

# Pojavnost ER beta u trostruko negativnom karcinomu dojke

---

**Galić Krnjaić, Monika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:266798>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



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

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Monika Galić Krnjaić**

**POJAVNOST ESTROGEN BETA  
RECEPTORA U TROSTRUKO  
NEGATIVNOM KARCINOMU  
DOJKE**

**Diplomski rad**

**Osijek,  
2016.**

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

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Monika Galić Krnjaić**

**POJAVNOST ESTROGEN BETA  
RECEPTORA U TROSTRUKO  
NEGATIVNOM KARCINOMU  
DOJKE**

**Diplomski rad**

**Osijek,  
2016.**

Ovaj rad izrađen je na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra u Osijeku.

Mentor: prof. dr. sc. Branko Dmitrović, dr. med.

Rad ima 32 lista, 7 tablica i 1 slika.

**Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Branku Dmitroviću, dr. med. na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog završnog rada.**

**Najveće hvala mojoj obitelji na razumijevanju i podršci tijekom studiranja.**

**Osijek, 2016.**

**KRATICE:**

ER – estrogenski receptor

PR – progesteronski receptor

HER2/neu – engl. Human epidermal growth factor receptor 2

EGFR – engl. epidermal growth factor receptor – receptor za epidermalni faktor rasta

TNBC – engl. Triple negative breast cancer – trostruko negativni karcinom dojke

ER $\alpha$  – estrogenski receptor alfa

ER $\beta$  – estrogenski receptor beta

DCIS – duktalni karcinom in situ

LCIS – lobularni karcinom in situ

DNK – eng. deoxyribonucleic acid, DNA - deoksiribonukleinska kiselina

RNK – engl. ribonucleic acid, RNA - ribonukleinska kiselina

## SADRŽAJ:

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1. Karcinom dojke .....  | 1         |
| 1.1.1. Histološka klasifikacija tumora dojke .....                     | 1         |
| 1.1.2. Gradus i TNM klasifikacija tumora dojke .....                   | 2         |
| 1.1.3. Estrogenski i progesteronski (hormonski) receptori .....        | 4         |
| 1.1.4. HER2/neu .....  | 5         |
| 1.1.5. Ki67 biljeg proliferacije .....                                 | 6         |
| 1.2. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke .....                   | 6         |
| 1.2.1. Trostruko negativni karcinom dojke .....                        | 7         |
| 1.3. Estrogen i estrogenski receptori u karcinomu dojke .....          | 7         |
| 1.3.1. Estrogen receptor $\beta$ .....                                 | 9         |
| 1.3.2. Izraženost estrogenskih receptora u normalnom tkivu dojke ..... | 9         |
| 1.3.3. Izraženost estrogenskih receptora u karcinomu dojke .....       | 9         |
| <b>2. HIPOTEZA</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....                                   | <b>12</b> |
| <b>4. ISPITANICI I METODE</b> .....                                    | <b>13</b> |
| 4.1. Ustroj studije .....  | 13        |
| 4.2. Ispitanice .....  | 13        |
| 4.3. Metode .....  | 13        |
| 4.3.1. Histološka analiza .....  | 13        |
| 4.3.2. Imunohistokemijska analiza .....                                | 14        |
| 4.3.3. Statistička analiza .....                                       | 14        |
| <b>5. REZULTATI</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>6. RASPRAVA</b> .....   | <b>22</b> |
| <b>7. ZAKLJUČCI</b> .....  | <b>25</b> |

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>8. SAŽETAK.....</b>     | <b>26</b> |
| <b>9. SUMMARY.....</b>     | <b>27</b> |
| <b>10. REFERENCE .....</b> | <b>28</b> |
| <b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>12. PRILOZI.....</b>    | <b>32</b> |



## 1. UVOD

Karcinom dojke je najčešća maligna bolest kod žena i uzrokuje 20 % smrti pa je stoga veliki zdravstveni problem u Hrvatskoj i svijetu. To je heterogena bolest s veoma varijabilnim kliničkim ishodima (1). Smrtnost kao posljedica karcinoma dojke bila je u porastu do 90-ih godina, a nakon toga u razvijenim se zemljama smanjuje. Smanjenje smrtnosti pripisuje se unapređenju rane i precizne dijagnostike i poboljšanoj terapiji (2).

Karcinom dojke ima najveću incidenciju u dobnoj skupini od 45 do 55 godina starosti, a vrlo rijetko obolijevaju žene mlađe od 30 godina. U Hrvatskoj prema podacima iz Registra za rak Hrvatske i Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, rak dojke je najčešći zloćudni tumor u žena i drugi najčešći tumor u populaciji općenito (3).

Usprkos unaprijeđenom ranom otkrivanju i novim terapijama, rak dojke i dalje ima malo petogodišnje preživljenje pacijenata s metastatskim karcinomom dojke (samo 25 %).

### 1.1. Karcinom dojke

Karcinom dojke zloćudni je epitelni tumor dojke koji najčešće nastaje monoklonskom proliferacijom epitela terminalnih kanalića ili duktulo-lobularnih jedinica.

#### 1.1.1. Histološka klasifikacija tumora dojke

Prema histološkom tipu gotovo svi karcinomi dojke svrstavaju se u skupinu adenokarcinoma, dok su ostali tipovi rijetki (4). Prema invazivnosti dijelimo ih na neinvazivne i invazivne oblike:

#### NEINVAZIVNI (NEINFILTRIRAJUĆI, IN SITU) KARCINOM

- Intraduktalni karcinom (DCIS),
- Intraduktalni papilarni karcinom,
- Lobularni karcinom in situ (LCIS).

## INVAZIVNI KARCINOM

Invazivni duktalni karcinom bez posebne oznake (~80 %),

Invazivni lobularni karcinom (~10 %),

Pagetova bolest bradavice (~1 %),

Medularni karcinom (~2 %),

Mucinozni karcinom (~2 %),

Tubularni karcinom (~2 %),

Invazivni papilarni karcinom (~1 %),

Ostali rijetki tumori (~2 %).

### 1.1.2. Gradus i TNM klasifikacija tumora dojke

U svakom se patohistološkom nalazu osim histološkog tipa tumora nalazi i opis stupnja diferencijacije (zrelosti) tumorskih stanica, tzv. gradus tumora. Za određivanje gradusa tumora koristi se metoda Scarff-Bloom-Richardson koju preporučuje i Svjetska zdravstvena organizacija, odnosno njena modifikacija po Elstonu i Ellisu (tzv. Nottinghamska metoda). Analiziraju se tri osobine tumora, koji se graduiraju od 1 do 3: 1. formiranje tubula, 2. nuklearni polimorfizam i 3. broj mitozâ (5).

Određivanje gradusa osim prognostičke ima i terapijsku važnost – vrsta i odabir terapije ovisi o samom gradusu tumora. Histološki gradus izračunava se iz zbroja bodova te imamo tri stupnja:

G1 – dobro diferenciran – tumor sadrži relativno normalne stanice koje sporo rastu i imaju oblik cjevčica: 3 - 5 bodova,

G2 – umjereno diferenciran tumor: 6 - 7 bodova,

G3 – slabo diferenciran - stanice tumora ne nalikuju na normalne stanice te se brzo dijele: 8 - 9 bodova.

Što je tumor slabije diferenciran, u pravilu je lošija prognoza bolesnika.

Nakon obrade, a prije terapijskog postupka, stupanj proširenosti bolesti je potrebno klasificirati (stupnjevati) prema TNM sustavu. U TNM klasifikaciji T označava veličinu primarnog tumora 1 - 4, N zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova 1 - 3 i M prisutnost udaljenih metastaza 0 - 1, kako slijedi:

T: primarni tumor

Tx: primarni tumor ne može se odrediti,

T0: nema vidljivog primarnog tumora ,

TiS: Karcinom in situ, neinvazivni tumor i manji od 0,1 cm,

T1: tumor dojke promjera manjeg ili jednakog 2 cm,

T2: tumor dojke promjera većeg od 2 cm, a manjeg ili jednakog 5 cm,

T3: tumor dojke promjera većeg od 5 cm,

T4: tumor bilo koje veličine koji je zahvatio okolno tkivo, dakle kožu, pluća.

N: regionalni limfni čvorovi

Nx: metastazu u regionalnim limfnim čvorovima nije moguće odrediti,

N0: bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima,

N1: metastaze u 1 - 3 aksilirana limfna čvora,

N2: metastaze u 4 - 9 aksiliranih limfnih čvorova,

N3: metastaze u 10 ili više aksiliranih limfnih čvorova, u limfnim čvorovima ispod ili iznad ključne kosti ili u limfnim čvorovima u dojci.

M udaljene metastaze

Mx: udaljene metastaze nije moguće odrediti,

M0: bez udaljenih metastaza u drugim organima,

M1: prisutne udaljene metastaze, najčešće u kostima, plućima, jetri ili mozgu.

TNM klasifikacija se može odrediti prije početka liječenja na temelju fizikalnog pregleda i drugih dijagnostičkih metoda (ultrazvuk dojki, magnetna rezonanca, mamografija, punkcija, biopsija) te se tako postavljena klasifikacija označava sa cTNM. Kada se klasifikacija obavlja nakon kirurškog zahvata i patohistološkog pregleda, ima oznaku pTNM. Svejedno kako se klasifikacija odredi, prema njoj se bolest svrstava u stadije te je svaki viši stadij bolesti povezan s lošijom prognozom (6).

| Stadij 0    | Tis      | N0       | M0 |
|-------------|----------|----------|----|
| Stadij I    | T1       | N0       | M0 |
| Stadij IIA  | T0,T1    | N1       | M0 |
|             | T2       | N0       | M0 |
| Stadij IIB  | T2       | N1       | M0 |
|             | T3       | N0       | M0 |
| Stadij IIIA | T0,T1,T2 | N2       | M0 |
|             | T3       | N1,N2    | M0 |
| Stadij IIIB | T4       | N0,N1,N2 | M0 |
| Stadij IIIC | Svaki T  | N3       | M0 |
| Stadij IV   | Svaki T  | Svaki N  | M1 |

Slika 1. Stadiji karcinoma dojke prema TNM klasifikaciji

### 1.1.3. Estrogenski i progesteronski (hormonski) receptori

Zbog prognostičke, prediktivne i terapijske važnosti, svakom se novootkrivenom karcinomu dojke rutinski imunohistokemijski određuje izraženost estrogenskih (ER) i progesteronskih (PR) receptora u jezgrama tumorskih stanica.

Jezgre stanica raka dojke mogu u sebi imati receptore što na sebe vežu estrogen i/ili progesteron. Estrogenski i progesteronski receptori su nestabilni, termolabilni proteini koji se nalaze u jezgrama tumorskih stanica, ali i normalnim epitelnim stanicama. Estrogen i progesteron su ženski spolni hormoni koji nastaju u jajnicima, a razgrađuju se uglavnom u

jetri. Tumorske stanice mogu na sebe vezati jedan, oba ili niti jedan hormon. Tumorske stanice koje na sebe vežu estrogen zovemo ER-pozitivnima (ER+), a one koje na sebe vežu progesteron PR-pozitivnima (PR+). Žene čiji je rak pozitivan na hormonske receptore imaju bolju prognozu jer bolje reagiraju na hormonsku terapiju. Postoji više vrsta hormonskih terapija, a odluku koju terapiju će pacijentica primiti, onkolog donosi na temelju starosti pacijentice (premenopauza ili postmenopauza) te vrsti raka. Hormonska terapija raka dojke je djelotvorna kod žena svih godina.

Ekspresija ER-a i PR-a određuje se imunohistokemijski na rezovima uzorka tumora rutinski fiksiranom u formalinu i uklopljenom u parafin. Status ER i PR nije samo važan kao prognostički čimbenik već i kao prediktivni čimbenik za odgovor na hormonsku terapiju (7). Nalaz i jedne pozitivne jezgre smatra se pozitivnim nalazom i indikacijom za hormonsku terapiju bolesnice.

### 1.1.4. HER2/neu

Kod karcinoma dojke pojačana je ekspresija i dva onkogeni iz skupine čimbenika rasta, a to su receptor za epidermalni faktor rasta, EGFR (eng. Epidermal growth factor receptor ili HER1) i HER2/neu. Amplifikacija tih gena povezana je s agresivnijim tijekom bolesti, bržim rastom tumora, pojavom metastaza i progresijom bolesti.

