = 0,05 (Tablica 43).

Tablica 43. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke ovisno o statusu receptora estrogena

		Preživljenje					
		OS		**RS**		**MS**	
	ER	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*
Svi ispitanici	Neg	96,0	0,05	115,01	**0,01**	103,6	**0,001**
	Poz	108,5		124,6		120,6	
PR neg	Neg	95,7	0,23	114,9	0,19	103,3	0,19
	Poz	105,9		120,0		113,1	
PR poz	Neg	66,0	0,72	66	0,88	66,0	0,84
	Poz	108,2		124,4		120,9	
Ki67 < 20 %	Neg	88	0,34	102,0	0,79	84,5	**< 0,001**
	Poz	101,3		114,8		116,0	
Ki67 ≥ 20 %	Neg	97,4	0,06	114,3	**0,02**	103,8	0,05
	Poz	109,9		124,6		116,8	
HER2 neg	Neg	86,9	0,08	102,4	**0,02**	90,8	**< 0,001**
	Poz	92,1		103,0		100,9	
HER2 poz	Neg	102,4	0,26	118,1	0,20	112,6	0,61
	Poz	111,1		126,0		116,7	
AR % jezgra OS (≤ 80), RS (≤ 30), MS (≤ 70)	Neg	97,3	0,59	109,5	0,49	102,8	0,19
	Poz	102,1		89,0		115,1	
AR % jezgra OS (> 80), RS (> 30), MS (> 70)	Neg	78,8	**0,01**	116,0	0,53	95,5	**0,02**
	Poz	105,6		124,6		113,9	
SHH IRS OS (≤ 180), RS (≤ 230), MS (≤ 140)	Neg	104,4	0,53	117,6	0,07	105,5	0,22
	Poz	108,6		124,5		107,5	
SHH IRS OS (> 180), RS (> 230), MS (> 140)	Neg	75,8	**0,01**	82,0	0,13	97,2	**< 0,001**
	Poz	104,2		115,0		124,6	

HER2 da	Neg	-	-	-	-	-	-
	Poz	-		-		-	
LumA da	Neg	-	-	-	-	-	-
	Poz	-		-		-	
LumB da	Neg	66,0	0,70	66	0,90	66,0	0,79
	Poz	109,7		124,6		116,7	
TNBC da	Neg	-	-	-	-	-	-
	Poz	-		-		-	
LumB/HER2- da	Neg	66,0	0,68	66	0,88	66,0	0,79
	Poz	88,8		99,4		94,5	
LumB/HER2+ da	Neg	-	-	-	-	-	-
	Poz	-		-		-	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

Statistička analiza pokazala je kako je u progesteron-negativnih karcinoma prisutan raniji razvoj metastaza (*P* = 0,004), kao i kada su HER2-negativni (*P* < 0,001) odnosno imaju visoku ekspresiju receptora androgena (*P* = 0,03) ili SHH (*P* = 0,007). U slučaju progesteron-negativnih karcinoma koji su LumB/HER2-negativni molekularni podtip, prisutno je kraće ukupno preživljenje (*P* = 0,04) (Tablica 44).

Tablica 44. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke ovisno o statusu receptora progesterona

		Preživljenje					
		OS		**RS**		**MS**	
	PR	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*
Svi ispitanici	Neg	98,5	0,12	117,0	0,05	106,3	**0,004**
	Poz	108,3		124,4		120,9	
ER neg	neg	95,7	0,56	114,9	0,76	103,3	0,62
	poz	66,0		66,0		66,0	
ER poz	neg	105,9	0,79	120,0	0,58	113,1	0,86
	poz	108,2		124,4		120,9	
Ki67 < 20 %	neg	96,7	0,96	103	0,60	96,5	0,06
	poz	99,6		114,5		116,0	
Ki67 ≥ 20 %	neg	97,9	0,05	115,6	0,06	104,5	0,06
	poz	110,7		124,4		117,4	
HER2 neg	neg	87,9	0,08	104,1	0,07	92,6	**< 0,001**
	poz	92,5		102,6		101,7	
HER2 poz	neg	107,6	0,75	119,9	0,32	115,6	0,99
	poz	107,6		126,0		114,5	
AR % jezgra	neg	97,9	0,63	109,1	0,42	103,8	0,27

OS (≤ 80), RS (≤ 30), MS (≤ 70)	poz	101,9		89		114,4	
AR % jezgra	neg	92,1	0,11	117,4	0,91	99,6	**0,03**
OS (> 80), RS (> 30), MS (> 70)	poz	106,3		124,3		114,9	
SHH IRS	neg	104,3	0,50	119,1	0,20	105,2	0,16
OS (≤ 180), RS (≤ 230), MS (≤ 140)	poz	108,9		124,3		18,7	
SHH IRS	neg	86,5	0,13	87,3	0,23	103,4	**0,007**
OS (> 180), RS (> 230), MS (> 140)	poz	100,5		115,0		124,4	
HER2 da	neg	-	-	-	-	-	-
	poz	-		-		-	
LumA da	neg	102,0	0,47	103,0	0,67	-	-
	poz	91,8		102,9		-	
LumB da	neg	99,7	0,67	120,0	0,71	107,8	0,76
	poz	110,5		124,4		117,3	
TNBC da	neg	-	-	-	-	-	-
	poz	-		-		-	
LumB/HER2- da	neg	62,8	**0,04**	97,0	0,78	75,3	0,16
	poz	91,3		99,3		96,2	
LumB/HER2+ da	neg	120	0,31	-	-	120,0	0,49
	poz	107,6		-		114,5	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

Statistička analiza pokazala je kako bolesnice s HER2-negativnim karcinomom dojke i visokom ekspresijom receptora androgena imaju kraće ukupno preživljenje (*P* = 0,02), dok nije pronađen utjecaj HER2 statusa na raniji razvoj recidiva i metastaza (Tablica 45).

Tablica 45. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke ovisno o statusu receptora HER2

		Preživljenje					
		OS		**RS**		**MS**	
	HER2	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*
Svi ispitanici	Neg	93,9	0,31	107,9	0,44	102,5	0,79
	Poz	108,1		123,4		115,4	
ER neg	Neg	86,9	0,45	102,4	0,55	90,8	0,36
	Poz	102,3		118,1		112,6	
ER poz	Neg	92,1	0,35	102,7	0,45	100,9	0,53
	Poz	111,1		126,0		116,7	
PR neg	Neg	87,8	0,21	104,1	0,49	92,6	0,24
	Poz	107,6		119,9		115,6	
PR poz	Neg	92,5	0,71	102,6	0,48	101,7	0,31
	Poz	107,6		126,0		114,5	
Ki67 < 20 %	Neg	92,2	0,84	103,1	0,79	102,4	0,80
	Poz	109,0		116,0		116,0	

Ki67 ≥ 20 %	Neg	92,6	0,43	106,1	0,32	98,1	0,40
	Poz	107,9		123,2		114,6	
AR % jezgra	Neg	91,9	0,72	101,3	0,52	97,8	0,66
OS (≤ 80), RS (≤ 30), MS (≤ 70)	Poz	96,9		99,3		104,5	
AR % jezgra	Neg	91,3	**0,02**	101,9	0,30	98,7	0,18
OS (> 80), RS (> 30), MS (> 70)	Poz	117,0		126,0		117,0	
SHH IRS	Neg	96,9	0,49	108,9	0,65	100,3	0,97
OS (≤ 180), RS (≤ 230), MS (≤ 140)	Poz	108,2		123,3		109,4	
SHH IRS	Neg	81,9	0,41	85,0	0,46	97,7	0,93
OS (> 180), RS (> 230), MS (> 140)	Poz	104,4		115,0		118,8	
HER2 da	Neg	-	-	-	-	-	-
	Poz	-		-		-	
LumA da	Neg	-	-	-	-	-	-
	Poz	-		-		-	
LumB da	Neg	89,0	0,67	99,4	0,45	94,6	0,74
	Poz	111,1		126,0		116,7	
TNBC da	Neg	-	-	-	-	-	-
	Poz	-		-		-	
LumB/HER2- da	Neg	-	-	-	-	-	-
	Poz	-		-		-	
LumB/HER2+ da	Neg	-	-	-	-	-	-
	Poz	-		-		-	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

Statistička analiza pokazala je kako je kod pacijentica s većim tumorima trajanje preživljenja kraće ($P < 0,001$). Također, utjecaj veličine tumora na trajanje preživljenja prisutan je kod pacijentica s estrogen-negativnim ($P = 0,007$), progesteron-negativnim karcinomima ($P = 0,004$), karcinomima kod kojih je Ki67 veći ili jednak 20 % ($P = 0,007$), HER2-negativnim karcinomima ($P = 0,001$), karcinomima s manjom ekspresijom receptora androgena ($P < 0,001$), većom ekspresijom SHH ($P < 0,001$) te u TNBC molekularnom podtipu karcinoma. Veći tumori povezani su s ranijim razvojem metastaza ($P < 0,001$), kao i kada su i estrogen-negativni ($P = 0,007$), progesteron-negativni ($P = 0,004$), ako im je Ki67 veći ili jednak 20 % ($P = 0,007$), ako su HER2-negativni ($P = 0,001$), ako imaju manju ekspresiju receptora androgena ($P < 0,001$) ili visoku ekspresiju SHH ($P < 0,001$) odnosno ako pripadaju TNBC molekularnom podtipu ($P = 0,04$) (Tablica 46).

Tablica 46. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke ovisno o veličini tumora

	Veličina	Preživljenje					
		OS		RS		MS	
		AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*
Svi ispitanici	0 – 2 cm	122,3	**< 0,001**	123,5	0,18	122,3	**< 0,001**
	> 2 cm	104,2		118,1		104,2	
ER neg	0 – 2 cm	109,3	**0,007**	108,6	0,17	109,3	**0,007**
	> 2 cm	91,3		110,6		91,3	
ER poz	0 – 2 cm	122,2	0,35	123,9	0,33	122,2	0,35
	> 2 cm	113,8		122,0		113,8	
PR neg	0 – 2 cm	115,0	**0,004**	117,5	0,08	115,0	**0,004**
	> 2 cm	93,4		111,5		93,4	
PR poz	0 – 2 cm	123,1	0,24	123,6	0,31	123,1	0,24
	> 2 cm	113,3		122,0		113,3	
Ki67 < 20 %	0 – 2 cm	104	0,10	102,8	0,56	104,0	0,09
	> 2 cm	109,5		116,0		109,5	
Ki67 ≥ 20 %	0 – 2 cm	119,9	**0,007**	123,1	0,17	119,9	**0,007**
	> 2 cm	101,3		116,5		101,3	
HER2 neg	0 – 2 cm	108,4	**0,001**	109,5	0,19	108,4	**0,001**
	> 2 cm	83,9		95,1		83,6	
HER2 poz	0 – 2 cm	126,0	0,09	126,0	0,39	126,0	0,09
	> 2 cm	107,5		120,5		107,5	
AR % jezgra OS (≤ 80), RS (≤ 30), MS (≤ 70)	0 – 2 cm	126,0	**< 0,001**	105,5	0,39	126,0	**< 0,001**
	> 2 cm	97,5		106,9		93,03	
AR % jezgra OS (> 80), RS (> 30), MS (> 70)	0 – 2 cm	111,4	0,85	124,2	0,95	122,3	0,91
	> 2 cm	107,9		119,8		110,2	
SHH IRS OS (≤ 180), RS (≤ 230), MS (≤ 140)	0 – 2 cm	120,6	0,06	124,5	0,17	109,6	0,19
	> 2 cm	108,2		118,9		104,9	
SHH IRS OS (> 180), RS (> 230), MS (> 140)	0 – 2 cm	120	**< 0,001**	89,5	0,82	126,0	**< 0,001**
	> 2 cm	85,7		96,5		100,5	
HER2 da	0 – 2 cm	111,0	0,13	109,5	0,19	111,0	0,13
	> 2 cm	99,3		95,1		99,3	
LumA da	0 – 2 cm	-	-	111,0	0,29	-	-
	> 2 cm	-		110,3		-	
LumB da	0 – 2 cm	117,9	0,67	102,9	0,59	117,9	0,67
	> 2 cm	111,1		101,0		111,1	
TNBC da	0 – 2 cm	107,7	**0,04**	123,8	0,43	107,7	**0,04**
	> 2 cm	73,6		122,0		73,6	
LumB/HER2- da	0 – 2 cm	94,5	0,95	106,7	0,39	94,5	0,95
	> 2 cm	94,1		90,5		94,1	
LumB/HER2+ da	0 – 2 cm	126,0	0,31	98,9	0,58	126,0	0,31
	> 2 cm	108,4		100,0		108,4	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

Statistička analiza pokazala je kako pacijentice s metastazama u limfnim čvorovima i manjom ekspresijom SHH imaju kraće ukupno preživljenje (*P* = 0,001) i raniji razvoj recidiva (*P* = 0,03) koji je prisutan i u slučaju estrogen-negativnih karcinoma (*P* = 0,03) i u HER2 molekularnom podtipu karcinoma (*P* = 0,03) (Tablica 47).

Tablica 47. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke ovisno o statusu limfnih čvorova

		Preživljenje					
		OS		**RS**		**MS**	
	N	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*
Svi ispitanici	N0	109,8	0,12	123,5	0,08	119,7	0,56
	N1	98,1		111,5		111,3	
ER neg	N0	101,5	0,56	120,5	**0,03**	110,3	0,84
	N1	84,9		79,4		88,2	
ER poz	N0	114,6	0,06	124,6	0,55	124,6	0,20
	N1	98,6		118,0		113,9	
PR neg	N0	103,3	0,97	121,4	0,06	112,5	0,98
	N1	102,7		100,3		108,1	
PR poz	N0	114,4	0,03	124,5	0,54	124,5	0,20
	N1	93,1		113,8		109,4	
Ki67 < 20 %	N0	94,9	0,34	104	0,08	101,9	0,56
	N1	87,2		100,4		104,0	
Ki67 ≥ 20 %	N0	111,3	0,28	122,2	0,24	117,9	0,48
	N1	99,9		109,9		107,9	
HER2 neg	N0	97,5	0,29	109,3	0,28	105,8	0,89
	N1	89,2		97,9		98,2	
HER2 poz	N0	119,3	0,21	126,0	0,05	122,8	0,29
	N1	89,6		103,7		102,9	
AR % jezgra OS (≤ 80), RS (≤ 30), MS (≤ 70)	N0	104,7	0,52	116,0	0,27	117,5	0,08
	N1	94,9		80,8		96,7	
AR % jezgra OS (> 80), RS (> 30), MS (> 70)	N0	108,3	0,10	124,9	0,15	112,9	0,24
	N1	91,5		115,1		116	
SHH IRS OS (≤ 180), RS (≤ 230), MS (≤ 140)	N0	115,2	**0,001**	123,4	**0,03**	116,4	0,44
	N1	82,6		110,6		91,6	
SHH IRS OS (> 180), RS (> 230), MS (> 140)	N0	92,01	0,08	97,4	0,37	122,2	0,94
	N1	113,8		102,0		116,6	
HER2 da	N0	115,7	0,11	125,0	**0,03**	117,5	0,75
	N1	60,5		59,5		97,0	
LumA da	N0	96,3	0,16	104,0	0,08	-	-
	N1	87,2		100,4		-	
LumB da	N0	118,2	0,20	123,4	0,46	123,4	0,26
	N1	102,3		120,0		110,3	

TNBC da	N0	89,1	0,91	106,6	0,24	96,7	0,87
	N1	89,2		83,0		86,3	
LumB/HER2- da	N0	93,3	0,38	96,9	0,40	96,9	0,82
	N1	88,7		101,0		97,0	
LumB/HER2+ da	N0	122,0	0,37	-	-	126,0	0,09
	N1	96,6		-		96,0	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

Statistička analiza pokazala je kako pacijentice s karcinomom s prisutnom limfovaskularnom invazijom koji pripada LumA podtipu imaju kraće preživljenje (*P* = 0,01) (Tablica 48).

Tablica 48. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke ovisno o prisutnosti limfovaskularne invazije

		Preživljenje					
		OS		**RS**		**MS**	
	LVI	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*
Svi ispitanici	0	106,9	0,21	121,8	0,93	117,1	0,31
	1	93,2		111,8		103,0	
ER neg	0	97,6	0,70	115,2	0,90	106,3	0,52
	1	84,2		102,3		88,1	
ER poz	0	112,4	0,09	125,0	0,74	123,1	0,16
	1	95,5		114,1		107,9	
PR neg	0	100,8	0,58	117,4	0,81	108,1	0,59
	1	84,6		103,8		91,8	
PR poz	0	112,2	0,12	124,9	0,79	124,5	0,08
	1	96,0		113,9		107,2	
Ki67 < 20 %	0	95,6	0,09	102,9	0,60	102,1	0,59
	1	89,0		116,0		116,0	
Ki67 ≥ 20 %	0	106,2	0,71	120,3	0,96	113,7	0,49
	1	94,8		110,9		100,2	
HER2 neg	0	89,5	0,55	100,0	0,74	95,9	0,68
	1	92,5		108,5		101,4	
HER2 poz	0	118,9	0,12	126,0	0,24	122,7	0,20
	1	88,6		110,5		98,6	
AR % jezgra OS (≤ 80), RS (≤ 30), MS (≤ 70)	0	102,5	0,49	110,9	0,92	112,3	0,28
	1	88,3		98,6		92,6	
AR % jezgra OS (> 80), RS (> 30), MS (> 70)	0	105,8	0,20	123,9	0,92	112,6	0,57
	1	95,4		114,3		109,9	
SHH IRS OS (≤ 180), RS (≤ 230), MS (≤ 140)	0	109,2	0,42	122,5	0,91	112,3	0,69
	1	97,2		112,9		101,3	
SHH IRS OS (> 180), RS (> 230), MS (> 140)	0	99,9	0,35	100,3	0,82	120,9	0,27
	1	85,2		86,8		104,9	

HER2 da	0	111,1	0,36	125,0	0,09	118,2	0,44
	1	75,6		88,8		90,2	
LumA da	0	96,9	**0,01**	102,9	0,62	-	-
	1	81,3		104,0		-	
LumB da	0	112,9	0,62	126,0	0,32	120,0	0,47
	1	99,2		113,5		105,5	
TNBC da	0	79,8	0,89	90,9	0,51	83,1	0,80
	1	86,9		106,1		87,8	
LumB/HER2- da	0	85,8	0,41	100,0	0,32	93,1	0,80
	1	91,7		97,8		95,9	
LumB/HER2+ da	0	126,0	0,05	-	-	126,0	0,20
	1	91,7		-		100,5	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

Statistička analiza pokazala je kako bolesnice s karcinomom s manjom ekspresijom receptora androgena imaju raniji razvoj recidiva (*P* = 0,001) i metastaza (*P* = 0,02). Ukoliko je uz manju ekspresiju receptora androgena karcinom HER2-pozitivan (*P* = 0,01) odnosno pripada LumB/HER2-pozitivnim podtipu karcinoma (*P* = 0,04), utoliko je kraće ukupno preživljenje. U slučaju karcinoma s manjom ekspresijom receptora androgena, koji je ujedno i progesteron-negativan (*P* = 0,03), a kojemu je Ki67 veći ili jednak 20 % (*P* = 0,005) te s manjom ekspresijom SHH (*P* = 0,04), prisutan je raniji razvoj recidiva. S obzirom na to da je analiza pokazala da je kod karcinoma s manjom ekspresijom receptora androgena prisutan raniji razvoj recidiva i u slučaju HER2-negativiteta (*P* = 0,02), kao i HER2-pozitiviteta (*P* = 0,003), zaključuje se kako HER2 status nije povezan s utjecajem AR na razvoj recidiva. Kod karcinoma s niskom ekspresijom receptora androgena, a koji su HER2-pozitivni (*P* = 0,03) ili imaju visoku ekspresiju SHH (*P* = 0,007) uočen je raniji razvoj metastaza (Tablica 49.).

Tablica 49. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke

		Preživljenje					
		OS (> 80)		**RS** (> 30)		**MS** (> 70)	
	AR %	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*
Svi ispitanici	0 (≤)	100,0	0,19	110,8	**0,001**	108,2	**0,02**
	1 (>)	103,2		123,9		111,9	
ER neg	0 (≤)	97,3	0,39	109,5	0,12	102,8	0,84
	1 (>)	78,8		116,0		95,5	
ER poz	0 (≤)	102,1	0,20	89,0	0,81	115,1	0,16

	1 (>)	105,6		124,6		113,9	
PR neg	0 (≤)	97,9	0,97	109,1	**0,03**	103,8	0,49
	1 (>)	92,1		117,4		99,6	
PR poz	0 (≤)	101,9	0,21	89,0	0,77	114,4	0,09
	1 (>)	106,3		124,3		114,9	
Ki67 < 20 %	0 (≤)	96,4	0,51	66,0	0,88	109,5	0,09
	1 (>)	93,7		114,9		104,0	
Ki67 ≥ 20 %	0 (≤)	100,1	0,19	110,0	**0,005**	106,2	0,13
	1 (>)	104,3		123,7		108,7	
HER2 neg	0 (≤)	91,9	0,71	101,3	**0,02**	97,8	0,11
	1 (>)	91,3		102,0		98,7	
HER2 poz	0 (≤)	96,9	**0,01**	99,3	**0,003**	104,5	**0,03**
	1 (>)	117,0		126,		117,0	
SHH IRS OS (≤ 180), RS (≤ 230), MS (≤ 140)	0 (≤)	105,0	0,74	115,3	**0,04**	107,2	0,46
	1 (>)	103,8		123,9		107,6	
SHH IRS OS (> 180), RS (> 230), MS (> 140)	0 (≤)	84,8	0,05	57,0	0,06	108,4	**0,007**
	1 (>)	99,5		115,0		114,3	
HER2 da	0 (≤)	95,9	0,21	90,7	0,05	-	-
	1 (>)	97,0		120,0		-	
LumA da	0 (≤)	90,6	0,69	66,0	0,88	-	-
	1 (>)	93,9		103,1		-	
LumB da	0 (≤)	101,6	0,11	89,0	0,83	110,7	0,30
	1 (>)	109,1		124,5		111,2	
TNBC da	0 (≤)	89,6	0,06	100,2	0,46	91,6	0,57
	1 (>)	68,0		89,3		73,2	
LumB/HER2- da	0 (≤)	84,9	0,62	89	0,82	91,9	0,97
	1 (>)	91,6		99,3		94,5	
LumB/HER2+ da	0 (≤)	97,2	**0,04**	-	-	103,1	0,08
	1 (>)	117,0		-		117,0	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

Statistička analiza pokazala je kako bolesnice s karcinomom dojke s visokom ekspresijom SHH imaju raniji razvoj recidiva bolesti (*P* = 0,02) koji je prisutan i kada je uz visoku ekspresiju SHH karcinom također progesteron-negativan (*P* = 0,02), ako je Ki67 veći ili jednak 20 % (*P* = 0,02), ako je karcinom HER2-negativan (*P* = 0,01), ako je prisutna niska ekspresija receptora androgena (*P* = 0,03) te ako pripada TNBC molekularnom podtipu karcinoma (*P* = 0,02). Također, uočeno je manje ukupno preživljenje ako je karcinom s niskom ekspresijom SHH ujedno i estrogen-negativan (*P* = 0,04) (Tablica 50.).

Tablica 50. Povezanost kliničkih parametara i ekspresije AR i SHH s trajanjem ukupnog preživljenja, preživljenja do pojave recidiva i preživljenja do pojave metastaza kod pacijentica s različitim molekularnim podtipovima Ca dojke

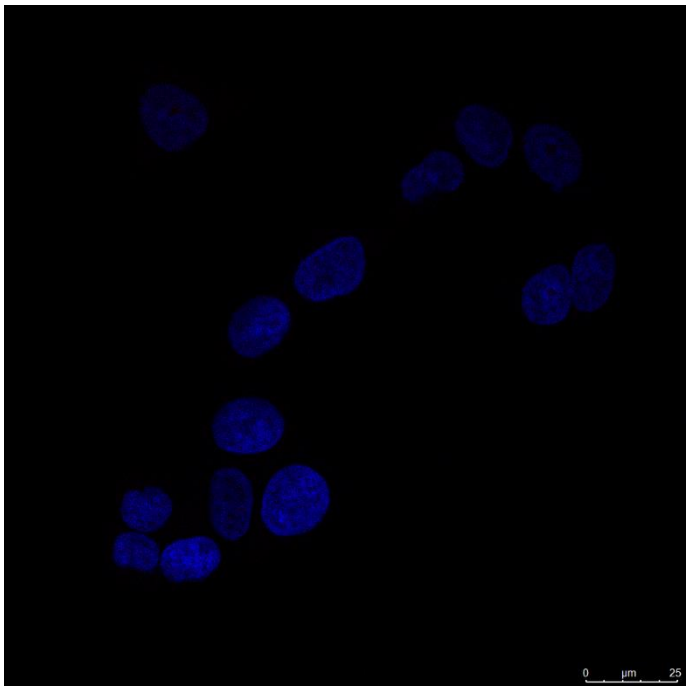
		Preživljenje					
		OS (> 180)		**RS** (> 230)		**MS** (> 140)	
	SHH IRS	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*	AS (mjeseci)	P*
Svi ispitanici	0 (≤)	107,3	0,23	122,5	**0,02**	110,9	0,19
	1 (>)	95,0		98,8		118,2	
ER neg	0 (≤)	104,4	**0,04**	117,6	0,03	105,5	0,69
	1 (>)	75,8		82,0		97,2	
ER poz	0 (≤)	108,6	0,90	124,5	0,76	107,5	0,04
	1 (>)	104,2		115,0		124,7	
PR neg	0 (≤)	104,3	0,21	119,1	**0,02**	105,2	0,81
	1 (>)	86,5		87,3		103,4	
PR poz	0 (≤)	108,9	0,84	124,3	0,77	108,7	0,11
	1 (>)	100,5		115,0		124,4	
Ki67 < 20 %	0 (≤)	99,8	0,82	114,8	0,83	112,0	0,25
	1 (>)	94,9		102,0		104,0	
Ki67 ≥ 20 %	0 (≤)	107,9	0,13	121,6	**0,02**	110,9	0,19
	1 (>)	92,3		94,8		118,2	
HER2 neg	0 (≤)	96,9	0,22	108,9	**0,01**	100,3	0,29
	1 (>)	81,9		85,0		97,7	
HER2 poz	0 (≤)	108,2	0,61	123,3	0,82	107,6	0,37
	1 (>)	104,4		115,0		114,6	
AR % jezgra OS (≤ 80), RS (≤ 30), MS (≤ 70)	0 (≤)	105,0	0,05	115,3	**0,03**	107,2	0,96
	1 (>)	84,8		57,0		108,4	
AR % jezgra OS (> 80), RS (> 30), MS (> 70)	0 (≤)	103,8	0,76	-	-	107,6	0,05
	1 (>)	99,5		-		114,3	
HER2 da	0 (≤)	113,8	0,08	117,6	0,79	125,0	0,36
	1 (>)	84,7		114,0		13,4	
LumA da	0 (≤)	92,4	0,71	103,1	0,83	-	-
	1 (>)	95,0		102,0		-	
LumB da	0 (≤)	110,5	0,93	124,5	0,83	102,2	0,07
	1 (>)	104,0		115,0		123,6	
TNBC da	0 (≤)	92,1	0,15	105,4	**0,02**	92,1	0,69
	1 (>)	65,5		57,0		77,3	
LumB/HER2- da	0 (≤)	92,6	0,17	99,3	0,82	92,5	0,52
	1 (>)	60,4		68,0		96,9	
LumB/HER2+ da	0 (≤)	105,0	0,18	-	-	95,7	0,08
	1 (>)	120,0		-		126,0	