HER2 receptor je transmembranski glikoprotein s aktivnošću tirozin kinaze. Njegova ekspresija je pojačana u 15 – 40 % slučajeva duktalnih invazivnih karcinoma, češće u slabije diferenciranim tumorima.

HER2 status se određuje imunohistokemijski (primjerice Hercep test), a interpretira se metodom „skoriranja“ kao:

0 = Nema membranskog bojenja ili je prisutno u manje od 10 % tumorskih stanica (negativan),

1+ = slabo/jedva vidljivo membransko bojenje u više od 10 % tumorskih stanica (negativan),

2+ = slabo/umjereno, kompletno membransko bojenje u više od 10 % tumorskih stanica (neodređen),

3+ = jako/potpuno membransko bojenje u više od 10 % tumorskih stanica (pozitivan).

Bolesnice s karcinomom koji pokazuje ekspresiju HER2 3+ kandidatkinje su za terapiju trastuzumabom (Herceptinom). Karcinomi koji pokazuju ekspresiju proteina HER2 2+ su potencijalni kandidati za liječenje Herceptinom, ali se dodatno primjenjuje još i metoda in situ hidridizacije kako bi se dodatno izdvojile bolesnice kod kojih se očekuje korist od imunoterapije Herceptinom.

Kod niske ekspresije ili negativne reakcije HER2 proteina ne očekuje se reakcija na liječenje Herceptinom te se pristupa drugim, agresivnijim načinom liječenja (8).

### 1.1.5. Ki67 biljeg proliferacije

Proliferacijska aktivnost je vrlo važan prognostički parametar kod karcinoma dojke. Zbog toga je postotak proliferirajućih tumorskih stanica imunohistokemijski određen pomoću protutijela Ki67 danas rutinski dio patohistološkog nalaza.

Antigen Ki67, nehistski protein velike molekularne mase (359/320 kDa) smatra se najpouzdanijim biljgom stanične proliferacije te se primjenjuje kao prognostički biljeg.

Analiza proliferacijske aktivnosti je mjerenje sposobnosti diobe stanica korištenjem Ki-67 antigena. Općenito veći indeks znači da stanice brže rastu te se i brže dijele pa vrijedi:

Visoka proliferacijska aktivnost  $> 20 \%$ ,

Niska proliferacijska aktivnost  $\leq 20 \%$ .

Veći je poliferacijski indeks povezan s lošijom prognozom (9).

## 1.2. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke

Molekularna klasifikacija karcinoma dojke karcinome pozitivne na hormonske receptore dijeli u 2 skupine: luminal A i luminal B, a karcinome negativne na hormonske receptore u skupine HER2 i engl. basal-like. Različita istraživanja osim spomenutih podtipova spominju i skupinu luminal C i engl. *normal breast-like* skupinu, ali su one slabije definirane. Molekularni

podtipovi međusobno se razlikuju po ekspresiji gena, kliničkim značajkama, odgovoru na terapiju i prognozi (10).

Luminalni A karcinom je pozitivan na estrogenske i/ili progesteronske receptore, HER2 je negativan i ima nizak proliferacijski indeks. Ti tumori odgovaraju na hormonsku terapiju i kemoterapiju te imaju bolju prognozu od luminal B karcinoma.

Luminalni B karcinom je pozitivan na estrogenske i/ili progesteronske receptore, HER2 je negativan ili pozitivan i ima visok proliferacijski indeks. Odgovara na hormonsku terapiju i u slučaju HER2 3+ na imunoterapiju te različito na kemoterapiju.

HER2 tip karcinoma dojke je negativan na hormonske receptore, a HER2 je pozitivan. Odgovara na imunoterapiju i na kemoterapiju baziranu na antraciklinima, no uglavnom je povezan s lošom prognozom.

Basal-like karcinom je negativan na hormonske receptore i na HER2. Generalno nije povezan s lošim prognozama, no ne odgovara na hormonsku i imunoterapiju, osjetljiviji je na kemoterapiju baziranu na platini i PARP inhibitorima (11).

### 1.2.1. Trostruko negativni karcinom dojke

Od svih navedenih tipova karcinoma dojke posebno se ističu tzv. trostruko negativni karcinomi dojke (eng. Triple negative breast cancer, TNBC) koji čine 10 – 17 % svih invazivnih tumora.

Stanice TNBC ne ekspimiraju estrogen, progesteron niti HER2 što tu bolest čini teškom za liječenje. Pacijenti ne reagiraju niti na jednu poznatu terapiju osim na klasičnu kemoterapiju.

TNBC se javlja češće kod mladih žena (< 50 godina), a karakterizira ga visoki gradus i mitotski indeks te ekspresija bazalnih markera što ih ubraja u tumore slične bazalnima (12).

## 1.3. Estrogen i estrogenski receptori u karcinomu dojke

Većina karcinoma dojke je na početku estrogen-ovisna, odnosno u procesu nastanka karcinoma dojke veliku ulogu ima estrogen i estrogenski receptori: estrogenski receptor alfa

(ER $\alpha$ ) i estrogenski receptor beta (ER $\beta$ ). Gubitak ekspresije estrogena znači da rast stanice više nije reguliran estrogenom i ne može biti zaustavljen endokrinom terapijom. Ta je promjena odgovorna za nastanak agresivnijih fenotipova tumora i lošije prognoze. Otvoreno je pitanje je jesu li estrogen pozitivni i negativni tumori različitog podrijetla ili su to samo različiti stadiji u razvoju bolesti.

Estrogeni se prenose krvlju vezani za plazmatski albumin i globuline, veza je labava te se brzo otpuštaju u tkiva. Hormon estrogen je topiv u mastima te prolazi kroz staničnu membranu i djeluje samo u onim stanicama koje sadržavaju receptorske molekule za estrogen.

Ti su receptori bjelančevine koje funkcionalno sadržavaju domenu za ligand (hormon) i DNK (deoksiribonukleinska kiselina) vezujuću domenu. Članovi su superporodice jezgrinih receptora. Kompleks hormon-receptor nakon vezivanja prenosi se iz citoplazme u jezgru gdje se veže za molekulu DNK i dolazi do transkripcije (13).

Za molekulu estrogena poznata su dva različita estrogen receptora, a to su estrogen  $\alpha$  i estrogen  $\beta$ .

ER $\alpha$  (595 aminokiselina) kloniran 1986. g. i ER $\beta$  (530 aminokiselina) kloniran 1996. g. su dva visoko homologna gena, pri čemu gen ESR1, smješten na šestom kromosomu kodira ER $\alpha$ , a gen ESR2 smješten na četrnaestom kromosomu kodira ER $\beta$ . Sadrže 8 egzona i karakteristično za njih je alternativno iskrajanje iRNK gdje se jedan ili više kodirajućih egzona isijeca, što dovodi do nastanka proteina sa izmjenjenim funkcionalnim domenama i dominantno negativnoj ili pozitivnoj aktivnosti ili izostanku biološke aktivnosti proteina. Iako su kodirani različitim genima na različitim kromosomima, ti receptori imaju visoko homologne proteinske strukture (14).



### 1.3.1. Estrogenski receptor $\beta$

Pored wt ER $\beta$  izoforme (eng. wild type „divlji tip“) označen kao ER $\beta$ 1, identificirano je još četiri proteinske izoforme ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 3, ER $\beta$ 4, ER $\beta$ 5 koje nastaju iz istog gena. Te izoforme nastaju kao transkripti koji imaju zajedničke egzone od 1 do 7 i egzon 8 koji je specifičan i različit za svaku izoformu. Osim tih pet različitih izoformi koje nastaju alternativnom ugradnjom jednog od pet različitih egzona 8 na 3' kraju gena, postoje i alternativno obrađeni transkripti koji nastaju delecijom unutrašnjih egzona (15).

### 1.3.2. Izraženost estrogenskih receptora u normalnom tkivu dojke

Istraživanja su pokazala da je ER $\alpha$  izražen u 15 – 30 % luminalnih epitelnih stanica i nigdje drugdje u dojci. ER $\beta$  je izražen u većini luminalnih epitelnih i mioepitelnih stanica, a detektiran je i u fibroblastima i drugim stromalnim stanicama. Tako široka rasprostranjenost ne daje nam mnogo informacija o stvarnoj funkciji ER $\beta$  u tkivu dojke (16).

### 1.3.3. Izraženost estrogenskih receptora u karcinomu dojke

ER $\alpha$  se eksprimira u duktalnom i lobularnom epitelu, dok je ER $\beta$  pronađen u duktalnom i lobularnom epitelu, ali i u stromalnim stanicama mliječne žlijezde. ER $\alpha$  je nezavisni prognostički faktor kod oboljelih od karcinoma dojke te se danas određuje rutinski. S otkrićem ER $\beta$  postavlja se pitanje može li se i on koristiti kao marker predikcije i/ili prognoze karcinoma dojke. Uloga ER $\beta$  još nije u potpunosti otkrivena zbog nepouzdatih metoda mjerenja te postojanja ER $\beta$  u pet različitih izoformi (17).

U tkivu dojke izgleda da dominiraju ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2 i ER $\beta$ 5 te da svaka od tih izoformi ima različitu biološku funkciju. ER $\beta$  se eksprimira u testisima, a ER $\beta$ 4 je također pronađen u dojci. Postoje razlike u ekspresiji ER $\beta$  izoformi u normalnoj dojci i kod karcinoma, u nekim studijama je dokazano da se ekspresija ER $\beta$  smanjuje u stanicama karcinoma u odnosu na normalne stanice dojke. U određenim okolnostima ER $\beta$  ima ulogu tumor supresornog gena (18).

Horvath, Pasquali i suradnici smatraju da se ekspresija ER $\beta$  također mijenja tijekom progresije karcinoma dojke. U početnim fazama bolesti i rasta tumora njegov se nivo smanjuje, dok u uznapredovaloj fazi bolesti dolazi do potpunog gubitka ekspresije ER $\beta$ . S druge strane, visok nivo ER $\beta$  je primijećen u većini metastaza karcinoma prostate, u kostima i limfnim čvorovima. Uloga ER $\beta$  u metastazama je nejasna, a jedna od pretpostavki je da lokalni faktori vode do ponovne ekspresije ER $\beta$  na mjestima metastaza (19, 20).

## **2. HIPOTEZA**

Jezgre tumorskih stanica invazivne komponente trostruko negativnog karcinoma dojke karakterizira nazočnost estrogenskih beta receptora.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opći cilj rada je usporediti imunohistokemijski određenu pojavnost estrogenskih  $\beta$  receptora u tumorskim stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke i ostalih karcinoma dojke.

Ciljevi su utvrditi povezanost izraženosti ER $\beta$  u raku dojke s:

1. dobi bolesnica;
2. veličinom tumora;
3. stupnjem diferencijacije tumora;
4. nazočnosti metastaza u pazušnim limfnim čvorovima;
5. mitotskom aktivnošću tumora;
6. trostruko negativnim podtipom karcinoma dojke.

## **4. ISPITANICI I METODE**

### **4.1. Ustroj studije**

Retrospektivno istraživanje.

### **4.2. Ispitanice**

Istraživanje je provedeno na Kliničkom Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek.

Materijali su parafinski blokovi 30 bolesnica kod kojih je uzastopno dijagnosticiran trostruko negativan karcinom dojke na Kliničkom Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek, počevši od 1.1.2010, a kontrolna skupina sastoji se od 30 uzastopno dijagnosticiranih ostalih tipova karcinoma dojke od tog datuma.

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 60 ispitanica podijeljenih po 30 u kontrolnu skupinu te 30 u skupinu trostruko negativnih karcinoma dojke. Ispitanice su bile starosne dobi od 31 do 81 godine, odnosno prosječne dobi  $59,9 \pm 13,6$  godina.

### **4.3. Metode**

#### **4.3.1. Histološka analiza**

Iz arhiva Zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek izvađeni su podatci o dobi ispitanica, histološkom tipu tumora, veličini tumora, stupnju diferencijacija, ekspresiji estrogenskih, progesteronskih receptora, HER2 /neu statusa te Ki67 biljega proliferacije.

Histološki tip određen je prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), stupanj diferencijacije prema Elstonovoj i Ellisovoj shemi za karcinom dojke, a imunohistokemijska izraženost ER i PR receptora, HER2/neu i Ki67 prema važećim smjernicama St. Gallena (St. Gallen International Breast Cancer Conference; 21, 22) i

ASCO/CAP-a (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists; 23).

### 4.3.2. Imunohistokemijska analiza

Iz arhiviranih parafinskih blokova tumora dobiveni su rezovi debljine 3 – 5  $\mu\text{m}$  koji su bojeni imunohistokemijskom metodom imunoperoksidaza avidin-biotin koja predstavlja standard današnje imunohistokemijske analize (24, 25).

Korišteno je monoklonalno mišje protutijelo ER $\beta$ 1, klon PPG5/10 (Dako, Danska) prema uputi proizvođača te bojeno strojem za automatsko bojenje (Autostainer, Dako, Danska).

Imunohistokemijska izraženost ER $\beta$  određivana je semikvantitativno, uključujući postotak pozitivno obojenih stanica i intenzitet bojenja na sljedeći način:

- 0 = negativno bojenje,
- 1+ = do 10 % pozitivnih tumorskih stanica,
- 2+ = 11 – 30 % pozitivnih tumorskih stanica,
- 3+ = 31 % i više pozitivnih tumorskih stanica.

### 4.3.3. Statistička analiza

Kategorijski su podatci prikazani apsolutnim i relativnim frekvencijama te analizirani Fisherovim egzaktnim testom. Numerički podatci su prikazani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom odnosno medijanom i interkvartilnim rasponom, dok su za usporedbe između grupa korišteni Mann-Whitney i Kruskal-Wallis testovi. Značajnost je definirana na iznos  $\alpha = 0,05$ , a analiza je učinjena MedCalc softverskim alatom (inačica 16.2. MedCalc Software bvba).

## 5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na ukupno 60 uzoraka tumorskog tkiva karcinoma dojke podijeljenih u dvije skupine: u jednoj je skupini 30 uzoraka trostruko negativnih karcinoma, a u drugoj 30 uzoraka ostalih karcinoma dojke koji su i kontrolna skupina.

Skupine su podijeljene u četiri kategorije (0 - negativno, 1,2,3 - pozitivno) u ovisnosti o postotku pozitivnih tumorskih stanica s ER $\beta$  receptorima. U prvu kategoriju sa iznosom ER $\beta$  jednakim nula nije pripao niti jedan ispitanik pa ta skupina nije uvrštena u statističku obradu.

Kontrolnu skupinu čini 30 ispitanika prosječne dobi  $63,9 \pm 11,4$  godine, u rasponu od 37 do 81 godine.

Skupinu ispitanika s trostruko negativnim karcinomom dojke čini 30 ispitanika prosječne dobi  $55,8 \pm 14,6$ , u rasponu od 31 do 81 godine.

Nađena je statistički značajna razlika pri usporedbi vrijednosti ekspresije ER $\beta$  receptora među promatranim skupinama. U kontrolnoj skupini značajno više ispitanica ima vrijednosti ER $\beta$  receptora s više od 30 % pozitivnih stanica (21/30), za razliku od trostruko negativne skupine gdje su vrijednosti ER $\beta$  pozitivnih stanica podjednake u svakoj skupini (Fisherov egzaktni test,  $p = 0,038$  - Tablica 1).

Tablica 1. Usporedba ER-beta receptora između kontrolne i trostruko negativne skupine karcinoma dojke

| ER $\beta$                  | 0 | < 11 %<br>/n (%) | 11 – 30 %<br>/n (%) | > 30 %<br>/n (%) | P*    |
|-----------------------------|---|------------------|---------------------|------------------|-------|
| Kontrolna skupina           | 0 | 3 (27,3)         | 6 (35,3)            | 21 (65,6)        | 0,038 |
| Trostruko negativna skupina | 0 | 8 (72,7)         | 11 (64,7)           | 11 (34,3)        |       |
| <b>Ukupno</b>               | 0 | 11 (100,0)       | 17 (100,0)          | 32 (100,0)       |       |

\*Fisherov egzaktni test

Rezultati usporedne analize između kontrolne i skupine s trostruko negativnim karcinomom dojke prema dobi i vrijednosti Ki-67 prikazani su u tablici 2.

Ispitanice kontrolne skupine su statistički značajno starije životne dobi - 63,5 godina (interkvartilnog raspona 56,75 - 74,25), dok su ispitanice u skupini oboljelih od trostruko negativnog karcinoma dojke znatno mlađe dobi - 56 godina (interkvartilnog raspona 43,5 - 69,0) (Mann Whitney U test,  $p = 0,027$ ). Broj stanica u diobi određen antitijelom Ki67 značajno je niži u tumorima kontrolne skupine 15 % (interkvartilni raspon 9 – 25 %) (Mann Whitney U test,  $p < 0,001$ ).

Tablica 2. Srednja dob i broj stanica u diobi (Ki67) prema skupinama

|                              | Kontrola<br>n = 30    | 3 x Negativni<br>n = 30 | P*      |
|------------------------------|-----------------------|-------------------------|---------|
| Dob<br>Medijan (25 – 75 %)   | 63,50 (56,75 - 74,25) | 56,00 (43,50 - 69,00)   | 0,027   |
| Ki-67<br>Medijan (25 – 75 %) | 15,00 (9,00 - 25,00)  | 67,50 (40,00 - 80,00)   | < 0,001 |

\*Mann-Whitney U test

U tablici 3. prikazani su rezultati usporedbe između kontrolne skupine i skupine s trostruko negativnim karcinomom dojke za ostale promatrane parametre.

Što se veličine tumora tiče, a prema podacima iz TNM klasifikacije istraživanih tumora, najviše tumora je u skupini do 2 cm veličine (u kontrolnoj skupini 15 (50 %), u skupini s trostruko negativnim rakom dojke 14 (47 %)), manje ih je u skupini veličine 2 - 5 cm, a najmanje je tumora većih od 5 cm, podjednako u objema skupinama, bez statistički značajne razlike.

Pazušne metastaze u limfnim čvorovima su prisutne u 19 ispitanica kontrolne skupine (63 %) i u 15 ispitanica trostruko negativne skupine (50 %), bez značajne razlike među skupinama.

Prema stupnju diferencijacije (gradusu) tumorskog tkiva statistički je značajno više slabo diferenciranih tumora u trostruko negativnoj skupini 19 (64 %), nego u kontrolnoj u kojoj ih je samo 8 (27 %).



Parametri HER2 amplifikacija, estrogen i progesteron su očekivano 100 % negativni u skupini trostruko negativnih karcinoma dojke, dok u kontrolnoj skupini postoji značajan postotak pozitivnih ispitanica (Fisherov egzaktni test,  $p < 0,001$ ).

Tablica 3. Usporedba ostalih parametara između kontrolne skupine i skupine s trostruko negativnim karcinomom dojke

|   | Kontrola<br>/n (%) | 3xNegativni<br>/n (%) | P*      |
|---|--------------------|-----------------------|---------|
| <b><i>Veličina tumora prema TNM klasifikaciji</i></b> |                    |                       |         |
| Najveći promjer do 2 cm                               | 15 (50)            | 14 (47)               | 0,615   |
| Najveći promjer 2 - 5 cm                              | 12 (40)            | 11 (37)               |         |
| Najveći promjer veći od 5 cm                          | 2 (7)              | 5 (16)                |         |
| Infiltracija prsnog koša, kože, cijele dojke          | 1 (3)              | 0                     |         |
| <b><i>Metastaze</i></b>                               |                    |                       |         |
| Nema metastaza  | 11 (37)            | 15 (50)               | 0,435   |
| Ima metastaza   | 19 (63)            | 15 (50)               |         |
| <b><i>Gradus (stupanj diferencijacije)</i></b>        |                    |                       |         |
| I dobro diferencirani                                 | 9 (30)             | 1 (3)                 | 0,004   |
| II srednje diferencirani                              | 13 (43)            | 10 (33)               |         |
| III slabo diferencirani                               | 8 (27)             | 19 (64)               |         |
| <b><i>HER2 amplifikacija</i></b>                      |                    |                       |         |
| 0-negativan   | 24 (80)            | 30 (100)              | 0,024   |
| 1-pozitivan   | 6 (20)             | 0                     |         |
| <b><i>Estrogen</i></b>                                |                    |                       |         |
| 0-negativan   | 3 (10)             | 30 (100)              | < 0,001 |
| 1-pozitivan   | 27 (90)            | 0                     |         |
| <b><i>Progesterom</i></b>                             |                    |                       |         |
| 0-negativan   | 5 (17)             | 30 (100)              | < 0,001 |
| 1-pozitivan   | 25 (83)            | 0                     |         |
| <b><i>Ukupno</i></b>                                  | 30 (100)           | 30 (100)              |         |

\*Fisherov egzaktni test

Usporedbom dobi ispitanica i diobene aktivnosti tumorskih stanica mjerene uz pomoć Ki-67 među kategorijskim grupama ispitanika kontrolne skupine nije nađena statistički značajna razlika među ispitanicima (Tablica 4).

Tablica 4. Usporedba dobi i vrijednosti Ki-67 među kategorijskim grupama ispitanika kontrolne skupine

|                                 | < 11 %<br>n = 3          | 11 – 30 %<br>n = 6       | > 30 %<br>n = 21         | P*    |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| Dob<br>Medijan<br>(25 – 75 %)   | 57,00<br>(49,00 - 63,00) | 62,50<br>(59,75 - 74,25) | 68,00<br>(55,00 - 76,00) | 0,365 |
| Ki-67<br>Medijan<br>(25 – 75 %) | 10,00<br>(10,00 - 11,00) | 13,50<br>(8,00 - 22,50)  | 18,00<br>(7,50 - 27,50)  | 0,529 |

\*Kruskal-Wallis test

Usporedba ostalih parametara s rezultatima statističke analize u kontrolnoj skupini prikazana je u tablici 5. te nije nađena značajna razlika niti za ostale promatrane parametre među ispitanicima kontrolne skupine.

Među kategorijskim grupama ispitanika skupine s trostruko negativnim karcinomom dojke nije nađena statistički značajna razlika među ispitanicima za dob, ali je nađena statistički značajna razlika za vrijednosti stanica u diobi Ki-67.

Ispitanice s postotkom pozitivnih stanica na ER $\beta$  receptor između 11 i 30 % imaju značajno manju vrijednost Ki-67 od ispitanica s manjim od 11 % ili većim od 30 % vrijednostima pozitivnih stanica na ER $\beta$  (Kruskal-Wallis test,  $p = 0,002$ ) (Tablica 6.).

Za ostale promatrane parametre u skupini trostruko negativnog karcinoma dojke nije nađena statistički značajna razlika (Tablica 7.).

Tablica 5. Usporedba ostalih promatranih parametara među kategorijskim grupama ispitanika kontrolne skupine

|   | < 11 %<br>/n (%) | 11 – 30 %<br>/n (%) | > 30 %<br>/n (%) | P*      |
|---|------------------|---------------------|------------------|---------|
| <b><i>Veličina tumora prema TNM klasifikaciji</i></b> |                  |                     |                  |         |
| Najveći promjer do 2 cm                               | 2 (67)           | 4 (66)              | 9 (43)           | 0,416   |
| Najveći promjer 2 – 5 cm                              | 1 (33)           | 1 (17)              | 10 (48)          |         |
| Najveći promjer veći od 5 cm                          | 0                | 0                   | 2 (9)            |         |
| Infiltracija prsnog koša, kože, cijele dojke          | 0                | 1 (17)              | 0                |         |
| <b><i>Metastaze</i></b>                               |                  |                     |                  |         |
| Nema metastaza  | 1 (33)           | 3 (50)              | 7 (33)           | 0,832   |
| Ima metastaze   | 2 (67)           | 3 (50)              | 14 (67)          |         |
| <b><i>Gradus (stupanj diferencijacije)</i></b>        |                  |                     |                  |         |
| I dobro diferencirani                                 | 0                | 1 (17)              | 8 (38)           | 0,594   |
| II srednje diferencirani                              | 2 (67)           | 4 (66)              | 7 (33)           |         |
| III slabo diferencirani                               | 1 (33)           | 1 (17)              | 6 (29)           |         |
| <b><i>HER2 amplifikacija</i></b>                      |                  |                     |                  |         |
| 0-negativan   | 3 (100)          | 6 (100)             | 15 (71)          | 0,258   |
| 1-pozitivan   | 0                | 0                   | 6 (29)           |         |
| <b><i>Estrogen</i></b>                                |                  |                     |                  |         |
| 0-negativan   | 0                | 0                   | 3 (14)           | > 0,950 |
| 1-pozitivan   | 3 (100)          | 6 (100)             | 18 (86)          |         |
| <b><i>Progesteron</i></b>                             |                  |                     |                  |         |
| 0-negativan   | 0                | 1 (17)              | 4 (19)           | > 0,950 |
| 1-pozitivan   | 3 (100)          | 5 (83)              | 17 (81)          |         |
| <b><i>Ukupno</i></b>                                  | 3 (100)          | 6 (100)             | 21 (100)         |         |