AS – aritmetička sredina (mean); *Log rank test

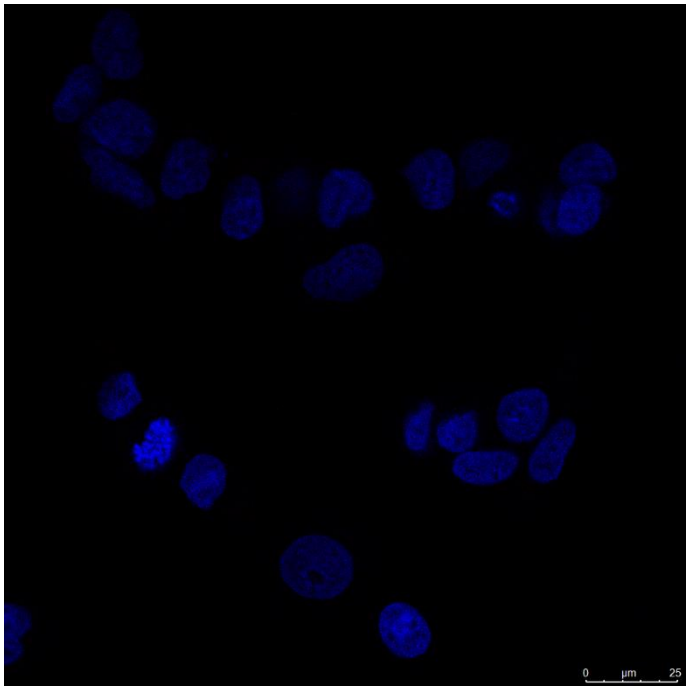
5.6. Interakcija proteina Shh s receptorom androgena i receptorom estrogena

Metodom PLA istražena je fizička interakcija proteina SHH s receptorom androgena i estrogena na modelu *in vitro* karcinoma dojke. Kao stanični modeli karcinoma dojke korištene su stanične linije MCF-7, kao pozitivna kontrola koja je model za podtip luminal A i koja eksprimira proteine SHH, AR i ER te kao negativna kontrola SkBr3 koja je model za podtip HER2-enriched i koja ne eksprimira niti jedan od navedenih proteina. Kao tehnička negativna kontrola korištene su iste te stanice netretirane primarnim antitijelima ili je umjesto antitijela anti-SHH korišteno antitijelo anti-tubulin γ jer tubulin γ ne bi trebao stupati u interakciju s AR i ER.

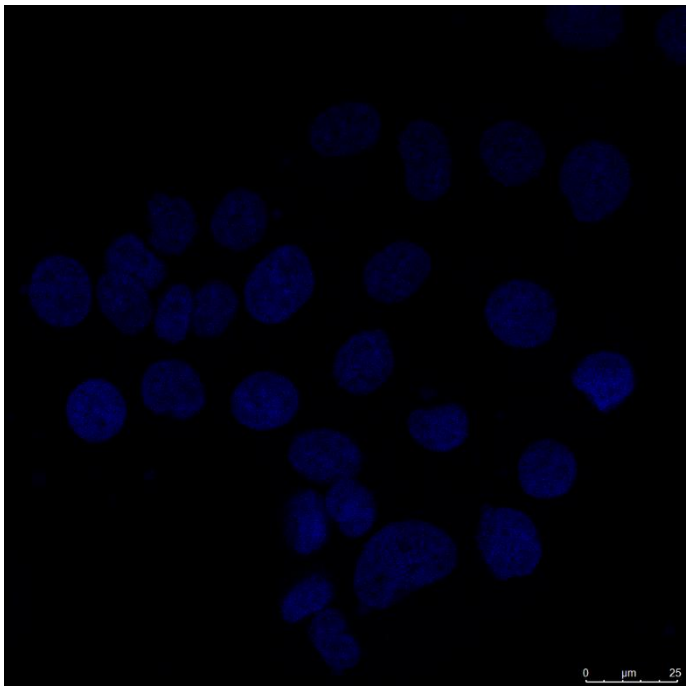
U bazičnim uvjetima rasta stanica MCF-7 interakcija između proteina SHH i AR te ER nije dokazana (slike 12.-16.).



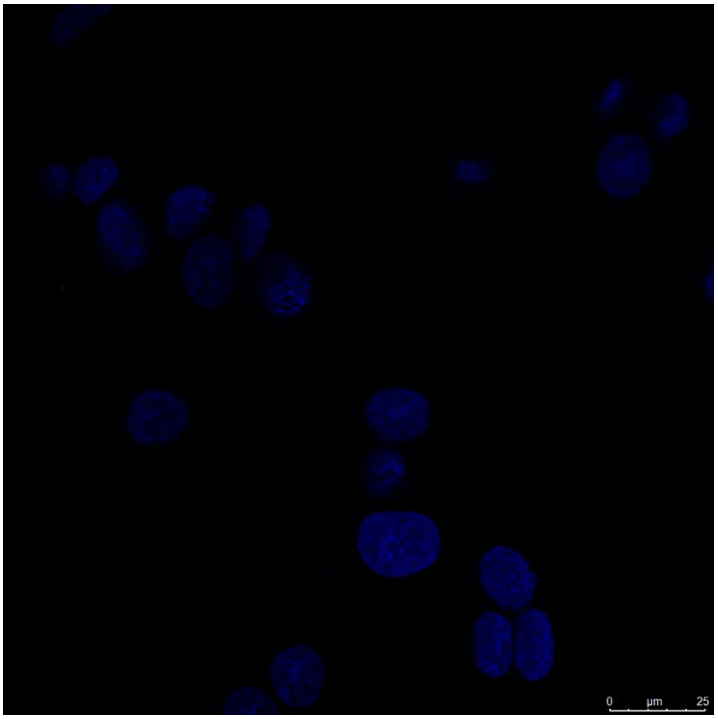
Slika 12. Metoda PLA je pokazala da u bazičnim uvjetima rasta stanica MCF-7 ne dolazi do interakcije između proteina SHH i AR. Vide se samo plavo obojane jezgre.



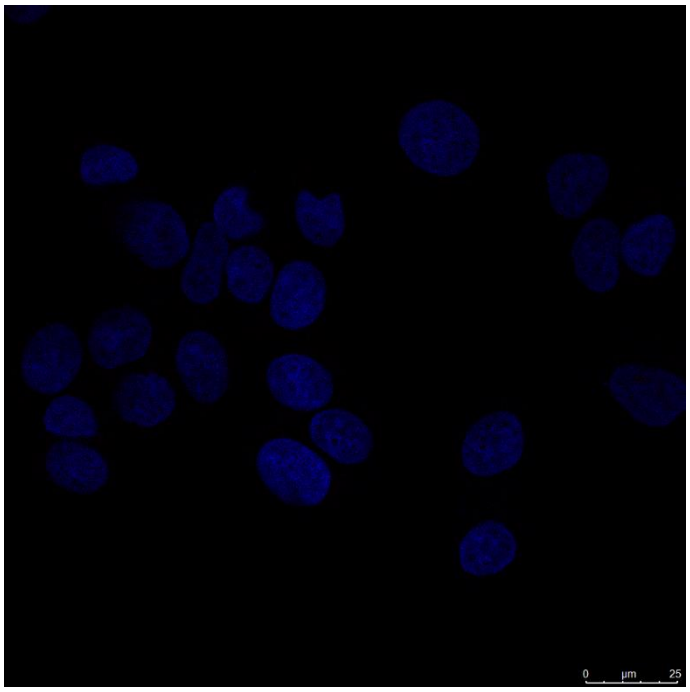
Slika 13. Metoda PLA je ispravno pokazala da u staničnoj liniji MCF-7 ne dolazi do interakcije između proteina tubulina γ i AR. Vide se samo plavo obojane jezgre.



Slika 14. Metoda PLA je pokazala da u bazičnim uvjetima rasta stanica MCF-7 ne dolazi do interakcije između proteina SHH i ER. Vide se samo plavo obojane jezgre.

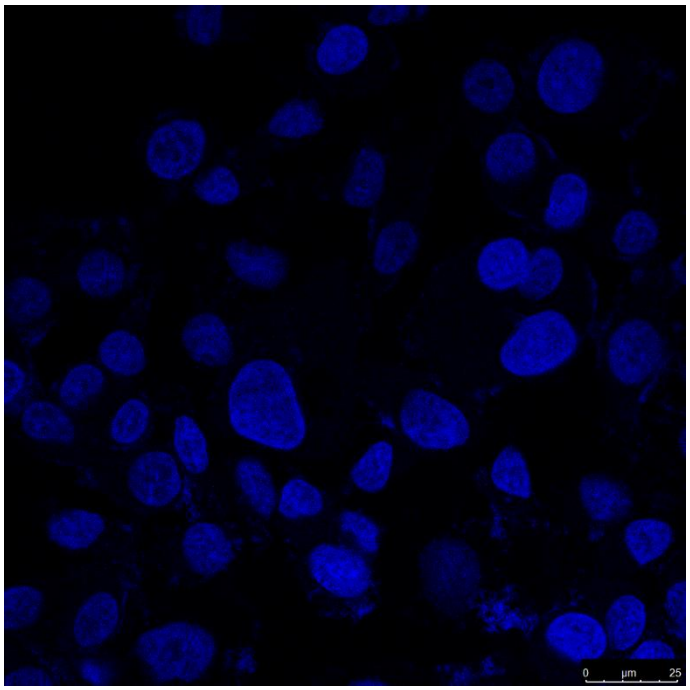


Slika 15. Metoda PLA je ispravno pokazala da u staničnoj liniji MCF-7 ne dolazi do interakcije između proteina tubulina γ i ER (negativna kontrola). Vide se samo plavo obojane jezgre.

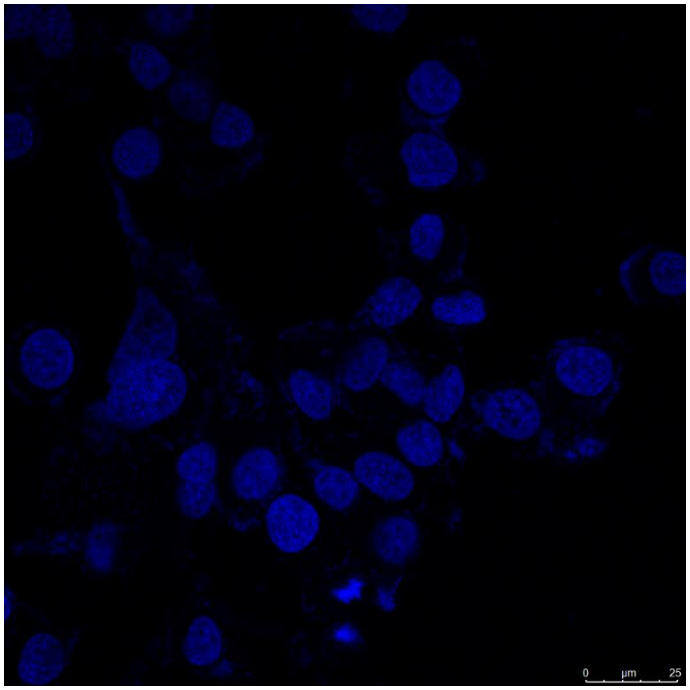


Slika 16. Metoda PLA je ispravno pokazala da u staničnoj liniji MCF-7 izostavljanjem primarnih antitijela (tehnička negativna kontrola) ne dolazi do nespecifičnog vezanja proba za detekciju interakcije proteina od interesa. Vide se samo plavo obojane jezgre.

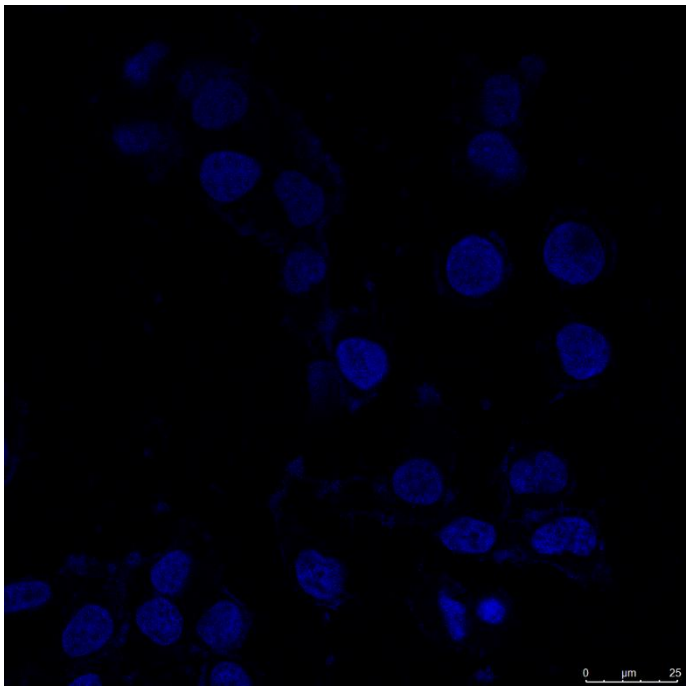
Također, kao što je i bilo očekivano, interakcije između proteina SHH i AR te ER nije bilo u stanicama SkBr3, koje u bazičnim uvjetima uzgoja ne eksprimiraju niti jedan od navedenih proteina (slika 17.-19.).



Slika 17. Metoda PLA je pokazala da u bazičnim uvjetima rasta stanica SkBr3, s obzirom da nema niti ekspresije proteina SHH i AR (negativna kontrola), niti ne dolazi do interakcije između ta dva proteina. Vide se samo plavo obojane jezgre.



Slika 18. Metoda PLA je pokazala da u bazičnim uvjetima rasta stanica SkBr3, s obzirom da nema niti ekspresije proteina SHH i ER (negativna kontrola), niti ne dolazi do interakcije između ta dva proteina. Vide se samo plavo obojane jezgre.



Slika 19. Metoda PLA je ispravno pokazala da u staničnoj liniji SkBr3 izostavljanjem primarnih antitijela (tehnička negativna kontrola) ne dolazi do nespecifičnog vezanja proba za detekciju interakcije proteina od interesa. Vide se samo plavo obojane jezgre.

6. RASPRAVA

Karcinomi dojke najčešći su karcinomi žena u svijetu te ujedno i najčešći uzrok smrti žena u razvijenim zemljama (1, 3). Prema zadnjim objavljenim podatcima Registra za rak, u Hrvatskoj je u 2020. godini zabilježeno 2.894 novih slučajeva raka dojke (stopa incidencije 120,3/100.000), a od ove zloćudne bolesti u 2020. godini umrlo je 832 žene (stopa mortaliteta 32,8/100.000) (4). Značajnim faktorima rizika smatraju se reproduktivni i menstrualni faktori, obiteljska anamneza, osobna anamneza benigne bolesti dojke, prekomjerna tjelesna težina, nedovoljna tjelesna aktivnost, konzumacija alkohola i hormonska nadomjesna terapija.

Veliku prepreku u razumijevanju i liječenju karcinoma dojke čini njegova biologija. Ovaj karcinom predstavlja izrazito heterogenu skupina tumora unutar koje razlikujemo 24 histološka tipa i podtipa. Svaki od tumora unutar te skupine karakteriziran je određenim histološkim, imunohistokemijskim i molekularnim značajkama, što dovodi do prisutnosti brojnih prognostičkih čimbenika.

U slučaju novodijagnosticiranog karcinoma dojke određuje se status hormonskih receptora te se određenim dijagnostičkim postupcima definira stadij bolesti. Obavezno se određuje status estrogenskih i progesteronskih receptora te prisutnost prekomjerne ekspresije receptora HER2, s obzirom na to da se te informacije smatraju ključnima za prognostičku i terapijsku svrhu (156).

U posljednjih nekoliko godina sve više se spominje važnost receptora androgena (AR) u karcinomu dojke. Iako se ne određuje rutinski, prema nekim studijama prekomjerno je eksprimiran u 70 – 90 % karcinoma dojke, zbog čega bi mogao imati terapijsku i prognostičku važnost (22).

Endokrina terapija jedan je od glavnih modaliteta liječenja karcinoma dojke s izraženim hormonskim receptorima. U medikamentnom liječenju karcinoma dojke (kod estrogen-receptor pozitivnih karcinoma) u većini se slučajeva koriste blokatori receptora estrogena ili njegove sinteze, što dovodi do smanjenja proliferacije tumora. Također se koriste i blokatori receptora za faktore rasta (u slučaju HER2 pozitivnog karcinoma), poput herceptina. Isto tako, kod trostruko negativnih karcinoma dojke jedina dostupna farmakoterapija je citotoksična kemoterapija (157, 158).

Unatoč dostupnosti i razvoju endokrine terapije, pojava rezistencije na endokrinu terapiju onemogućava dugoročnu kontrolu bolesti (159, 160). Zbog navedenih ograničenja pojavila se potreba za razvojem novih modaliteta liječenja u smislu prevladavanja rezistencije na endokrinu terapiju kod hormonalno ovisnih karcinoma dojke te razvoja novih meta u liječenju TNBC.

Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI) evolucijski je visoko konzerviran put prijenosa signala sa stanične membrane u staničnu jezgru. Taj signalni put najvažniju ulogu ima tijekom embriogeneze, dok je u odraslom organizmu odgovoran za održavanje matičnih stanica i zacjeljivanje tkivnih oštećenja (161). Međutim, s obzirom na to da su mnogi ciljni geni ovog signalnog puta onkogeni i tumor-supresori, aberantna aktivnost signalnog puta, uzrokovana genetskim i epigenetskim promjenama, uzrokuje razvoj različitih tipova tumora.

Novi, manje istraženi signalni putevi predstavljaju potencijalne ciljne mete i mogućnost razvoja terapija na koje ne postoji rezistencija. Danas korištene terapije djeluju na glavninu tumorske mase, dok otpornost nastupa u trenutku kada matične stanice razviju istu i diobom nadomjeste tumorsku masu novim, otpornim stanicama. S obzirom na to da je signalni put HH-GLI uključen u održavanje matičnih stanica, a samim time i tumorskih matičnih stanica, postoji ideja kako bi kombinacija terapije usmjerene protiv komponenata ovog signalnog puta sa standardnim kemoterapeuticima istovremeno mogla djelovati na glavninu tumora te na tumorske matične stanice. Takva kombinirana terapija mogla bi dovesti do nemogućnosti razvoja otpornosti i potpunijeg uklanjanja karcinoma. Također, jedno istraživanje pokazalo je potencijalni značaj kombinacije terapije koja uključuje anti-hormonske lijekove i antagoniste signalnog puta HH-GLI .Zbog toga se sve više istražuje i njegova potencijalna uloga kao ciljne mete za liječenje tumora (46). Na primjer, poznata je uloga signalnog puta HH-GLI u nastanku i progresiji hormonski ovisnih (ER+/PR+) i trostruko-negativnih (TNBC) podtipova karcinoma dojke (37).

Obzirom na poznatu povezanost ekspresije receptora estrogena s ekspresijom proteina Shh u karcinomu dojke u ovom radu pokušali smo odrediti eskpresiju proteina Shh u istraživanom uzorku te istražiti povezanost ekspresije Shh s kliničko-patološkim značajkama karcinoma dojke i bolesnica(115, 162). Isto tako namjera nam je bila odrediti ekspresiju receptora androgena te i tu odrednicu povezati s kliničko-patološkim značajkama karcinoma dojke i bolesnica u istraživanom uzorku. Također smo ispitali moguću fizičku interakciju proteina Shh

s receptorom androgena i/ili estrogena kao mogući mehanizam djelovanja proteina SHH u karcinomu dojke. Na tu ideju navela nas je nedavno dokazana spoznaja o fizičkoj interakciji proteina Shh i staničnom modelu karcinoma prostate(152).

Istraživanje je provedeno na 186 uzoraka karcinoma dojke na kojima su se imunohistokemijski odredile ekspresije proteina Shh, receptora androgena dok su se ostali podatci prikupili iz medicinske dokumentacije.

Ekspresija proteina SHH uočena je u 98% (183/186) uzoraka te je izražena imunohistoskôrom raspona vrijednosti 0-300 dok je medijan ekspresije 150 (Tablica 3.).

Gledajući cjelokupan uzorak jedina statistički značajna razlika u ekspresiji proteina SHH je uočena u kategoriji veličine tumora. Tumori T2 (2,1-5cm veličine) imaju najmanju ekspresiju proteina SHH u odnosu na tumore iz skupina T1 i T3 (Tablica 4.). Taj rezultat nije u skladu s do sada objavljenom literaturom gdje je veća ekspresija vezana uz veće tumore, no tu diskrepancu mogli bismo objasniti malim brojem tumora u skupini T3 (>5 cm veličine). U toj skupini nalazilo se svega devet karcinoma i imali su najveću ekspresiju proteina SHH, a u podskupini progesteron-negativnih karcinoma ekspresija proteina Shh čak je značajno veća u tumorima većima od 5 cm (Tablica 7.). Stoga možemo pretpostaviti kako je moguće da bi u slučaju njihove brojnije zastupljenosti u uzorku rezultat ekspresije proteina SHH u odnosu na veličinu tumora bio u skladu s postojećom literaturom (120, 162).

Promatrajući razlike ekspresije proteina SHH u odnosu na dob nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji među pacijenticama kojima je bolest dijagnosticirana prije 50. godine života, odnosno s 50 i više godina. Određena istraživanja pokazala su kako je u slučaju ranije dijagnosticiranog karcinoma odnosno u pre-menopauzalnih pacijentica u karcinomu prisutna veća ekspresija Shh (162). Eventualno objašnjenje ove diskrepancije moglo bi se naći u distribuciji uzorka ovisno o dobi gdje je u našem uzorku 25% (46/186) karcinoma dijagnosticirano prije 50. godine života (Tablica 4.) dok je u većini drugih istraživanja otprilike jednaka zastupljenost karcinoma u dobnim skupinama. Unatoč nejednakoj zastupljenosti karcinoma u odnosu na dob u našem uzorku još uvijek ih je dovoljno u obje skupine za ispravnu usporedbu, a i uočena razlika uistinu nije velika (145 u odnosu na 150 imunohistoskôr, Tablica 4.) te možemo zaključiti kako ipak nema razlike u ekspresiji u odnosu na dob što je također u skladu s dijelom recentnih istraživanja (163).

Između pojedinih molekularnih podtipova karcinoma dojke nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji proteina SHH. U prospektivnoj kohortnoj studiji pakistanske populacije na

150 karcinoma dojke dokazana je statistički značajna povezanost veće ekspresije proteina SHH s prisutnošću receptora estrogena odnosno progesterona, postotka Ki67 jednakog ili većeg od 20 te TNBC molekularnog podtipa (162). U našem uzorku se također prati veća ekspresija proteina SHH u karcinomima s izraženim receptorom estrogena i progesterona, no po pitanju Ki67 veća je ekspresija prisutna u karcinomima s postotkom Ki67 manjim od 20 (Tablica 4.). Uspoređujući molekularne podtipove u našem uzorku najveću ekspresiju proteina SHH ima HER2 podtip, zatim luminalni A, luminalni B, a najmanju ima TNBC. Također uspoređujući karcinome u našem uzorku isključivo promatrajući prisutnost receptora HER2 ustanovljeno je kako je veća ekspresija proteina SHH u slučaju prisutnosti receptora HER2. Isto tako ako luminalne podtipove promatramo razdvajajući luminalni B na LumB/HER2-pozitivan i LumB/HER2-negativan vidljivo je kako je veća ekspresija prisutna u LumB/HER2-pozitivnom podtipu, čak veća nego u LumA podtipu. Iako bez statistički značajne povezanosti vidljivo je kako je prisutnost receptora HER2 praćena većom ekspresijom proteina SHH što nije slučaj u pakistanskoj studiji u kojoj nema nikakve povezanosti receptora HER2 i proteina SHH (162) dok je u južnokorejskoj studiji pokazana negativna korelacija između prisutnosti receptora HER2 i ekspresije proteina SHH, odnosno u toj studiji karcinomi bez prekomjerno izraženog receptora HER2 imaju veću ekspresiju proteina Shh (163). Valja napomenuti i kako je kvantifikacija ekspresije gena *SHH* u pakistanskoj studiji rađena pomoću kvantitativne PCR (qPCR) metode dok je u južnokorejskom istraživanju kao i u našemu rađena imunohistokemijski (162, 163) što može predstaviti potencijalni razlog diskrepancije.

Većina studija opisuje pozitivnu korelaciju veličine ekspresije proteina SHH s brojem zahvaćenih limfnih čvorova (115, 120, 162-164) što nismo uočili u našem uzorku. Ekspresija proteina SHH u našem istraživanju analizirana je za svaku N (N0,N1,N2,N3) skupinu zasebno te također uspoređujući samo dvije skupine odnosno bez prisutnih metastaza i sa metastazama u limfnim čvorovima neovisno o broju zahvaćenih čvorova. Neovisno o načinu analize nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji proteina SHH, štoviše vrlo su slične vrijednosti imunohistoskôra za svaku od skupina (Tablica 4.).

Androgeni receptor imunohistokemijski smo uočili u 91% (169/186) analiziranih karcinoma. Medijan pozitivnosti odnosno postotka nuklearnog obojenja je 80, a raspon 0-100 (Tablica 3.). Uočili smo statistički značajno veću ekspresiju u tumorima s izraženim receptorima estrogena i/ili progresterona, tumorima s postotkom Ki67 manjim od 20, u manjim tumorima te u luminalnim podtipovima tumora (Tablica 18.). Isto tako primjetno je kako karcinomi s in-situ

komponentom također imaju veću ekspresiju receptora androgena u odnosu one koji su po histološkom tipu isključivo invazivni. Ta opažanja sukladna su većini recentnih studija u kojima se prati obrazac veće odnosno zastupljenije ekspresije receptora androgena u hormonski pozitivnim tumorima, odnosno luminalnim podtipovima te tumorima manjih dimenzija i s manje zahvaćenih limfnih čvorova (15, 22, 165, 166). Spomenute studije analizirali su receptor androgena među različitim podskupinama karcinoma na način da su promatrali samo njegovu prisutnost u uzorku (u kojem postotku karcinoma je prisutan unutar određene podskupine), a ne i intenzitet ekspresije odnosno postotak pozitivno obojenih jezgara metodama imunohistokemije (22, 166). U našem promatranom uzorku receptor androgena kvantificirali smo postotkom njegove prisutnosti u jezgrama stanica pojedinog karcinoma. Gledajući cijeli promatrani uzorak samo 9% (17/186) karcinoma nije imalo nikakvu ekspresiju receptora androgena te su svi pripadali TNBC molekularnom podtipu. Receptor androgena prisutan je u 65% (31/48) karcinoma TNBC molekularnog podtipa te je u toj skupini također i najslabije eksprimiran s medijanom ekspresije odnosno postotkom pozitivno obojenih jezgara stanica karcinoma od 10%. Također je i u drugim studijama TNBC molekularni podtip s najmanje učestalom i najslabijom ekspresijom receptora androgena (19, 21, 22, 26). Analizirajući ekspresiju receptora androgena za svaku pojedinu patološku karakteristiku također potvrđujemo malenu sklonost njegovoj prisutnosti u TNBC podtipu karcinoma. Tako kod estrogen-negativnih karcinoma uočavamo statistički značajno veću ekspresiju AR ako su ti karcinomi HER2-pozitivni (Tablica 19.). Kod progesteron-negativnih karcinoma prisutna je statistički značajna veća ekspresija AR ako su ti karcinomi i estrogen-pozitivni odnosno HER2-pozitivni (Tablica 21.). U slučaju HER-negativnih karcinoma značajno su veće ekspresije AR ako su ti karcinomi estrogen-pozitivni odnosno progesteron-pozitivni (Tablica 25.). Iz navedenog možemo zaključiti kako je veća ekspresija AR vezana uz luminalne podtipove karcinoma te određene pozitivne prediktore. To je vidljivo u tome što kad analiziramo karcinome prema pojedinoj patološkoj značajki te promatramo skupine bez izraženih pojedinih hormonskih receptora (progesteron-negativnih, estrogen-negativnih, HER2-negativnih) veća ekspresija AR uvijek će biti vezana uz barem jedno obilježje koje bi te karcinome svrstala u prognostički povoljnije skupine (npr. skupinu s Ki67 manjim od 20%, u skupinu gdje je barem jedan od dva druga hormonska receptora pozitivan, odnosno u skupinu karcinoma s in-situ komponentom) (Tablica 19.,21.,25.). Ako promatramo samo karcinome s Ki67 većim ili jednakim 20% koji je

negativni prediktor veća ekspresija AR je prisutna u estrogen-pozitivnih, progesteron-pozitivnih odnosno u karcinoma s in-situ komponentom (Tablica 24.).