\*Fisherov egzaktni test

Tablica 6. Usporedba dobi i vrijednosti Ki-67 među kategorijskim grupama ispitanika skupine s trostruko negativnim karcinomom dojke

|                                 | < 11 %<br>n = 8          | 11 – 30 %<br>n = 11      | > 30 %<br>n = 11         | P*    |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| Dob<br>Medijan<br>(25 - 75 %)   | 53,00<br>(36,25 - 74,00) | 57,00<br>(44,00 - 66,00) | 56,00<br>(42,00 - 69,00) | 0,981 |
| Ki-67<br>Medijan<br>(25 - 75 %) | 80,00<br>(71,25 - 85,00) | 45,00<br>(20,00 - 60,00) | 75,00<br>(50,00 - 85,00) | 0,002 |

\*Kruskal-Wallis test

Tablica 7. Usporedba ostalih promatranih parametara među kategorijskim grupama ispitanika skupine s trostruko negativnim karcinomom dojke

|   | < 11 %<br>/n (%) | 11 – 30 %<br>/n (%) | > 30 %<br>/n (%) | P*      |
|---|------------------|---------------------|------------------|---------|
| <b><i>Veličina tumora prema TNM klasifikaciji</i></b> |                  |                     |                  |         |
| Najveći promjer do 2 cm                               | 3 (38)           | 5 (46)              | 6 (55)           | 0,753   |
| Najveći promjer 2 - 5cm                               | 4 (50)           | 3 (27)              | 4 (36)           |         |
| Najveći promjer veći od 5 cm                          | 1 (12)           | 3 (27)              | 1 (9)            |         |
| Infiltracija prsnog koša, kože, cijele dojke          | 0                | 0                   | 0                |         |
| <b><i>Metastaze</i></b>                               |                  |                     |                  |         |
| Nema metastaza  | 5 (63)           | 5 (45)              | 5 (45)           | 0.807   |
| Ima metastaza   | 3 (37)           | 6 (55)              | 6 (55)           |         |
| <b><i>Gradus (stupanj diferencijacije)</i></b>        |                  |                     |                  |         |
| I dobro diferencirani                                 | 0                | 0                   | 1 (9)            | 0,919   |
| II srednje diferencirani                              | 3 (38)           | 3 (27)              | 4 (36)           |         |
| III slabo diferencirani                               | 5 (62)           | 8 (73)              | 6 (55)           |         |
| <b><i>HER2 amplifikacija</i></b>                      |                  |                     |                  |         |
| 0-negativan   | 8                | 11                  | 11               | > 0,950 |
| 1-pozitivan   |                  |                     |                  |         |
| <b><i>Estrogen</i></b>                                |                  |                     |                  |         |
| 0-negativan   | 8                | 11                  | 11               | > 0,950 |
| 1-pozitivan   |                  |                     |                  |         |
| <b><i>Progesteron</i></b>                             |                  |                     |                  |         |
| 0-negativan   | 8                | 11                  | 11               | > 0,950 |
| 1-pozitivan   |                  |                     |                  |         |
| <b><i>Ukupno</i></b>                                  | 8 (100)          | 11 (100)            | 11 (100)         |         |

\*Fisherov egzakti test

## 6. RASPRAVA

Rutinski klinički pristup bolesniku s rakom dojke temelji se na tradicionalnim prognostičkim čimbenicima kao što su status limfnih čvorova, stupanj diferencijacije tumorskih stanica (gradus) i veličina primarnog tumora, nadopunjenim podacima o ekspresiji ER-a, PR-a i HER2. Evaluacija tih biomarkera je najvažnija u predviđanju odgovora na terapiju koja cilja te proteine. Oko 85 % bolesnika s tumorima s pozitivnom ekspresijom ER-a i PR-a reagira na hormonsku terapiju, dok se u skupini oboljelih od karcinoma s pozitivnom ekspresijom samo jednog hormonskog receptora (ER-a ili PR-a) terapijski učinak postiže u 40 % oboljelih. Nasuprot navedenom, odgovor na hormonsko liječenje postigne se u samo 1 % bolesnika s hormonski negativnim karcinomom dojke, a oboljeli s HER2 negativnim rakom dojke ne mogu se liječiti niti trastuzumabom (Herceptinom).

Estrogen je neophodan za normalan rast i diferencijaciju epitela žlijezda dojke. Estrogen podržava rast oko 50 % primarnih karcinoma dojke. Iz tog je razloga uklanjanje estrogena ili blokiranje njegova djelovanja anti-estrogenom (tamoksifen) osnovni način liječenja ER $\alpha$  pozitivnih tumora. Od 1996. godine kada su onkolozi saznali za postojanje i drugog ER-a, ER $\beta$ , nije posve jasno ima li taj receptor važnost u liječenju karcinoma dojke (26). Klinički konzenus bio je, a još je uvijek, da je odgovor na Tamoksifen posredovan ER $\alpha$ -om.

Na temelju statusa izražaja estrogenskih receptora, progesteronskih receptora, receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 i proliferacijskog indeksa, karcinomi dojke dijele se u četiri osnovne podskupine: luminalnu A, luminalnu B, HER2 pozitivnu i trostruko negativnu. Svaka od tih skupina ima različite čimbenike rizika, kliničko ponašanje i odgovor na terapiju (27, 28).

Hormon-negativni karcinomi dojke su češće slabije diferencirani tumori, višeg histološkog gradusa, povezani su s višom stopom recidiviranja i sniženim preživljenjem, kao i slabim ili izostalim odgovorom na hormonsku terapiju. Trostruko negativni karcinomi dojke čine 10 – 17 % svih karcinoma dojke, imaju veću sklonost metastaziranju, osobito hematogenim putem u pluća, leđnu moždinu, mozgovne ovojnice, mozak i jetru te se povezuju s agresivnijim kliničkim tijekom i pojavom recidiva (29). Međutim, valja napomenuti kako i među tim tumorima ima podgrupa s klinički povoljnijim ishodima: primjerice adenoid cistični

karcinom, sekretorni karcinom i medularni karcinom. Svi ti pokazatelji ukazuju na heterogenu prirodu hormon-negativne grupe karcinoma dojke.

Stanice trostruko negativnog karcinoma dojke ne eksprimiraju estrogenske, progesteronske receptore niti HER2 receptore što tu vrstu karcinoma čini teškom za liječenje. Kemoterapija je jedini sistemski oblik liječenja, ali unatoč dobrom inicijalnom odgovoru na kemoterapijske protokole, pacijentice s trostruko negativnim karcinomom dojke imaju češće recidive te spadaju u skupinu karcinoma dojke s lošijom prognozom (30).

Više istraživanja pokazalo je da u određenom postotku karcinoma kod kojih se današnjim metodama ne nalazi ER (a misli se na ER $\alpha$ ) može se naći ER $\beta$ , iako su svi daljnji pokazatelji kontradiktorni. Tako je i naše istraživanje pokazalo da je u svim probranim uzorcima – bilo u skupini oboljelih s trostruko negativnim karcinomom dojke, bilo u kontrolnoj skupini oboljelih od drugih tipova karcinoma dojke – pozitivan nalaz ER $\beta$ . Udjel tumorskih stanica s različitom (ali pozitivnom) ekspresijom ER $\beta$  receptora u skupini trostruko negativnih tumora dojke ravnomjerno je raspodijeljen, dok se u kontrolnoj skupini našlo značajno više slučajeva s najvišim udjelom ER $\beta$  (Fisherov egzaktni test,  $p = 0,038$ ). Slične rezultate je pokazalo i nekoliko drugih publiciranih studija u kojima je ekspresija estrogenskih  $\beta$  receptora u tkivu karcinoma dojke 17 – 100 %, kao i ekspresiju estrogenskih  $\beta$  receptora u estrogenski  $\alpha$  negativnim tumorima 13 – 83 % (31 - 33). Opći zaključak iz publicirane literature je da ekspresija ER $\beta$  opada tijekom tumorigeneze, odnosno da je viša ekspresija ER $\beta$  povezana s dobrim prognostičkim markerima ili boljim kliničkim ishodom bolesnika.

Literaturni navodi povezuju ekspresiju ER $\beta$ 1 s ekspresijom ER $\alpha$ , manjim tumorima, niskim histološkim gradusom i negativnim limfnim čvorovima. U našem istraživanju te podatke nismo uspjeli potvrditi. Dodatno, željeli smo utvrditi odnos ekspresije estrogenskih  $\beta$  receptora i ispitivanih kliničko-patoloških pokazatelja kao što su dob, broj stanica u diobi, veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije među ispitivanim skupinama.

Osim nalaza karakterističnih za razliku trostruko negativne skupine karcinoma dojke u odnosu na ostale karcinome (oboljele od trostruko negativnog karcinoma dojke značajno su mlađe od ostalih, ti karcinomi su diobeno aktivniji i višeg su gradusa), nisu pronađene nikakve značajne razlike vezane uz ekspresiju ER $\beta$ . Kontrolna skupina je statistički značajno starija, 63,5 godina (interkvartilnog raspona 56,75 - 74,25), dok je trostruko negativna skupina znatno

mlađa, 56 godina (interkvartilnog raspona 43,50 - 69,00) (Mann Whitney U test,  $p = 0,027$ ). Broj stanica u diobi određen korištenjem protutijela Ki67 je statistički značajno niži u kontrolnoj skupini, dok je u trostruko negativnoj skupini značajno viši ( $p < 0,001$ ). Do sličnih opažanja su došli i Carey i suradnici, da se trostruko negativni karcinom dojke češće javlja kod mlađih žena (u premenopauzi), a karakterizira ih visoka mitotska aktivnost i visoki gradus (12, 34).

Tumori obje skupine nisu se značajnije razlikovali prema veličini i postojanju metastaza, iako je većina tumora (52/60) bila promjera do 5 cm. Utvrđena je statistički značajna razlika u stupnju diferencijacije tumora među promatranim skupinama ( $p = 0,004$ ). U trostruko negativnoj skupini je značajno više slabo diferenciranih tumora.

Nekoliko je važnih pitanja u vezi s ulogom i značajem ER $\beta$  i njegovih formi na koja treba odgovoriti u budućim istraživanjima. Treba li mjeriti ekspresiju ER $\beta$  da bi se poboljšao prognostički značaj određivanja ekspresije ER $\alpha$  ili bi se ER $\beta$  mogao s vremenom pokazati kao neovisni prognostički čimbenik? Predstavlja li ER $\beta$  novi cilj hormonske terapije raka dojke i time doprinosi efikasnosti postojećih lijekova? Odgovor na ta pitanja ovisit će o istraživanjima provedenim PCR-om i imunohistokemijom. Istraživanja treba provesti u bolesnika s neoadjuvantnom, adjuvantnom i metastatskom terapijom, kao i kod bolesnika koji razvijaju recidive tumora. Tek tada će možda biti moguće bolesnike preciznije stratificirati prema njihovom odgovoru na hormonsku terapiju.

Sve će te odgovore komplicirati činjenice da ER $\beta$  postiže anti-proliferacijske efekte u tumorskim stanicama u nazočnosti ER $\alpha$ , ali i proliferacijske efekte u odsutnosti ER $\alpha$ , kao i spoznaje o različitim efektima zbog postojanja različitih izoformi ER $\beta$ .



## 7. ZAKLJUČCI

Pomoću dobivenih rezultata u ovom istraživanju može se utvrditi sljedeće:

1. Nema statistički značajne povezanosti ekspresije ER $\beta$  s dobi bolesnica oboljelih od raka dojke ( $p = 0,981$ );
2. Nema statistički značajne povezanosti ekspresije ER $\beta$  s veličinom primarnog tumora ( $p = 0,753$ );
3. Nema statistički značajne povezanosti ekspresije ER $\beta$  sa stupnjem diferencijacije tumorskog tkiva ( $p = 0,919$ );
4. Nema statistički značajne povezanosti ekspresije ER $\beta$  s postojanjem metastaza u pazušnim limfnim čvorovima ( $p = 0,807$ );
5. Ekspresija ER $\beta$  u trostruko negativnom karcinomu dojke povezana je ili s niskim ili s vrlo visokim mitotskim indeksom ( $p = 0,002$ ), a u kontrolnoj skupini isključivo s niskim mitotskim indeksom;
6. ER $\beta$  je bio izražen u svim promatranim slučajevima obje skupine (trostruko negativna i kontrolna skupina). Ako se promatra stupanj ekspresije ER $\beta$  u skupini trostruko negativnog karcinoma dojke i u kontrolnoj skupini, opaža se izraženija ekspresija ER $\beta$  u kontrolnoj skupini ( $p = 0,038$ ).