Jedan od ciljeva u ovom istraživanju bio je i ustanoviti povezanost između ekspresije AR i SHH u pojedinim molekularnim podtipovima karcinoma dojke te u odnosu na kliničko-patološko obilježje. Unatoč određenim sličnostima kao što su veća ekspresija u luminalnim podtipovima i karcinomima s Ki67 manjim od 20%, zatim najmanja ekspresija u TNBC podtipu analiza korelacija je pokazala kako nema statistički značajne povezanosti između ekspresije AR i SHH (Tablica 33.).

U praćenju ishoda analizirali smo pojavnost smrti, recidiva i metastaza te trajanje preživljenja do pojave smrti, recidive i metastaza u odnosu na kliničko-patološke značajke uključujući ekspresiju AR i SHH.

Bolesnice kojima je karcinom dijagnosticiran nakon 50. godine života značajno češće umiru kao i one s većim tumorima, odnosno većim brojem zahvaćenih limfnih čvorova (Tablica 35.). Recidivi su znatno češći u estrogen-negativnih karcinoma te karcinoma s manjom ekspresijom AR (Tablica 36.). Metastaze se znatno češće razvijaju estrogen-negativnih, progesteron-negativnih, karcinoma s postotkom Ki67 većim od ili jednakim 20, u karcinoma s manjom ekspresijom AR te u TNBC molekularnom podtipu (Tablica 37.). Za ekspresiju proteina SHH nije dokazana značajna povezanost sa smrtnim ishodom, razvojem recidiva i metastaza, no vidljivo je kako su navedeni događaji manje zastupljeni u slučaju veće ekspresije proteina SHH (Tablica 35., 36., 37.).

Promatrajući trajanje preživljenja do određenog ishoda ustanovili smo kako su u našem uzorku značajno prije preminule bolesnice kojima je bolest dijagnosticirana nakon 50. godine života, koje su bolovale od estrogen-negativnog karcinoma, većeg tumora, kojima je bilo zahvaćeno više limfnih čvorova te koje su bolovale od TNBC, odnosno LumB/HER2-negativnog molekularnog podtipa. Ranija pojava recidiva je bila značajno povezana s estrogen-negativnim karcinomima, onima s manjom ekspresijom AR te većom ekspresijom SHH. Uobičajene patološke karakteristike vezane uz raniju pojavu metastaza kao što su veća dimenzija tumora, veći broj zahvaćenih limfnih čvorova, Ki67 veći ili jednak 20 %, odsutnost receptora estrogena i/ili progesterona, TNBC i LumB/HER2-negativni podtip, te manja ekspresija AR značajno su povezane i u našem uzorku.

Uspoređujući pojavnost određenih ishoda u našem uzorku s literaturom ustanovili smo kako su rezultati većim dijelom sukladni (učestalije smrti, recidivi i metastaze u većih tumora s više zahvaćenih limfnih čvorova, bez izraženih hormonskih receptora, s Ki67 većim ili jednakim 20 %) (Tablica 35.) (167). Kao što smo prethodno spomenuli pojavu agresivnijih oblika karcinoma u starijih bolesnica tako i ovdje pratimo češće umiranje kod onih bolesnica kojima je bolest dijagnosticirana nakon 50. godine što je u suprotnosti s recentnim studijama (Tablica 35.) (168). Povezanost ekspresije AR i SHH s pojavom smrti nije značajna , no primjećuje se kako je veća ekspresija vezana uz manju učestalost smrtnog ishoda (Tablica 35.). Veća ekspresija AR značajno je povezana s manje učestalom pojavom recidiva i metastaza (Tablica 36. i 37.). Visoka ekspresija proteina SHH značajno je povezana s ranijim razvojem recidiva, a ukupno preživljenje je kraće u bolesnika s većom ekspresijom proteina SHH, no bez statističke značajnosti kao i kasniji razvoj metastaza (Tablica 38.). Većina studija receptoru androgena pripisuje protektivni učinak iako još, naravno, nema konsenzusa o tome, no po pitanju SHH, njega veći dio studija svrstava u negativne prediktore preživljenja te ga povezuju s negativnim klinično-patološkim značajkama kao što su invazivnost, veličina tumora, lokoregionalno metastaziranje i proliferativnost (19, 115, 120, 162, 165, 166).

Rezultati analize trajanja preživljenja su , osim ranijeg umiranja kasnije oboljelih bolesnica, u skladu s poznatim činjenicama o negativnim prediktorima. Tako su negativan hormonalni status, veliki karcinomi, visok postotak Ki67, velik broj zahvaćenih limfnih čvorova, nepovoljni molekularni podtipovi (TNBC) povezani s ranijim umiranjem, razvojem recidiva i metastaza (Tablica 38.).

U trajanju preživljenja do pojave recidiva prisutna je statistički značajna povezanost visoke ekspresije proteina SHH i ranijeg razvoja recidiva, no s obzirom na to da je u skupini visoke ekspresije u kategoriji recidiva (SHH IRS > 230) tek 12 karcinoma od kojih su 2 razvila recidive usudimo se reći kako nije reprezenativan uzorak . Također to je, u našem istraživanju, jedina statistički značajna poveznica između neke od nepovoljnih odrednica karcinoma i visoke ekspresije SHH. Prije smo spomenuli moguću povezanost visoke ekspresije i velikih tumora, no isto tako u skupini velikih tumora samo je 9 karcinoma te je zapravo najniža ekspresija u T2 tumorima dok je veća i u T1 i u T3.

Iz svega navedenog možemo reći kako smo u našem istraživanju ustanovili kako su visoka ekspresija proteina SHH i AR povezane s povoljnim kliničko-patološkim karakteristikama i

povoljnijim ishodom. Tako su opažanja za SHH manje u skladu s opisanom literaturom u odnosu na opažanja vezana uz ekspresiju AR (19, 115).

Nedostatci ovog istraživanja su rad na arhivskom materijalu starom 5-10 godina te otežano praćenje pacijentica obzirom da u ustanovi u kojoj je provedeno istraživanje nije provedeno poptuno liječenje, već je dio liječenja (kemo i radioterapija) proveden u suradnim ustanovama. Iz tog razloga dio podataka prikupio se putem telefona te nerijetko u razgovoru s trećim osobama (članovima najuže obitelji).

Rad na starijem arhivskom materijalu je tehnički otežan te je teže prikupiti materijal, no s druge strane omogućio nam je, retrospektivno, duže praćenje bolesnica što je svakako prednost.

Prema našim spoznajama ovo je prvo istraživanje koje na istim uzorcima određuje ekspresiju proteina SHH i receptora androgena te provodi analizu i moguću povezanost istih s kliničko-patološkim značajkama karcinoma dojke.

Kako je naše istraživanje pokazalo da je ekspresija proteina SHH i AR pojačana u luminalnim podtipovima raka dojke, dakle onima koji eksprimiraju estrogeni receptor i generalno imaju bolju prognozu, sljedeći cilj nam je bio istražiti postoji li fizička interakcija između proteina SHH i ER te SHH i AR. Naime, kako je za ulogu proteina SHH kao aktivatora signalnog puta HH-GLI bitno postranslacijsko dodavanje molekule kolesterola na C-kraj njegovog N-terminalnog fragemnta (Slika 3.) (149), naša hipoteza je da se protein SHH preko tog kolesterola može vezati za receptore spolnih hormona, pošto je kolesterol prekursor u sintezi svih spolnih hormona (169). Na tu hipotezu potaklo nas je i nedavno objavljeno istraživnje Trnski i sur. koji su dokazali fizičku interakciju između proteina SHH i recepotora AR na staničnom modelu raka prostate (152). Zbog toga smo se u našoj studiji za dokazivanje fizičke interakcije proteina SHH i AR te ER bili odlučili primijeniti metodu korištenu u navedenoj studiji, a kao stanični model estrogen receptor-pozitivnog raka dojke odlučili smo koristiti trajnu staničnu liniju MCF-7 za koju je poznato da ima eksprimiran protein SHH kao i AR (37, 153). Nažalost, u navedenim stanicama metodom PLA nismo pokazali postojanje interakcije kako proteina SHH i ER (Slika 14.), tako niti interakciju između SHH i AR (Slika 12.). Međutim, ovdje je važno spomenuti da je u istraživanju Trnski i sur. interakcija između SHH i AR primarno dokazana kod stanica karcinoma prostate LNCaP koje su postale neovisne o androgenu, što inače nisu bazični uvjeti

uzgoja tih stanica (152). Čini se da su se te stanice karcinoma prostate u uvjetima bez androgena, za svoj daljnji rast morale preorjentirati na druge mitogene signalne puteve kao što je HH-GLI. Stoga bi za otkrivanje interakcije između proteina SHH i ER te SHH i AR u staničnom modelu raka dojke svkako bilo nužno istražiti postoje li kakvi posebni uvjeti uzgoja estrogen receptor-pozitivnih stanica raka dojke koji dovode do njihove neovisnosti o estrogenu, a koji bi mogli također dovesti i do interakcije između receptora spolnih hormona i signalnog puta HH-GLI. Jedan od pristupa moglo bi biti korištenje fetalnog goveđeg seruma koji je tretiran aktivnim ugljenom (eng. *charcoal-stripped serum*). Naime, ugljen iz seruma miče endogene hormone, faktore rasta i citokine (170), pri čemu kod stanica tretiranih takvim serumom dolazi do aktivacije nekih drugih signalnih puteva kao što je na primjer aktivacija protoonkogenog transkripcijskog faktora c-Myc (171). Jednaki uvjeti bi se mogli koristiti i za poticanje interakcije proteina SHH i AR, što je u konačnici u studiji Trnski i sur. i dovelo do interakcije između proteina SHH i AR u androgen-neovisnim stanicama raka prostate (152). U staničnoj liniji raka dojke SkBr3, koje su bile korištene kao biološka negativna kontrola, metoda PLA očekivano nije pokazala interakciju između proteina SHH i receptora spolnih hormona (Slika 17. i 18.), pošto te stanice ne ekspmiraju niti jedan od istraživanih proteina (37, 154). Međutim, u ovom slučaju bilo bi interesantno istražiti dolazi li do interakcije između proteina SHH i receptora spolnih hormona ukoliko dođe do egzogene eskpresije tih proteina, bilo putem transfekcije stanica SkBr3 s ekspresijskim vetorima koji sadrže kodirajuću regiju gena SHH, ESR1 ili AR, ili tretmanom tih stanica s rekombinantnim proteinima SHH i AR ili ER. Također, interakcija između proteina SHH i receptora estrogena možda bi se mogla odvijati preko receptora estrogena beta (ERβ), čija pojačana ekspresija ima antiproliferativni učinak u progresiji raka dojke (172).

Iako se naše istraživanje primarno baziralo na dokazivanje inteakcije između signalnog puta HH-GLI i receptora spolnih hormona u raku dojke preko proteina SHH, neka nedavna istraživanja su pokazala da do takvih interakcija može doći i preko proteina GLI, koji su transkripcijski faktori i glavni efektori signalnog puta HH-GLI i čija aberantna aktivacija dovodi do maligne transformacije stanica (46). Naime, Massah i sur. su pokazali da dolazi do fizičke interakcije između receptora estrogena alfa (ERα) i proteina GLI3 u estrogen receptor-pozitivnim staničnim linijama raka dojke MCF-7 i T47D, dok tu interakciju dokida tretman fulvestrantom, koji je selektivni snižavatelj estrogenskih receptora (SERD) (173). Li i sur. su

pokazali da je također moguća fizička interakcija između proteina GLI3 i receptora androgena u stanicama raka prostate LnCAP koje su tretirane sintetskim androgenom metribolonom (174), a još je ranije bilo pokazano da je moguća i fizička interakcija između receptora androgena i proteina GLI2 (175).