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Imunohistokemijski usporediti pojavnost estrogenskih beta receptora u tumorskim stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke i u ostalim karcinomima dojke.

**Nacrt studije:** Retrospektivna studija.

**Ispitanici i metode:** Istraživanje je provedeno na 30 uzoraka tumorskog tkiva pacijentica kod kojih je dijagnosticiran trostruko negativni karcinom dojke i 30 uzoraka tumorskog tkiva ostalih karcinoma dojke. Imunohistokemijska izraženost ER $\beta$  određivana je semikvantitativno, uključujući postotak pozitivno obojenih stanica i intenzitet bojenja: 0 (negativno), 1+ (do 10 % pozitivnih tumorskih stanica), 2+ (11 – 30 % tumorskih stanica), 3+ (31 % i više pozitivnih tumorskih stanica).

**Rezultati:** Nema statistički značajne povezanosti ekspresije ER $\beta$  s dobi bolesnica ( $p = 0,981$ ), s veličinom primarnog tumora ( $p = 0,753$ ), sa stupnjem diferencijacije tumorskog tkiva ( $p = 0,919$ ) i s postojanjem metastaza u pazušnim limfnim čvorovima ( $p = 0,807$ ). Ekspresija ER $\beta$  u trostruko negativnom karcinomu dojke povezana je ili s niskim ili s vrlo visokim mitotskim indeksom ( $p = 0,002$ ), a u kontrolnoj skupini isključivo s niskim mitotskim indeksom. ER $\beta$  je bio izražen u svim promatranim slučajevima obje skupine (trostruko negativna i kontrolna skupina). Ako se promatra stupanj ekspresije ER $\beta$  u skupini trostruko negativnog karcinoma dojke i u kontrolnoj skupini, opaža se izraženija ekspresija ER $\beta$  u kontrolnoj skupini ( $p = 0,038$ ).

**Zaključak:** Udio tumora pozitivnih na ER $\beta$  u trostruko negativnih karcinoma dojke (100 %) upućuje na mogući pozitivan učinak hormonske ili druge ciljane terapije u toj skupini raka dojke.

**Ključne riječi:** estrogenski receptor beta; rak dojke; trostruko negativni tumori dojke

## 9. SUMMARY

### ESTROGEN RECEPTOR $\beta$ EKSPRESSION IN THE TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

**Objectives:** The aim of this study was to compare the incidence of estrogen receptor beta in the tumor cells, triple negative breast cancer and other breast cancers via imunohistochemical staining protocol.

**Study Design:** A retrospective study

**Material and Methods:** The study was conducted on 30 samples of tumor tissue of patients with triple negative breast cancer tests and 30 samples of tumor tissue of other breast cancers. Immunohistochemical expression of ER $\beta$  was determined semi-quantitatively, including the percentage of positively stained cells and the intensity of staining: 0 (negative), 1+ (10% positive tumor cells), 2+ (11 – 30% tumor cells), 3+ (31% and more positive tumor cells).

**Results:** Statistically significant correlation of ER $\beta$  expression with patients' age ( $p = 0.981$ ), the size of primary tumor ( $p = 0.753$ ), the degree of differentiation of tumor tissue ( $p = 0.919$ ) and with the existence of metastases in axillary lymph nodes ( $p = 0.807$ ) was not found. ER $\beta$  expression in triple negative breast cancer is associated with either low or very high mitotic index ( $p = 0.002$ ), while it is associated only with low mitotic index in the control group. ER $\beta$  was expressed in all cases observed, in both groups (triple negative and control group). When both groups are compared, ER $\beta$  expression is more pronounced in the control group ( $p = 0.038$ ).

**Conclusion:** The percentage of ER $\beta$  positive tumor in triple negative breast cancer (100%) indicates the possible beneficial effect of hormone, or other targeted therapies in this group of breast cancer patients.

**Key Words:** estrogen receptor beta; breast cancer; triple negative breast neoplasms

**10. REFERENCE**

1. Šimunić V. Hormonsko nadomjesno liječenje i dojka - osvrt na mišljenje pristaša i argumente protivnika. U: Zbornik radova „Bolesti dojke“, HAZU, Zagreb, 2001.
2. Vrbanec D. Optimalno adjuvantno hormonsko liječenje raka dojke. U: Zbornik radova „Bolesti dojke“, HAZU, 2004, str. 123-30.
3. Zdravstveno-statistički ljetopis 2007. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2007.
4. Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija, treće, prerađeno i dopunjeno izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2011.
5. Rosai J. Rosai i Ackerman's Surgical Pathology. Philadelphia: Elsevier, 2004, str.1764-840.
6. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, et al. Staging system for breast cancer: revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. Surg Clin North Am. 2003;83:803-19.
7. Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE. Assessment of tissue estrogen and progesteron receptor levels: a survey of current practice, techniques and quantitation methods. Breast J 2006;6:189-96.
8. Rosai J. Rosai i Ackerman's Surgical Pathology. Philadelphia: Elsevier, 2004, str. 1764-840.
9. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. Lancet Oncol 2010;11:174-83.
10. Cianfrocca M, Gradishar DO, Gradishar W. New molecular cllassifications of breast cancer. CA Cancer J Clin. 2009;59:303-13.
11. Pecorino L. Introduction. Molecular biology of cancer. Oxford, Oxford University Press, 2012. str.1-20.
12. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer:disease entity or title of convenience? Nature Reviews Clinical Oncology 2010;7:683-92.
13. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. Cell 1987;51:941-51.
14. Herynk MH, Faqua SA. Estrogen receptor mutations in human disease. Endocr Rev 2004;25:869-98.

15. Leung YK, Mak P, Hassan S, Ho SM. Estrogen receptor (ER)beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:13162-7.
16. Speirs V, Skliris GP, Burdall SE, Carder PJ. Distinct expression patterns of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in normal human mammary gland. *J Clin Pathol* 2002;55:371-4.
17. Balfe P, McCann A, McGoldrick A, McAllister K, et al. Estrogen receptor alpha and beta profiling in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004;30:469-74.
18. Leung YK, Lee MT, Lam HM, Tarapore P, et al. Estrogen receptor-beta and breast cancer: translating biology into clinical practice. *Steroids* 2012;77:727-37.
19. Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, et al. Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61:5331-5.
20. Pasquali D, Rossi V, Esposito D, Abbondanza C, et al. Loss of estrogen receptor beta expression in malignant human prostate cells in primary cultures and in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2051-5.
21. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn H-J, et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology* 2011;22:1736-74.
22. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast cancer 2013. *Annals of Oncology* 2013;24:2206-23.
23. Willf AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2013;31:3997-4013.
24. [http://www.dako.com/08002\\_ihc\\_staining\\_methods\\_5ed.pdf](http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf)
25. [http://www.ihcworld.com/\\_books/Dako\\_Handbook.pdf](http://www.ihcworld.com/_books/Dako_Handbook.pdf)
26. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gutfansson J-A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS* 1996;93:5925-30.
27. Sorlie T, 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 USA* 2003;100:8418-23.

28. Rakha EA, El-Rehim D, Paish C, Green AR, Lee AH, Robertson JF, et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer*. 2006;42:3149-56.
29. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007;109:25-32.
30. Oakman C, Moretti E, Galardi C, et al. Adjuvant systemic treatment for individual patients with triple negative breast cancer. *Breast* 2011;20(Suppl 3):S135-41.
31. Jarvinen TA, Pelto-Huikko M, Holli K, Isola J: Estrogen receptor beta is coexpressed with Eralpha and PR and associated with nodal status, grade and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 2000;156:29-35.
32. Skliris GP, Carder PJ, Lansdown MR, Speirs V: Immunohistochemical detection of ERbeta in breast cancer: towards more detailed receptor profiling? *Br J Cancer* 2001;84:1095-8.
33. Saunders PT, Millar MR, Williams K, Macpherson S, Bayne C, O'Sullivan C, et al. Expression of estrogen receptor beta (Erbeta1) protein in human breast cancer biopsies. *Br J Cancer* 2002;86:250-6.
34. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295:2492-502.

## 11. ŽIVOTOPIS

### **Osobni podatci:**

Ime i prezime: Monika Galić Krnjaić

Datum i mjesto rođenja: 15. kolovoza 1983., Osijek

Adresa: Tina Ujevića 56, 31550 Valpovo

Telefon: 031/652-353, 098/137-44-04

E-mail: galicmonika@gmail.com

### **Obrazovanje:**

1998. godine završena Osnovna škola „Matija Petar Katančić“, Valpovo

1998. – 2002. g. Medicinska škola Osijek ; smjer: zdravstveno – laboratorijski tehničar

2010. – 2013. g. Sveučilišni preddiplomski studij biomedicinsko-laboratorijske dijagnostike pri Medicinskom fakultetu u Osijeku

2013. – 2015.g. Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike pri Medicinskom fakultetu u Osijeku

### **Radno iskustvo:**

Klinički bolnički centar Osijek

- od listopada 2002. godine do rujna 2003. Godine – pripravnički staž u trajanju od jedne godine

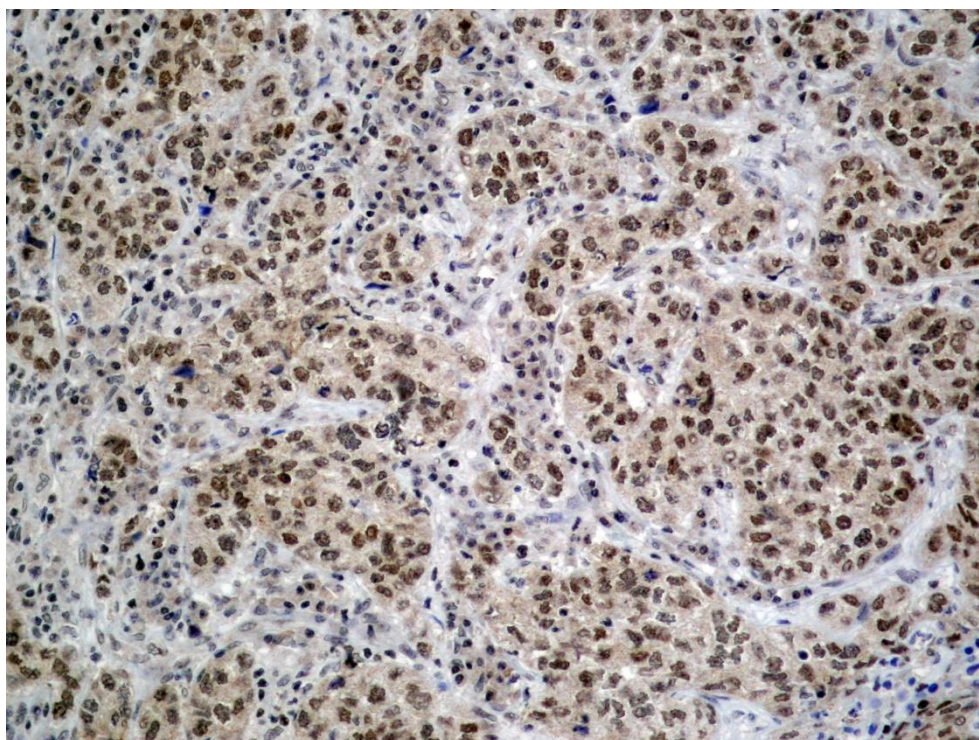
- od travnja 2006. godine u stalnom radnom odnosu do danas.

## 12. PRILOZI

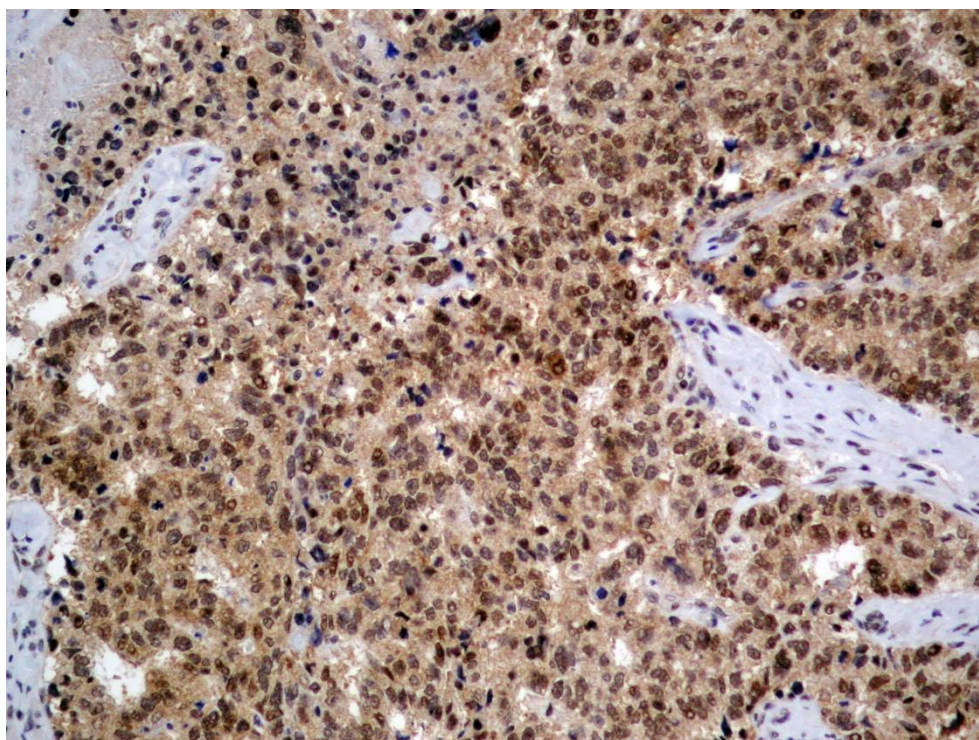
### Prilog 1.

Slikovni prikaz izražaja estrogenskog  $\beta$  receptora u istraživanih tumora

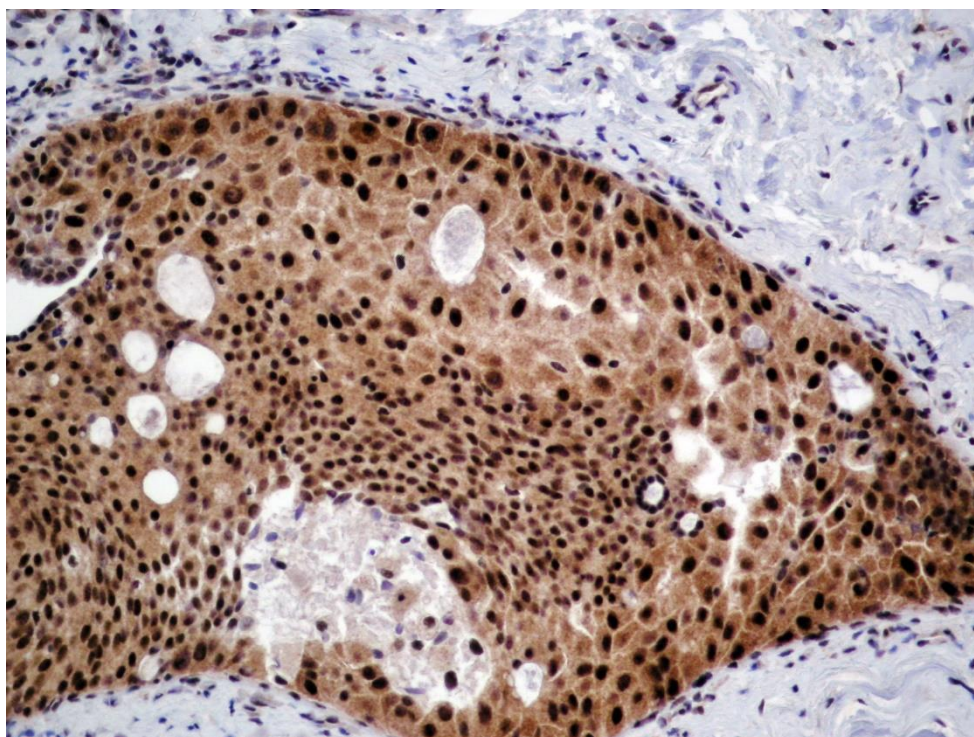




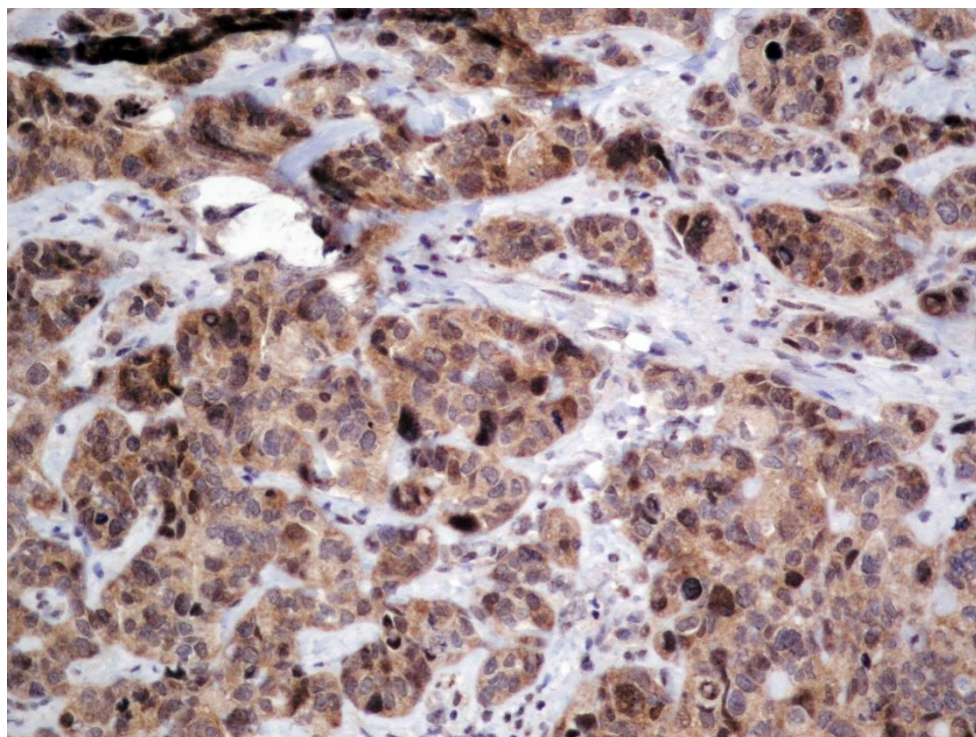
Slika 1. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 174/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



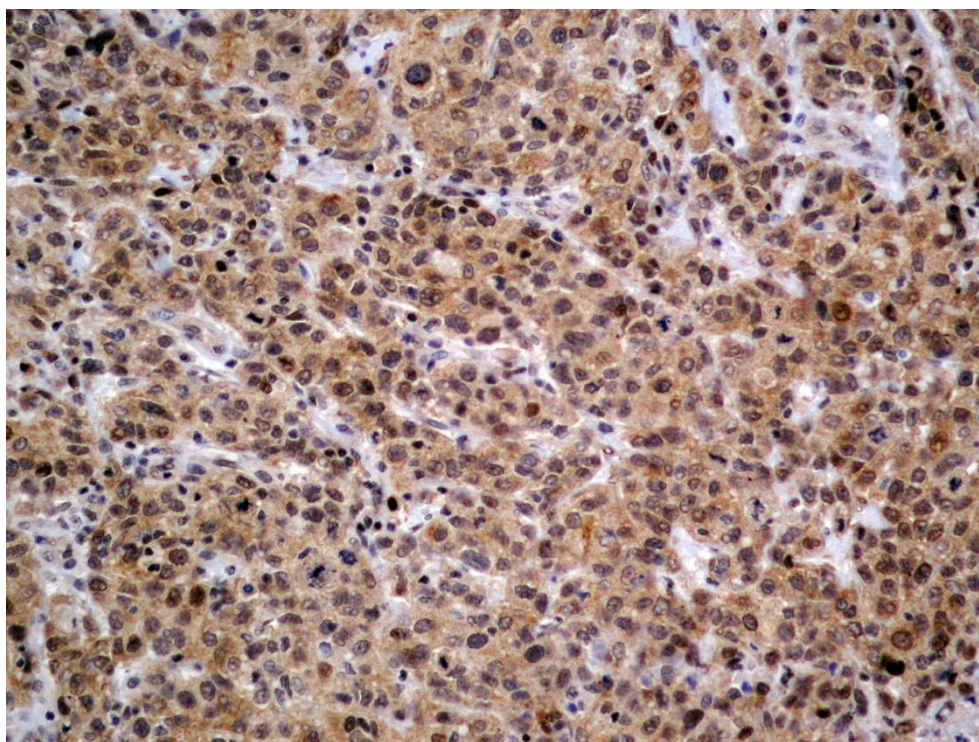
Slika 2. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 516/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



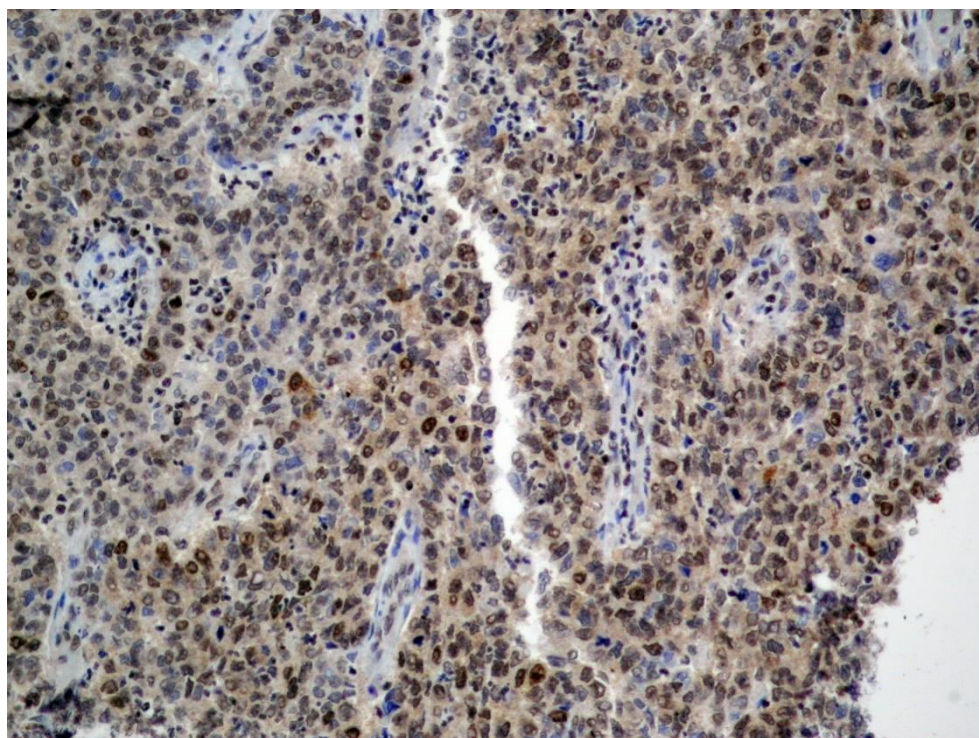
Slika 3. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 521/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



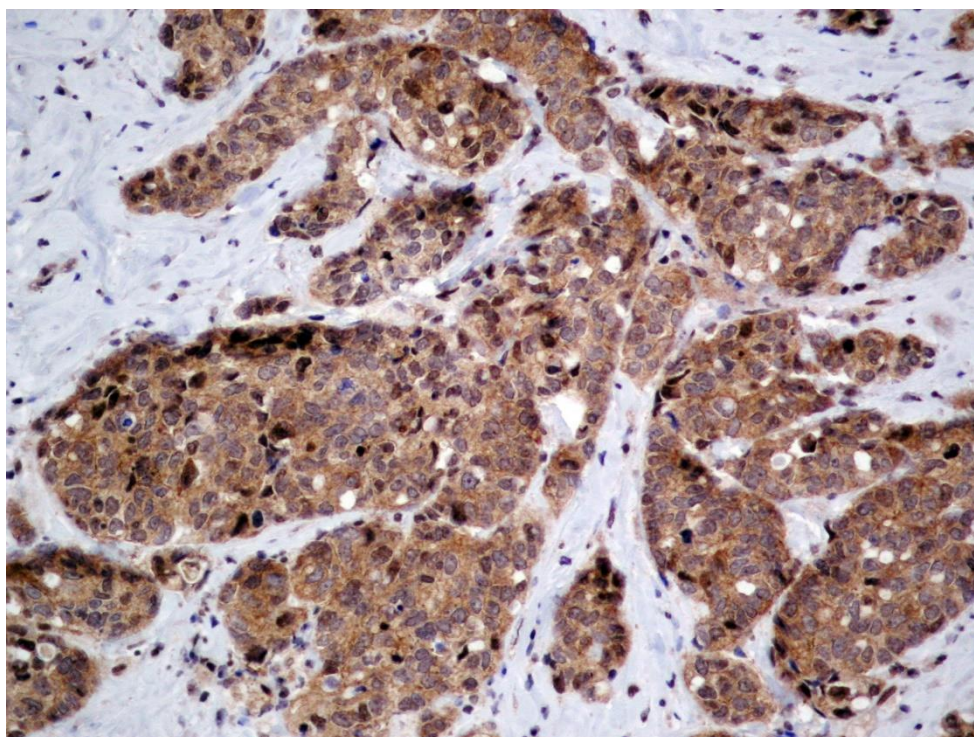
Slika 4. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 1035/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