Iako nismo dokazali interakciju između proteina SHH i receptora estrogena i androgena u *in vitro* modelu raka dojke koji eksprimira navedene receptore spolnih hormona, važno je naglasiti da je prema našim spoznajama ovo prvo istraživanje koje je to uopće istraživalo. Dosadašnja istraživanja dokazuju da postoji fizička interakcija između članova signalnog puta HH-GLI i receptora spolnih hormona u hormon-ovisnim tipovima raka dojke, ali da je nužno otkriti prave uvjete staničnog uzgoja prilikom kojih do te fizičke interakcije i dolazi, što će biti glavni cilj naših daljnjih istraživanja. Istraživanja drugih znansvenika su pokazala i da tretmani anti-hormonskim lijekovima koji se primjenjuju u kliničkoj praksi dokidaju interakciju signalnog puta HH-GLI i receptora estrogena i androgena, što dodatno rasvjetljava molekularne mehanizme djelovanja tih lijekova. Naša buduća istraživanja biti će usmjerena i na otkrivanju ima li kombinacija terapija koje uključuju anti-hormonske lijekove i antagoniste signalnog puta HH-GLI bolji terapijski učinak, posebno kod raka dojke kod kojeg je došlo do rezistencije na anti-hormonske lijekove. Daljnja istraživanja interakcije signalnog puta HH-GLI i receptora spolnih hormona u različitim molekularnim potipovima raka dojke svakako ima perspektivu primjenjivosti u kliničkoj praksi.

7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Ekspresija proteina SHH uočena je u 98% (183/186) uzoraka te je izražena imunohistoskôrom raspona vrijednosti 0-300 dok je medijan ekspresije 150 (Tablica 3.).
2. Androgeni receptor imunohistokemijski smo uočili u 91% (169/186) analiziranih karcinoma. Medijan pozitivnosti odnosno postotka nuklearnog obojenja je 80, a raspon 0-100 (Tablica 3.).
3. Na staničnim linijama karcinoma dojke (MCF-7 i SkBr3) koje pokazuju različitu ekspresiju proteina SHH i receptora androgena i estrogena nismo uspjeli dokazati fizičku interakciju proteina SHH s tim receptorima.
4. Veća ekspresija proteina SHH i AR povezane su s povoljnijim kliničko-patološkim značajkama karcinoma i manje agresivnim molekularnim podtipovima.
5. Veća ekspresija proteina SHH i AR povezane su s manje učestalim smrtnim ishodom, razvojem recidiva i metastaza. Također je i trajanje preživljenja do pojave smrti, recidiva i metastaza dulje u karcinoma s većom ekspresijom proteina SHH i AR.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja : Aktivnost HH-GLI signalnog kao i receptora androgena opisana je u karcinomu dojke, no i dalje bez jasnog mehanizma djelovanja pa tako i jasne uloge. U ovom istraživanju na 186 arhivskih uzoraka karcinoma dojke smo ustanovili ekspresiju proteina SHH i receptora androgena te istražili povezanost tih ekspresija s kliničko-patološkim značajkama karcinoma dojke i pojedinih molekularnih podtipova. Istražili smo povezanost ekspresija navedenih proteina s ukupnim preživljenjem, preživljenjem do pojave recidiva, odnosno metastaza te pojavnošću smrti, recidiva i metastaza.Također smo ispitali mogućnost fizičke interakcije proteina SHH s receptorom androgena i estrogena potaknuti nedavnom spoznajom o neposrednoj fizičkoj interakciji proteina SHH i receptora androgena na staničnom modelu karcinoma prostate.

Nacrt studije : Istraživanje je provedeno kao presječno s povijesnim podatcima.

Materijali i metode : Korišten je arhivski materijal Kliničkog zavoda za patologiju KB Dubrava. Odabrani su uzorci karcinoma dojke žena operiranih u periodu 2010.g.-2015.g. koji su konsekutivno razvrstavani u skupine prema molekularnom podtipu do planiranog broja uzoraka za svaku podskupinu. Imunohistokemijski su se odredile ekspresije proteina SHH i receptora androgena, a fizička interakcija istražila se pomoću PLA (proximity ligation assay) metode na staničnim linijama MCF-7 i SkBr3.

Rezultati : Nije pronađena statistički značajna povezanost između ekspresije proteina SHH i kliničko-patoloških značajki te ishoda iako su veće vrijednosti ekspresije u hormonski pozitivnih tumora, luminalnih podtipova, tumora s manje zahvaćenih limfnih čvorova isto tako veća ekspresija SHH je povezana s manje učestalim smrtnim ishodom, razvojem recidiva i metastaza. Visoka ekspresija proteina SHH značajno je povezana s ranijim razvojem recidiva (P=0,022) iako je uočena na malenom broju uzoraka. Ukupno preživljenje kraće je u bolesnika s većom ekspresijom proteina SHH, no bez statističke značajnosti kao i kasniji razvoj metastaza. Ustanovljena je značajna povezanost visoke ekspresije AR i prisutnosti receptora estrogena i progesterona, odnosno s luminalnim podtipovima ($P < 0,001$), karcinoma s in-situ komponentom ($P = 0,01$), karcinoma s Ki67 < 20 % ($P = 0,0001$) te manjim karcinomima ($P = 0,007$). PLA metodom u našem istraživanju nije dokazana fizička interakcija proteina SHH s

receptorima estrogena i androgena. Prema opažanjima u ovom istraživanju visoke ekspresije recptora androgena i proteina SHH povezane s povoljnijim kliničko-patološkim karakteristikama i ishodom.

Ključne riječi : imunohistokemija; neoplazme dojke; protein sonic hedgehog; receptor androgena; receptor estrogena; tumorski biljezi

9. SUMMARY

Objectives: The activation of HH-GLI signalling pathway as well as the androgen receptor have been described in breast cancer, but a clear pathophysiological mechanism of action and thus a clear role still remains unknown. In this study, we determined the expression of the SHH protein and the androgen receptor on 186 archival samples of breast cancer and researched the correlation of these expressions with clinical and pathological features of breast cancer and individual molecular subtypes. We researched the correlation of the expression of the above-mentioned proteins with overall survival, recurrence free survival, metastasis free survival, and the occurrence of death, recurrence, and metastases. Prompted by the recent knowledge of the direct physical interaction of the SHH protein and the androgen receptor on prostate cancer cell lines, we also examined the possibility of physical interaction of the SHH protein with the androgen and estrogen receptors.

Study design: Cross-sectional study with archival data.

Materials and methods: Studied samples were obtained from the Pathology Department archive, Clinical Hospital Dubrava. Breast cancer samples were selected from women operated on in the period of 2010-2015. Samples were consecutively classified into groups according to molecular subtype up to the planned number of samples for each subgroup. Expressions of SHH protein and androgen receptor were determined immunohistochemically, and physical interaction was researched using the PLA (proximity ligation assay) method on MCF-7 and SkBr3 cell lines.

Results: No statistically significant association was found between SHH protein expression and clinical-pathological features and outcomes, although higher expression values were present in hormone-positive tumors, luminal subtypes, tumors with fewer affected lymph nodes. Higher SHH expression is also associated with less frequent death, relapse, and metastasis. There was a statistically significant association between high SHH protein expression and earlier development of recurrence ($P = 0.022$), although it was observed in a small number of samples. Overall survival is shorter for patients with higher SHH protein expression, but without a statistical significance, as well as the later development of metastases. A significant association was found between high AR expression and the presence of estrogen and

progesterone receptors, i.e., with luminal subtypes (P < 0.001), carcinoma with 'in-situ' component (P = 0.01), carcinoma with Ki67 < 20% (P = 0.0001) and smaller cancers (P = 0.007). Physical interaction of SHH protein with estrogen and androgen receptors was not proven in our research using the PLA method. Findings of this study showed that high expressions of SHH protein and androgen receptor are associated with favourable clinical and pathological features and a more favourable outcome.

Key words : Biomarkers, Tumor; Breast Neoplasms; Hedgehog Proteins; Immunohistochemistry; Receptors, Androgen; Receptors, Estrogen

10. LITERATURA

1. (WHO) WHO. Breast cancer: prevention and control 2013 [Available from: www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html.

2. Anderson BO, Yip CH, Smith RA, Shyyan R, Sener SF, Eniu A, et al. Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: overview of the Breast Health Global Initiative Global Summit 2007. Cancer. 2008;113(8 Suppl):2221-43.

3. (WHO) WHO. The Global Cancer Observatory. 2018 statistics. 2018 [Available from: http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf.

4. Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu 2020 [Available from: https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/.

5. Lakhani SR EI, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast

4th ed: WHO Press; 2012.

6. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. CA Cancer J Clin. 2017;67(2):93-9.

7. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000;406(6797):747-52.

8. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(19):10869-74.

9. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(14):8418-23.

10. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(18):10393-8.

11. Feng Q, He B. Androgen Receptor Signaling in the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. Front Oncol. 2019;9:858.
12. Huang R, Han J, Liang X, Sun S, Jiang Y, Xia B, et al. Androgen Receptor Expression and Bicalutamide Antagonize Androgen Receptor Inhibit beta-Catenin Transcription Complex in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer. Cell Physiol Biochem. 2017;43(6):2212-25.
13. Murria R, Palanca S, de Juan I, Alenda C, Egoavil C, Segui FJ, et al. Immunohistochemical, genetic and epigenetic profiles of hereditary and triple negative breast cancers. Relevance in personalized medicine. Am J Cancer Res. 2015;5(7):2330-43.
14. Hickey TE, Robinson JL, Carroll JS, Tilley WD. Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? Mol Endocrinol. 2012;26(8):1252-67.
15. Salvi S, Bonafe M, Bravaccini S. Androgen receptor in breast cancer: A wolf in sheep's clothing? A lesson from prostate cancer. Semin Cancer Biol. 2020;60:132-7.
16. Vasiliou SK, Diamandis EP. Androgen receptor: A promising therapeutic target in breast cancer. Crit Rev Clin Lab Sci. 2019;56(3):200-23.
17. Suzuki T, Miki Y, Takagi K, Hirakawa H, Moriya T, Ohuchi N, et al. Androgens in human breast carcinoma. Med Mol Morphol. 2010;43(2):75-81.
18. Christopoulos PF, Vlachogiannis NI, Vogkou CT, Koutsilieris M. The Role of the Androgen Receptor Signaling in Breast Malignancies. Anticancer Res. 2017;37(12):6533-40.
19. Chen M, Yang Y, Xu K, Li L, Huang J, Qiu F. Androgen Receptor in Breast Cancer: From Bench to Bedside. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:573.
20. Park S, Koo J, Park HS, Kim JH, Choi SY, Lee JH, et al. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. Ann Oncol. 2010;21(3):488-92.
21. Bozovic-Spasojevic I, Zardavas D, Brohee S, Ameye L, Fumagalli D, Ades F, et al. The Prognostic Role of Androgen Receptor in Patients with Early-Stage Breast Cancer: A Meta-analysis of Clinical and Gene Expression Data. Clin Cancer Res. 2017;23(11):2702-12.
22. Collins LC, Cole KS, Marotti JD, Hu R, Schnitt SJ, Tamimi RM. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. Mod Pathol. 2011;24(7):924-31.
23. Safarpour D, Tavassoli FA. A targetable androgen receptor-positive breast cancer subtype hidden among the triple-negative cancers. Arch Pathol Lab Med. 2015;139(5):612-7.

24. Guo W, Wang W, Zhu Y, Zhu X, Shi Z, Wang Y. HER2 status in molecular apocrine breast cancer: associations with clinical, pathological, and molecular features. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(7):8008-17.

25. Micello D, Marando A, Sahnane N, Riva C, Capella C, Sessa F. Androgen receptor is frequently expressed in HER2-positive, ER/PR-negative breast cancers. Virchows Arch. 2010;457(4):467-76.

26. Bhattarai S, Klimov S, Mittal K, Krishnamurti U, Li XB, Oprea-Ilies G, et al. Prognostic Role of Androgen Receptor in Triple Negative Breast Cancer: A Multi-Institutional Study. Cancers (Basel). 2019;11(7).

27. Hilborn E, Gacic J, Fornander T, Nordenskjold B, Stal O, Jansson A. Androgen receptor expression predicts beneficial tamoxifen response in oestrogen receptor-alpha-negative breast cancer. Br J Cancer. 2016;114(3):248-55.

28. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature. 1980;287(5785):795-801.

29. Nusslein-Volhard C, Lohs-Schardin M, Sander K, Cremer C. A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of Drosophila. Nature. 1980;283(5746):474-6.

30. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. Nat Immunol. 2001;2(2):172-80.

31. Merchant A, Joseph G, Wang Q, Brennan S, Matsui W. Gli1 regulates the proliferation and differentiation of HSCs and myeloid progenitors. Blood. 2010;115(12):2391-6.

32. Tukachinsky H, Lopez LV, Salic A. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. J Cell Biol. 2010;191(2):415-28.

33. Huangfu D, Anderson KV. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(32):11325-30.

34. Wheway G, Nazlamova L, Hancock JT. Signaling through the Primary Cilium. Front Cell Dev Biol. 2018;6:8.

35. Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, et al. Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. Curr Biol. 1999;9(19):1119-22.

36. Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog signal transduction network. Sci Signal. 2012;5(246):re6.
37. Sabol M, Trnski D, Uzarevic Z, Ozretic P, Musani V, Rafaj M, et al. Combination of cyclopamine and tamoxifen promotes survival and migration of mcf-7 breast cancer cells--interaction of hedgehog-gli and estrogen receptor signaling pathways. PLoS One. 2014;9(12):e114510.
38. Weed M, Mundlos S, Olsen BR. The role of sonic hedgehog in vertebrate development. Matrix Biol. 1997;16(2):53-8.
39. Ingham PW. Hedgehog signaling: a tale of two lipids. Science. 2001;294(5548):1879-81.
40. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. Genes Dev. 2001;15(23):3059-87.
41. Jia J, Jiang J. Decoding the Hedgehog signal in animal development. Cell Mol Life Sci. 2006;63(11):1249-65.
42. Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. Exp Cell Res. 1999;253(1):25-33.
43. Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothened receptor complex. Curr Biol. 1999;9(2):76-84.
44. Kawakami A, Nojima Y, Toyoda A, Takahoko M, Satoh M, Tanaka H, et al. The zebrafish-secreted matrix protein you/scube2 is implicated in long-range regulation of hedgehog signaling. Curr Biol. 2005;15(5):480-8.
45. Masai I, Yamaguchi M, Tonou-Fujimori N, Komori A, Okamoto H. The hedgehog-PKA pathway regulates two distinct steps of the differentiation of retinal ganglion cells: the cell-cycle exit of retinoblasts and their neuronal maturation. Development. 2005;132(7):1539-53.
46. Sabol M, Trnski D, Musani V, Ozretic P, Levanat S. Role of GLI Transcription Factors in Pathogenesis and Their Potential as New Therapeutic Targets. Int J Mol Sci. 2018;19(9).
47. Cordero J, Jassim O, Bao S, Cagan R. A role for wingless in an early pupal cell death event that contributes to patterning the Drosophila eye. Mech Dev. 2004;121(12):1523-30.
48. Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Vargas F, Scherer SW, Tsui LC, et al. Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly. Hum Mol Genet. 1997;6(11):1847-53.

49. Roessler E, Ward DE, Gaudenz K, Belloni E, Scherer SW, Donnai D, et al. Cytogenetic rearrangements involving the loss of the Sonic Hedgehog gene at 7q36 cause holoprosencephaly. Hum Genet. 1997;100(2):172-81.
50. Levanat S, Gorlin RJ, Fallet S, Johnson DR, Fantasia JE, Bale AE. A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome. Nat Genet. 1996;12(1):85-7.
51. Unden AB, Holmberg E, Lundh-Rozell B, Stahle-Backdahl M, Zaphiropoulos PG, Toftgard R, et al. Mutations in the human homologue of Drosophila patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation. Cancer Res. 1996;56(20):4562-5.
52. Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. Nature. 2002;418(6901):979-83.
53. Radhakrishna U, Bornholdt D, Scott HS, Patel UC, Rossier C, Engel H, et al. The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations. Am J Hum Genet. 1999;65(3):645-55.
54. Kang S, Graham JM, Jr., Olney AH, Biesecker LG. GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. Nat Genet. 1997;15(3):266-8.
55. Ogden SK, Ascano M, Jr., Stegman MA, Robbins DJ. Regulation of Hedgehog signaling: a complex story. Biochem Pharmacol. 2004;67(5):805-14.
56. Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. Am J Hum Genet. 2000;67(5):1047-54.
57. Hatsell SJ, Cowin P. Gli3-mediated repression of Hedgehog targets is required for normal mammary development. Development. 2006;133(18):3661-70.
58. Gallego MI, Beachy PA, Hennighausen L, Robinson GW. Differential requirements for shh in mammary tissue and hair follicle morphogenesis. Dev Biol. 2002;249(1):131-9.
59. Kouros-Mehr H, Werb Z. Candidate regulators of mammary branching morphogenesis identified by genome-wide transcript analysis. Dev Dyn. 2006;235(12):3404-12.
60. Lewis MT, Ross S, Strickland PA, Sugnet CW, Jimenez E, Hui C, et al. The Gli2 transcription factor is required for normal mouse mammary gland development. Dev Biol. 2001;238(1):133-44.
61. Lewis MT. Hedgehog signaling in mouse mammary gland development and neoplasia. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2001;6(1):53-66.

62. Michno K, Boras-Granic K, Mill P, Hui CC, Hamel PA. Shh expression is required for embryonic hair follicle but not mammary gland development. Dev Biol. 2003;264(1):153-65.
63. Velanovich V, Yood MU, Bawle U, Nathanson SD, Strand VF, Talpos GB, et al. Racial differences in the presentation and surgical management of breast cancer. Surgery. 1999;125(4):375-9.
64. Hennighausen L. The genetics and pathology of mouse mammary cancer. Semin Cancer Biol. 2001;11(3):239-44.
65. Chang H, Balenci L, Okolowsky N, Muller WJ, Hamel PA. Mammary epithelial-restricted expression of activated c-src rescues the block to mammary gland morphogenesis due to the deletion of the C-terminus of Patched-1. Dev Biol. 2012;370(2):187-97.
66. Moraes RC, Zhang X, Harrington N, Fung JY, Wu MF, Hilsenbeck SG, et al. Constitutive activation of smoothened (SMO) in mammary glands of transgenic mice leads to increased proliferation, altered differentiation and ductal dysplasia. Development. 2007;134(6):1231-42.
67. Visbal AP, LaMarca HL, Villanueva H, Toneff MJ, Li Y, Rosen JM, et al. Altered differentiation and paracrine stimulation of mammary epithelial cell proliferation by conditionally activated Smoothened. Dev Biol. 2011;352(1):116-27.
68. Okolowsky N, Furth PA, Hamel PA. Oestrogen receptor-alpha regulates non-canonical Hedgehog-signalling in the mammary gland. Dev Biol. 2014;391(2):219-29.
69. Harvey MC, Fleet A, Okolowsky N, Hamel PA. Distinct effects of the mesenchymal dysplasia gene variant of murine Patched-1 protein on canonical and non-canonical Hedgehog signaling pathways. J Biol Chem. 2014;289(15):10939-49.
70. McDermott KM, Liu BY, Tlsty TD, Pazour GJ. Primary cilia regulate branching morphogenesis during mammary gland development. Curr Biol. 2010;20(8):731-7.
71. Lowry WE, Richter L. Signaling in adult stem cells. Front Biosci. 2007;12:3911-27.
72. Le H, Kleinerman R, Lerman OZ, Brown D, Galiano R, Gurtner GC, et al. Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. Wound Repair Regen. 2008;16(6):768-73.
73. Hui M, Cazet A, Nair R, Watkins DN, O'Toole SA, Swarbrick A. The Hedgehog signalling pathway in breast development, carcinogenesis and cancer therapy. Breast Cancer Res. 2013;15(2):203.
74. Faigle R, Song H. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. Biochim Biophys Acta. 2013;1830(2):2435-48.

75. Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M, Chesselet MF, Vourc'h P, Yost MJ, et al. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. Cell Biochem Biophys. 2004;40(1):1-80.

76. Omenetti A, Bass LM, Anders RA, Clemente MG, Francis H, Guy CD, et al. Hedgehog activity, epithelial-mesenchymal transitions, and biliary dysmorphogenesis in biliary atresia. Hepatology. 2011;53(4):1246-58.

77. Omenetti A, Diehl AM. Hedgehog signaling in cholangiocytes. Curr Opin Gastroenterol. 2011;27(3):268-75.

78. Omenetti A, Choi S, Michelotti G, Diehl AM. Hedgehog signaling in the liver. J Hepatol. 2011;54(2):366-73.

79. Michaud EJ, Yoder BK. The primary cilium in cell signaling and cancer. Cancer Res. 2006;66(13):6463-7.

80. Nicolis SK. Cancer stem cells and "stemness" genes in neuro-oncology. Neurobiol Dis. 2007;25(2):217-29.

81. Mimeault M, Mehta PP, Hauke R, Henichart JP, Depreux P, Lin MF, et al. Improvement of cytotoxic effects induced by mitoxantrone on hormone-refractory metastatic prostate cancer cells by co-targeting epidermal growth factor receptor and hedgehog signaling cascades. Growth Factors. 2007;25(6):400-16.

82. Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. J Cell Mol Med. 2007;11(5):981-1011.

83. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Recent advances on the molecular mechanisms involved in the drug resistance of cancer cells and novel targeting therapies. Clin Pharmacol Ther. 2008;83(5):673-91.

84. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. Clin Pharmacol Ther. 2007;82(3):252-64.

85. Mimeault M, Johansson SL, Vankatraman G, Moore E, Henichart JP, Depreux P, et al. Combined targeting of epidermal growth factor receptor and hedgehog signaling by gefitinib and cyclopamine cooperatively improves the cytotoxic effects of docetaxel on metastatic prostate cancer cells. Mol Cancer Ther. 2007;6(3):967-78.

86. Mimeault M, Batra SK. Interplay of distinct growth factors during epithelial mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies. Ann Oncol. 2007;18(10):1605-19.
87. Mimeault M, Batra SK. Functions of tumorigenic and migrating cancer progenitor cells in cancer progression and metastasis and their therapeutic implications. Cancer Metastasis Rev. 2007;26(1):203-14.
88. Mimeault M, Venkatraman G, Johansson SL, Moore E, Henichart JP, Depreux P, et al. Novel combination therapy against metastatic and androgen-independent prostate cancer by using gefitinib, tamoxifen and etoposide. Int J Cancer. 2007;120(1):160-9.
89. Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, et al. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(10):4048-53.
90. Remsberg JR, Lou H, Tarasov SG, Dean M, Tarasova NI. Structural analogues of smoothened intracellular loops as potent inhibitors of Hedgehog pathway and cancer cell growth. J Med Chem. 2007;50(18):4534-8.
91. Dembinski JL, Krauss S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. Clin Exp Metastasis. 2009;26(7):611-23.
92. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. Science. 1987;236(4797):70-3.
93. Booth DR. The hedgehog signalling pathway and its role in basal cell carcinoma. Cancer Metastasis Rev. 1999;18(2):261-84.
94. Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, et al. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(14):5895-900.
95. Bar-Eli M. The HOG-GLI face of melanoma. Pigment Cell Res. 2007;20(5):341-2.
96. Vorechovsky I, Unden AB, Sandstedt B, Toftgard R, Stahle-Backdahl M. Trichoepitheliomas contain somatic mutations in the overexpressed PTCH gene: support for a gatekeeper mechanism in skin tumorigenesis. Cancer Res. 1997;57(21):4677-81.
97. Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R, Unden AB. Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. J Pathol. 2006;208(1):17-25.

98. Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C. Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. Int J Cancer. 2004;110(6):831-7.

99. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. Nature. 2004;431(7009):707-12.

100. Watkins DN, Berman DM, Baylin SB. Hedgehog signaling: progenitor phenotype in small-cell lung cancer. Cell Cycle. 2003;2(3):196-8.

101. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. Nature. 2003;422(6929):313-7.

102. Fujita E, Khoroku Y, Urase K, Tsukahara T, Momoi MY, Kumagai H, et al. Involvement of Sonic hedgehog in the cell growth of LK-2 cells, human lung squamous carcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun. 1997;238(2):658-64.

103. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. Nature. 2003;425(6960):851-6.

104. LaRue H, Simoneau M, Aboulkassim TO, Lemieux P, Girard J, Hamed S, et al. [The PATCHED/Sonic Hedgehog signalling pathway in superficial bladder cancer]. Med Sci (Paris). 2003;19(10):920-5.

105. Thievessen I, Wolter M, Prior A, Seifert HH, Schulz WA. Hedgehog signaling in normal urothelial cells and in urothelial carcinoma cell lines. J Cell Physiol. 2005;203(2):372-7.

106. Vila G, Theodoropoulou M, Stalla J, Tonn JC, Losa M, Renner U, et al. Expression and function of sonic hedgehog pathway components in pituitary adenomas: evidence for a direct role in hormone secretion and cell proliferation. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(12):6687-94.

107. Vila G, Papazoglou M, Stalla J, Theodoropoulou M, Stalla GK, Holsboer F, et al. Sonic hedgehog regulates CRH signal transduction in the adult pituitary. FASEB J. 2005;19(2):281-3.

108. Katano M. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. Cancer Lett. 2005;227(2):99-104.

109. Chen YJ, Sims-Mourtada J, Izzo J, Chao KS. Targeting the hedgehog pathway to mitigate treatment resistance. Cell Cycle. 2007;6(15):1826-30.

110. Chen MH, Wilson CW, Chuang PT. SnapShot: hedgehog signaling pathway. Cell. 2007;130(2):386.
111. Chen Y, Li X, Tian L, Lui VC, Dallman MJ, Lamb JR, et al. Inhibition of sonic hedgehog signaling reduces chronic rejection and prolongs allograft survival in a rat orthotopic small bowel transplantation model. Transplantation. 2007;83(10):1351-7.
112. Liao X, Siu MK, Au CW, Chan QK, Chan HY, Wong ES, et al. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway contributes to endometrial carcinogenesis through beta-catenin. Mod Pathol. 2009;22(6):839-47.
113. Liao X, Siu MK, Au CW, Wong ES, Chan HY, Ip PP, et al. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. Carcinogenesis. 2009;30(1):131-40.
114. Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, Banerji SK, Ghosh R, Roy R, et al. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. Leukemia. 2007;21(5):949-55.
115. Riobo-Del Galdo NA, Lara Montero A, Wertheimer EV. Role of Hedgehog Signaling in Breast Cancer: Pathogenesis and Therapeutics. Cells. 2019;8(4).
116. Souzaki M, Kubo M, Kai M, Kameda C, Tanaka H, Taguchi T, et al. Hedgehog signaling pathway mediates the progression of non-invasive breast cancer to invasive breast cancer. Cancer Sci. 2011;102(2):373-81.
117. Noman AS, Uddin M, Rahman MZ, Nayeem MJ, Alam SS, Khatun Z, et al. Overexpression of sonic hedgehog in the triple negative breast cancer: clinicopathological characteristics of high burden breast cancer patients from Bangladesh. Sci Rep. 2016;6:18830.
118. Benvenuto M, Masuelli L, De Smaele E, Fantini M, Mattera R, Cucchi D, et al. In vitro and in vivo inhibition of breast cancer cell growth by targeting the Hedgehog/GLI pathway with SMO (GDC-0449) or GLI (GANT-61) inhibitors. Oncotarget. 2016;7(8):9250-70.
119. Jeng KS, Sheen IS, Jeng WJ, Yu MC, Hsiau HI, Chang FY. High expression of Sonic Hedgehog signaling pathway genes indicates a risk of recurrence of breast carcinoma. Onco Targets Ther. 2013;7:79-86.
120. Riaz SK, Khan JS, Shah STA, Wang F, Ye L, Jiang WG, et al. Involvement of hedgehog pathway in early onset, aggressive molecular subtypes and metastatic potential of breast cancer. Cell Commun Signal. 2018;16(1):3.