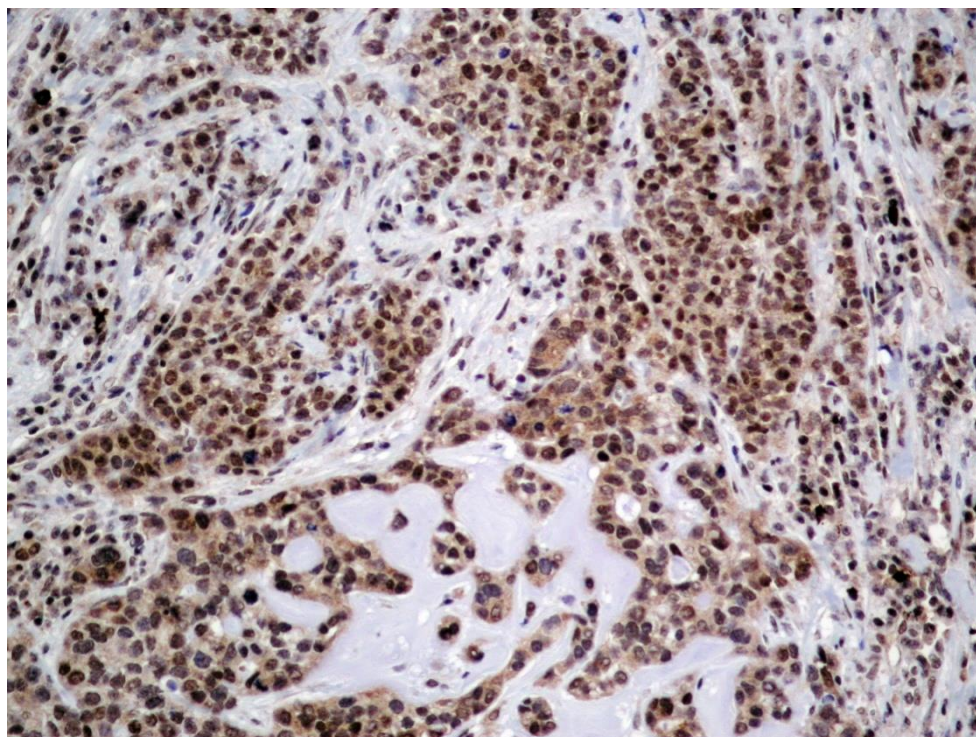
Slika 5. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 1424/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



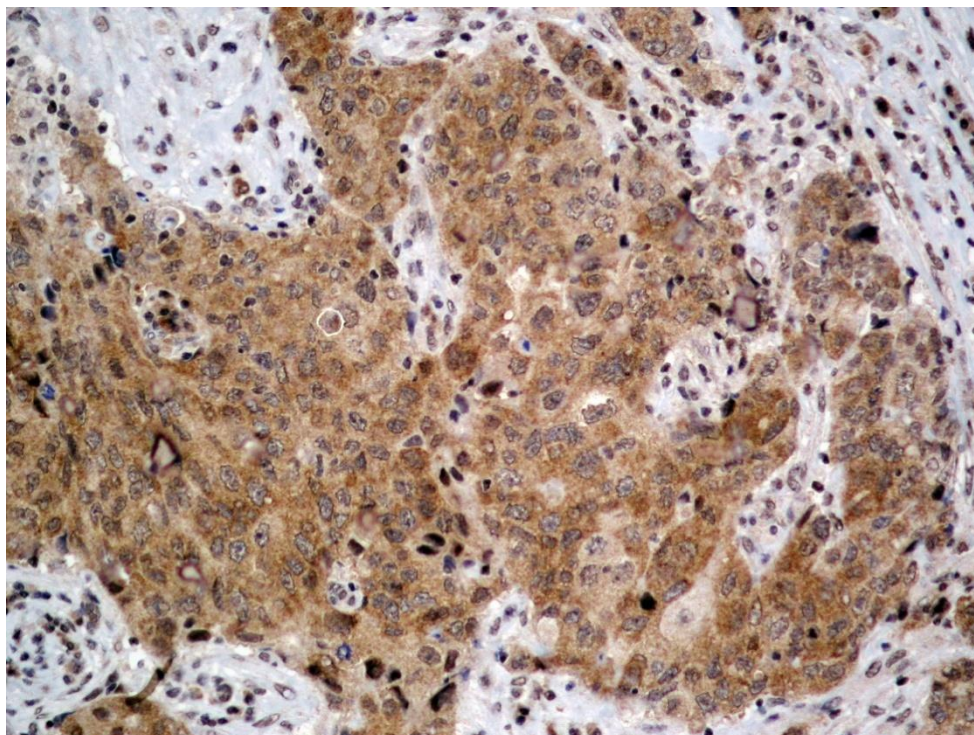
Slika 6. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 1564/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



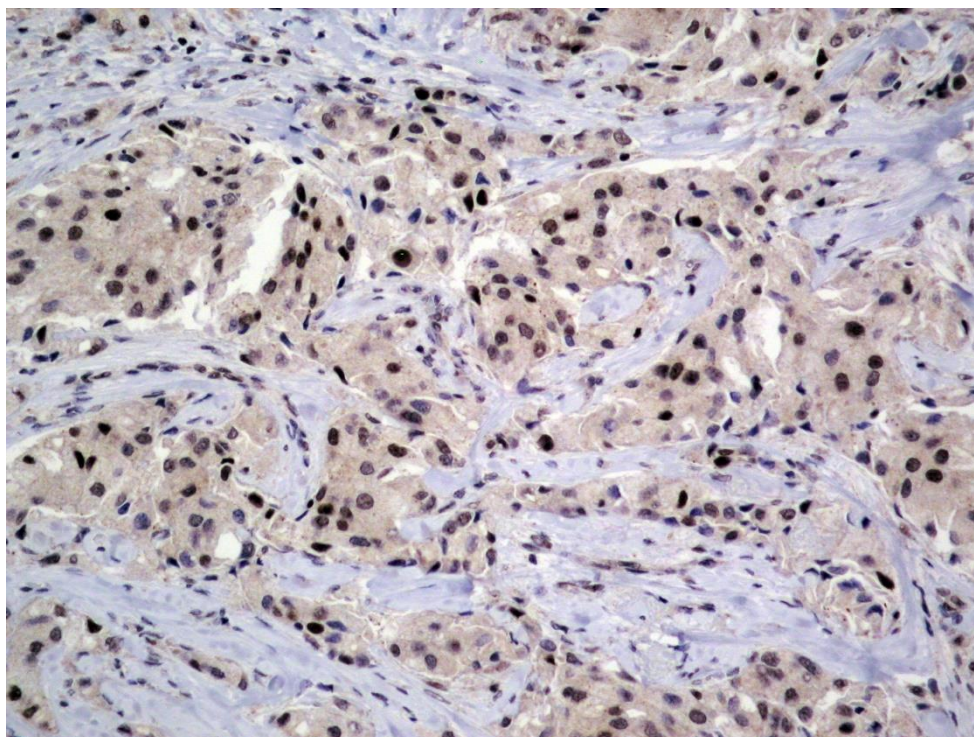
Slika 7. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 3741/2011, ERβ, 200×.



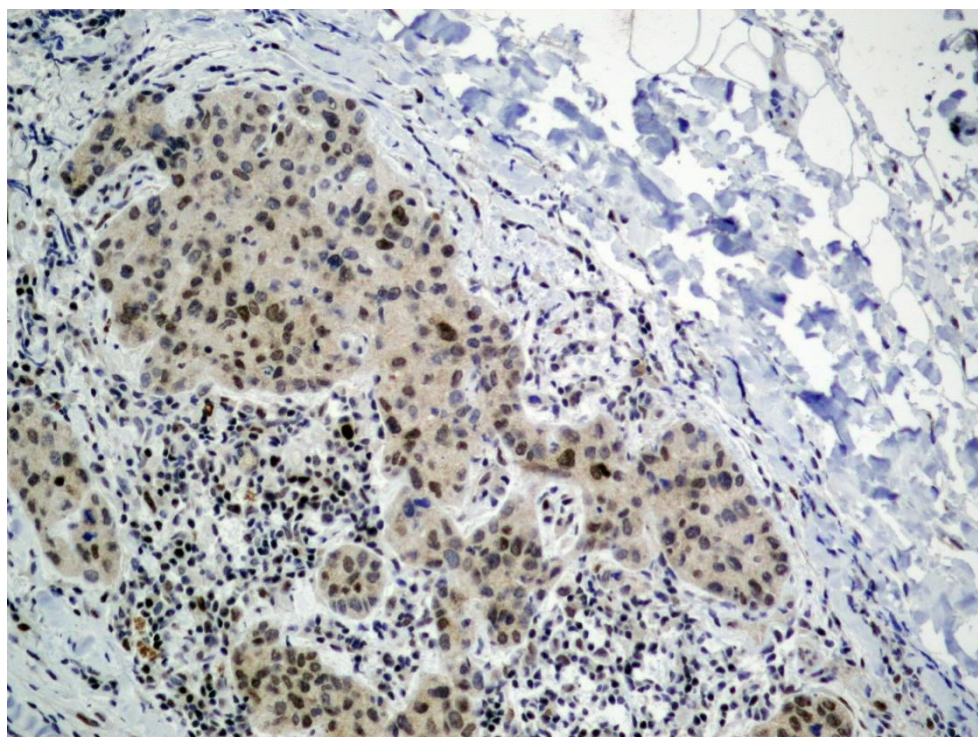
Slika 8. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 3915/2011, ERβ, 200×.