121. Sun Y, Wang Y, Fan C, Gao P, Wang X, Wei G, et al. Estrogen promotes stemness and invasiveness of ER-positive breast cancer cells through Gli1 activation. Mol Cancer. 2014;13:137.
122. Fillmore CM, Gupta PB, Rudnick JA, Caballero S, Keller PJ, Lander ES, et al. Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(50):21737-42.
123. Deng H, Zhang XT, Wang ML, Zheng HY, Liu LJ, Wang ZY. ER-alpha36-mediated rapid estrogen signaling positively regulates ER-positive breast cancer stem/progenitor cells. PLoS One. 2014;9(2):e88034.
124. Kurebayashi J, Kanomata N, Yamashita T, Shimo T, Moriya T. Antitumor and anticancer stem cell activities of eribulin mesylate and antiestrogens in breast cancer cells. Breast Cancer. 2016;23(3):425-36.
125. O'Brien CS, Farnie G, Howell SJ, Clarke RB. Breast cancer stem cells and their role in resistance to endocrine therapy. Horm Cancer. 2011;2(2):91-103.
126. Cui W, Wang LH, Wen YY, Song M, Li BL, Chen XL, et al. Expression and regulation mechanisms of Sonic Hedgehog in breast cancer. Cancer Sci. 2010;101(4):927-33.
127. O'Toole SA, Machalek DA, Shearer RF, Millar EK, Nair R, Schofield P, et al. Hedgehog overexpression is associated with stromal interactions and predicts for poor outcome in breast cancer. Cancer Res. 2011;71(11):4002-14.
128. Matevossian A, Resh MD. Hedgehog Acyltransferase as a target in estrogen receptor positive, HER2 amplified, and tamoxifen resistant breast cancer cells. Mol Cancer. 2015;14:72.
129. Ramaswamy B, Lu Y, Teng KY, Nuovo G, Li X, Shapiro CL, et al. Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. Cancer Res. 2012;72(19):5048-59.
130. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. Cell Stem Cell. 2007;1(5):555-67.
131. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. Clin Cancer Res. 2010;16(1):45-55.

132. Cao X, Geradts J, Dewhirst MW, Lo HW. Upregulation of VEGF-A and CD24 gene expression by the tGLI1 transcription factor contributes to the aggressive behavior of breast cancer cells. Oncogene. 2012;31(1):104-15.
133. Harris LG, Pannell LK, Singh S, Samant RS, Shevde LA. Increased vascularity and spontaneous metastasis of breast cancer by hedgehog signaling mediated upregulation of cyr61. Oncogene. 2012;31(28):3370-80.
134. Johnson RW, Nguyen MP, Padalecki SS, Grubbs BG, Merkel AR, Oyajobi BO, et al. TGF-beta promotion of Gli2-induced expression of parathyroid hormone-related protein, an important osteolytic factor in bone metastasis, is independent of canonical Hedgehog signaling. Cancer Res. 2011;71(3):822-31.
135. Sterling JA, Oyajobi BO, Grubbs B, Padalecki SS, Munoz SA, Gupta A, et al. The hedgehog signaling molecule Gli2 induces parathyroid hormone-related peptide expression and osteolysis in metastatic human breast cancer cells. Cancer Res. 2006;66(15):7548-53.
136. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. Cell. 1993;75(7):1417-30.
137. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. Cell. 1993;75(7):1401-16.
138. Marigo V, Roberts DJ, Lee SM, Tsukurov O, Levi T, Gastier JM, et al. Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the Drosophila segment polarity gene hedgehog. Genomics. 1995;28(1):44-51.
139. Pathi S, Pagan-Westphal S, Baker DP, Garber EA, Rayhorn P, Bumcrot D, et al. Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. Mech Dev. 2001;106(1-2):107-17.
140. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. Science. 1996;273(5275):613-22.
141. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. Genes Dev. 1999;13(16):2072-86.
142. Veltmaat JM, Van Veelen W, Thiery JP, Bellusci S. Identification of the mammary line in mouse by Wnt10b expression. Dev Dyn. 2004;229(2):349-56.

143. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. Curr Biol. 1996;6(3):298-304.
144. Day TF, Yang Y. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. J Bone Joint Surg Am. 2008;90 Suppl 1:19-24.
145. Mann RK, Beachy PA. Novel lipid modifications of secreted protein signals. Annu Rev Biochem. 2004;73:891-923.
146. Buglino JA, Resh MD. Hhat is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. J Biol Chem. 2008;283(32):22076-88.
147. Incardona JP, Roelink H. The role of cholesterol in Shh signaling and teratogen-induced holoprosencephaly. Cell Mol Life Sci. 2000;57(12):1709-19.
148. Incardona JP, Gaffield W, Lange Y, Cooney A, Pentchev PG, Liu S, et al. Cyclopamine inhibition of Sonic hedgehog signal transduction is not mediated through effects on cholesterol transport. Dev Biol. 2000;224(2):440-52.
149. Incardona JP, Eaton S. Cholesterol in signal transduction. Curr Opin Cell Biol. 2000;12(2):193-203.
150. Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, et al. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. Cell. 1999;99(7):803-15.
151. Vogt A, Chuang PT, Hebert J, Hwang J, Lu Y, Kopelovich L, et al. Immunoprevention of basal cell carcinomas with recombinant hedgehog-interacting protein. J Exp Med. 2004;199(6):753-61.
152. Trnski D, Sabol M, Tomic S, Stefanac I, Mrcela M, Musani V, et al. SHH-N non-canonically sustains androgen receptor activity in androgen-independent prostate cancer cells. Sci Rep. 2021;11(1):14880.
153. Macedo LF, Guo Z, Tilghman SL, Sabnis GJ, Qiu Y, Brodie A. Role of androgens on MCF-7 breast cancer cell growth and on the inhibitory effect of letrozole. Cancer Res. 2006;66(15):7775-82.
154. Azariadis K, Kiagiadaki F, Pelekanou V, Bempi V, Alexakis K, Kampa M, et al. Androgen Triggers the Pro-Migratory CXCL12/CXCR4 Axis in AR-Positive Breast Cancer Cell Lines: Underlying Mechanism and Possible Implications for the Use of Aromatase Inhibitors in Breast Cancer. Cell Physiol Biochem. 2017;44(1):66-84.
155. Alam MS. Proximity Ligation Assay (PLA). Curr Protoc Immunol. 2018;123(1):e58.

156. Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. Ann Oncol. 2009;20(4):628-35.
157. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. Lancet. 2017;389(10087):2430-42.
158. Gadi VK, Davidson NE. Practical Approach to Triple-Negative Breast Cancer. J Oncol Pract. 2017;13(5):293-300.
159. Turner NC, Ro J, Andre F, Loi S, Verma S, Iwata H, et al. Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. N Engl J Med. 2015;373(3):209-19.
160. Turner NC, Slamon DJ, Ro J, Bondarenko I, Im SA, Masuda N, et al. Overall Survival with Palbociclib and Fulvestrant in Advanced Breast Cancer. N Engl J Med. 2018;379(20):1926-36.
161. Petrova R, Joyner AL. Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. Development. 2014;141(18):3445-57.
162. Riaz SK, Ye L, Sahar NE, Aman D, Qadir J, Khan JS, et al. Transcriptional Profiling of Sonic Hedgehog in a Prospective Cohort of Breast Cancer in a Pakistani Population. Anticancer Res. 2017;37(8):4449-54.
163. Im S, Choi HJ, Yoo C, Jung JH, Jeon YW, Suh YJ, et al. Hedgehog related protein expression in breast cancer: gli-2 is associated with poor overall survival. Korean J Pathol. 2013;47(2):116-23.
164. Bhateja P, Cherian M, Majumder S, Ramaswamy B. The Hedgehog Signaling Pathway: A Viable Target in Breast Cancer? Cancers (Basel). 2019;11(8).
165. Kensler KH, Regan MM, Heng YJ, Baker GM, Pyle ME, Schnitt SJ, et al. Prognostic and predictive value of androgen receptor expression in postmenopausal women with estrogen receptor-positive breast cancer: results from the Breast International Group Trial 1-98. Breast Cancer Res. 2019;21(1):30.
166. Kensler KH, Poole EM, Heng YJ, Collins LC, Glass B, Beck AH, et al. Androgen Receptor Expression and Breast Cancer Survival: Results From the Nurses' Health Studies. J Natl Cancer Inst. 2019;111(7):700-8.
167. Soliman NA, Yussif SM. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. Cancer Biol Med. 2016;13(4):496-504.

168. Yazdani-Charati R, Hajian-Tilaki K, Sharbatdaran M. Comparison of pathologic characteristics of breast cancer in younger and older women. Caspian J Intern Med. 2019;10(1):42-7.
169. Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. Nutr Metab (Lond). 2010;7:47.
170. Sikora MJ, Johnson MD, Lee AV, Oesterreich S. Endocrine Response Phenotypes Are Altered by Charcoal-Stripped Serum Variability. Endocrinology. 2016;157(10):3760-6.
171. Liang ZR, Qu LH, Ma LM. Differential impacts of charcoal-stripped fetal bovine serum on c-Myc among distinct subtypes of breast cancer cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 2020;526(1):267-72.
172. Zhou Y, Liu X. The role of estrogen receptor beta in breast cancer. Biomark Res. 2020;8:39.
173. Massah S, Foo J, Li N, Truong S, Nouri M, Xie L, et al. Gli activation by the estrogen receptor in breast cancer cells: Regulation of cancer cell growth by Gli3. Mol Cell Endocrinol. 2021;522:111136.
174. Li N, Truong S, Nouri M, Moore J, Al Nakouzi N, Lubik AA, et al. Non-canonical activation of hedgehog in prostate cancer cells mediated by the interaction of transcriptionally active androgen receptor proteins with Gli3. Oncogene. 2018;37(17):2313-25.
175. Li N, Chen M, Truong S, Yan C, Buttyan R. Determinants of Gli2 co-activation of wildtype and naturally truncated androgen receptors. Prostate. 2014;74(14):1400-10.

11. ŽIVOTOPIS

Opći podatci :

Ime i prezime : Ivan Budimir

Adresa : Bisačka ulica 14, 10000, Zagreb

Telefon : +385981859191

e-mail : ivan.budimir.marat@gmail.com

Zaposlenje :

2019. - sada : Klinika za plastičnu kirurgiju, KB Dubrava

2018. – 2019. : Odjel za kardiologiju, Opća bolnica Slavonski Brod

2015. – 2018. : Zavod za kardiovaskularnu kirurgiju, Klinika za kardiovaskularne bolesti Magdalena

2014. – 2015. : Zavod za hitnu medicinu Požeško–slavonske županije

2013. – 2014. : Zavod za hitnu medicinu Grada Zagreba

Obrazovanje :

2014. - ... : Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i Zdravstvo

2007. – 2013. : Medicinski fakultet Zagreb

2003. – 2007. : Prirodoslovno-matematička gimnazija Požega

1995. – 2003. : Osnovna škola Zdenka Turkovića Kutjevo

Nagrade :

Dekanova nagrada za najboljeg studenta 2011.g., Medicinski fakultet Zagreb

Publikacije :

Budimir, I., A. S. Macina, I. Alfirevic, Z. A. Korda and M. I. Turina. "Right Coronary Ostial Extra Anatomical Bypass Following an Aortic Root False Aneurysm after a Composite Graft Procedure." J Card Surg 32, no. 9 (2017): 595-596.

Ivan Budimir, Andrija Macina Skopljanac, Igor Alfirevic, Zvonimir Ante Korda. ‘’SURGICAL APPROACH TO THORACOABDOMINAL ANEURYSMS - DEVELOPMENT AND IMPLEMENTATION’’ The Heart Surgery Forum 20, no.9(2017): 204. (Abstr.) - Sažetak

Vlajcic Z, Martic K, Jelec V, Dewing D, Zupcic M, **Budimir I**, Eljuga D, Zic R. Inferior lateral tunneling (ILT) composite separation technique. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2021 Dec;74(12):3443-3476. doi: 10.1016/j.bjps.2021.08.040. Epub 2021 Sep 17. PMID: 34588151.

Budimir, I., A. Demirovic, R. Ivekovic and L. Pazanin. "Epithelioid Hemangioma of the Orbit: Case Report." Acta Clin Croat 54, no. 1 (2015): 92-5.

Budimir, I., M. Gradiser, M. Nikolic, N. Barsic, N. Ljubicic, D. Kralj and **I. Budimir, Jr.** "Glasgow Blatchford, Pre-Endoscopic Rockall and Aims65 Scores Show No Difference in Predicting Rebleeding Rate and Mortality in Variceal Bleeding." Scand J Gastroenterol 51, no. 11 (2016): 1375-9.

Bohnec S., Budimir I., Hrabar D., Babić N., **Budimir Jr I.**, Nikolić M., Pavić I. "Abdominal Ultrasound – the Leading Method in Duodenal Gist Diagnostics." Acta clinica Croatica 56, no. 1 (2017): 5.

Budimir, I., Stojsavljević, S., Hrabar, D., Kralj, D., Bišćanin, A., Kirigin, L.S., ... **Budimir Jr, I.** (2017). ''Bleeding Peptic Ulcer – Tertiary Center Experience: Epidemiology, Treatment and Prognosis.'' Acta clinica Croatica, 56, no. 4, 707-714