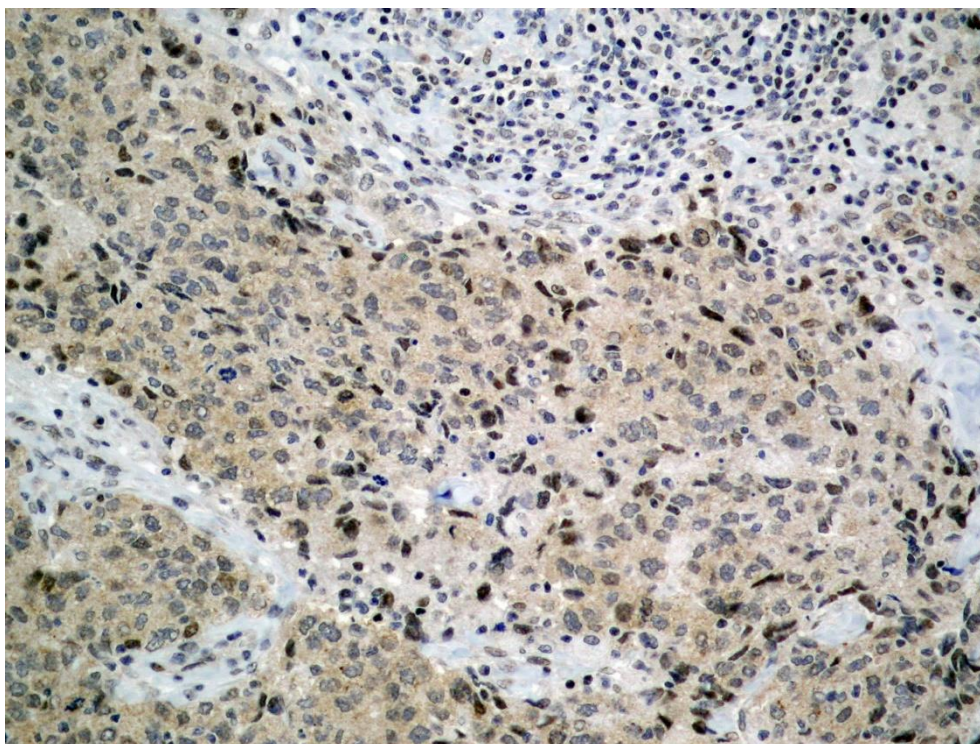
Slika 9. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 4130/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



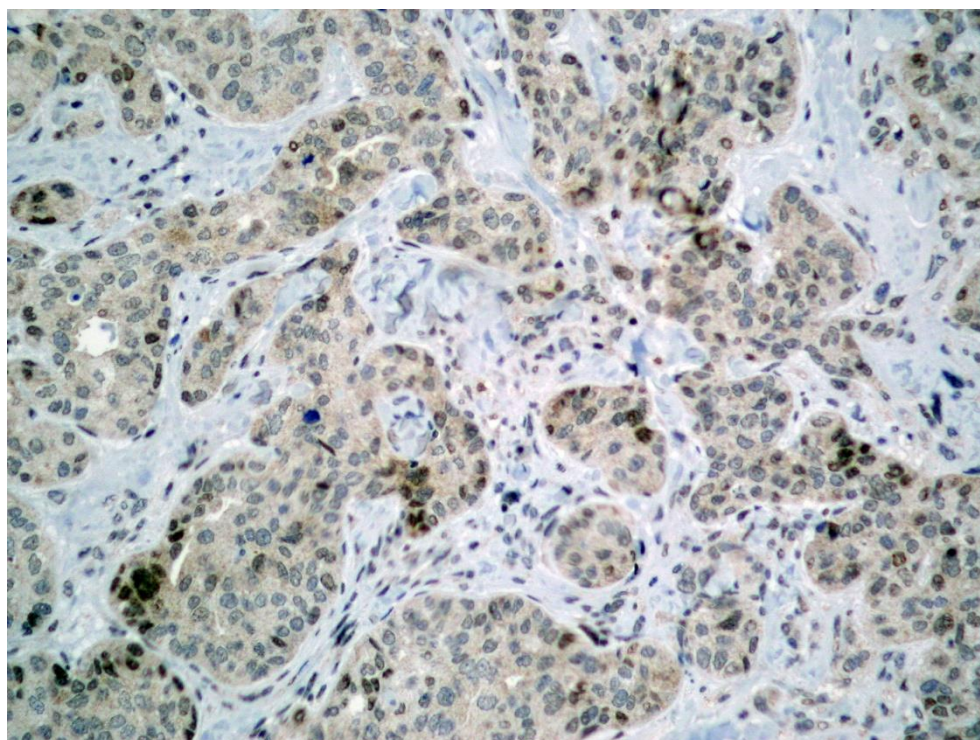
Slika 10. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 5077/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



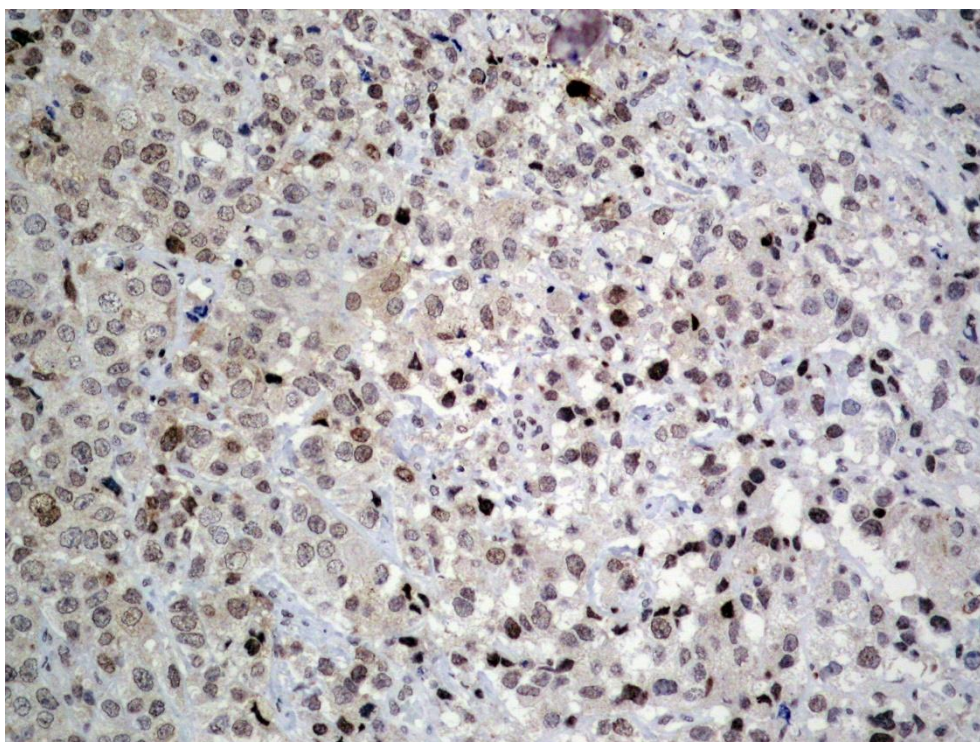
Slika 11. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 6422/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



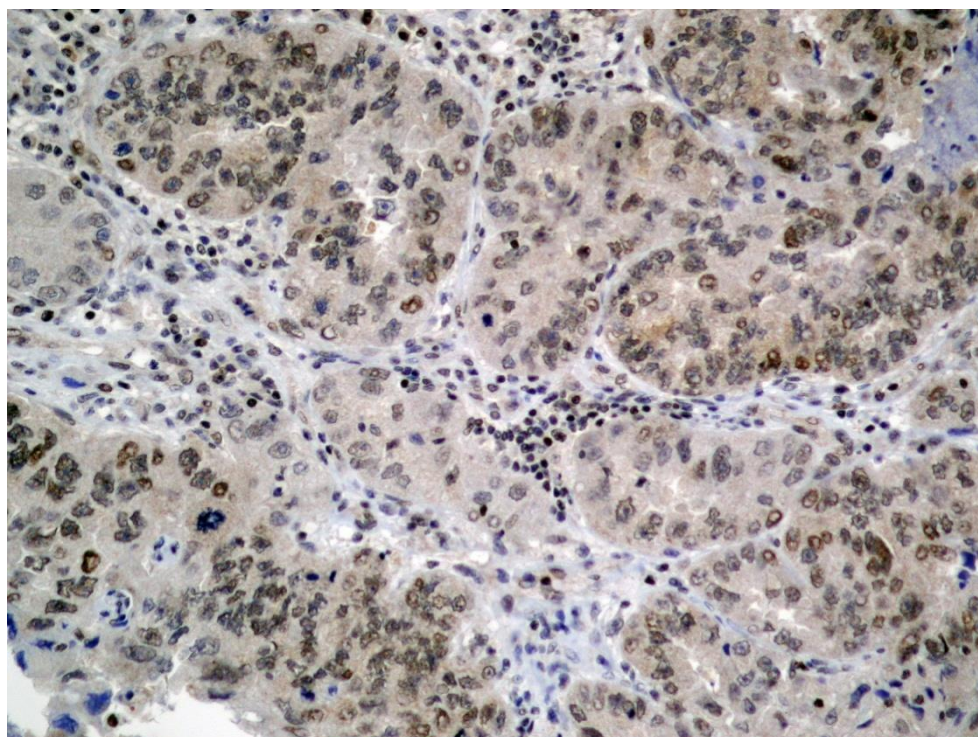
Slika 12. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 6547/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



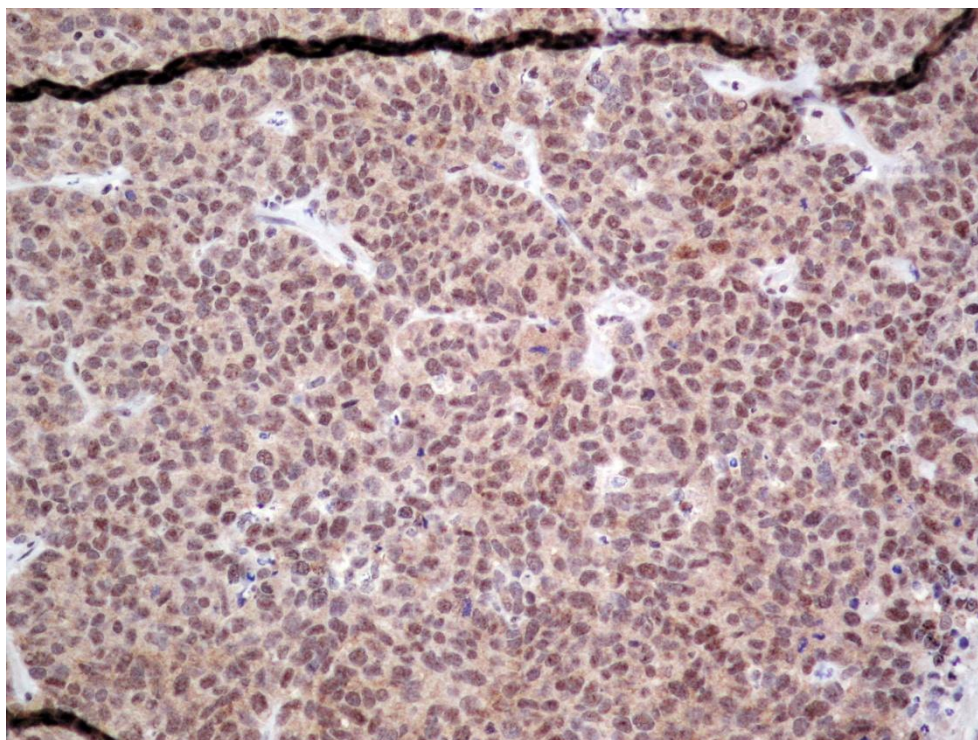
Slika 13. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 6780/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



Slika 14. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8397/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .

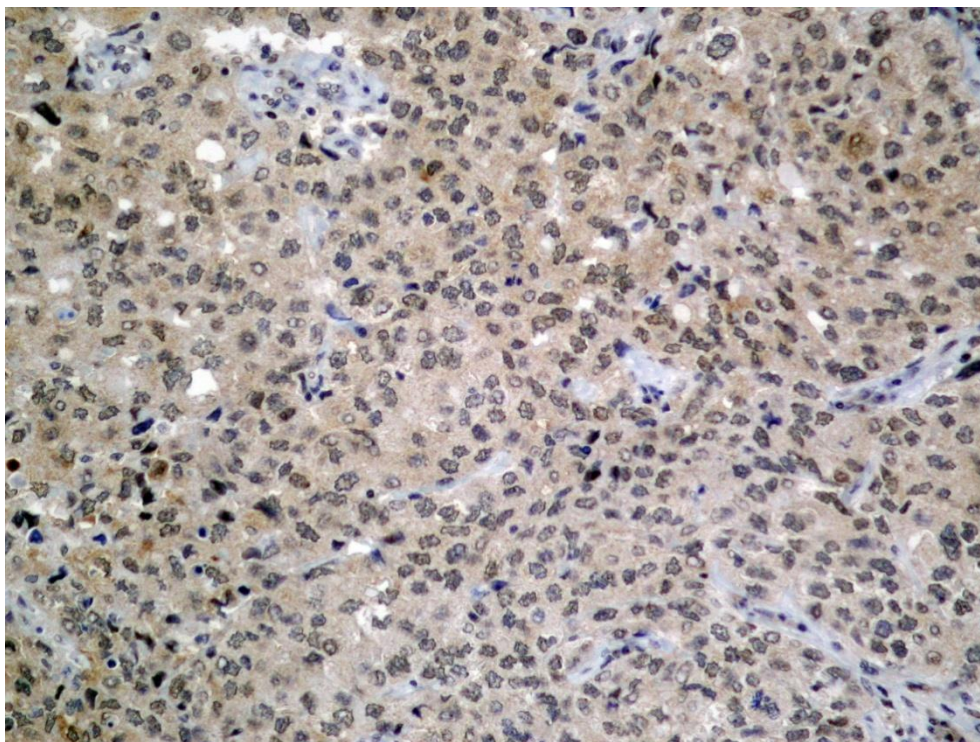


Slika 15. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8539/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .

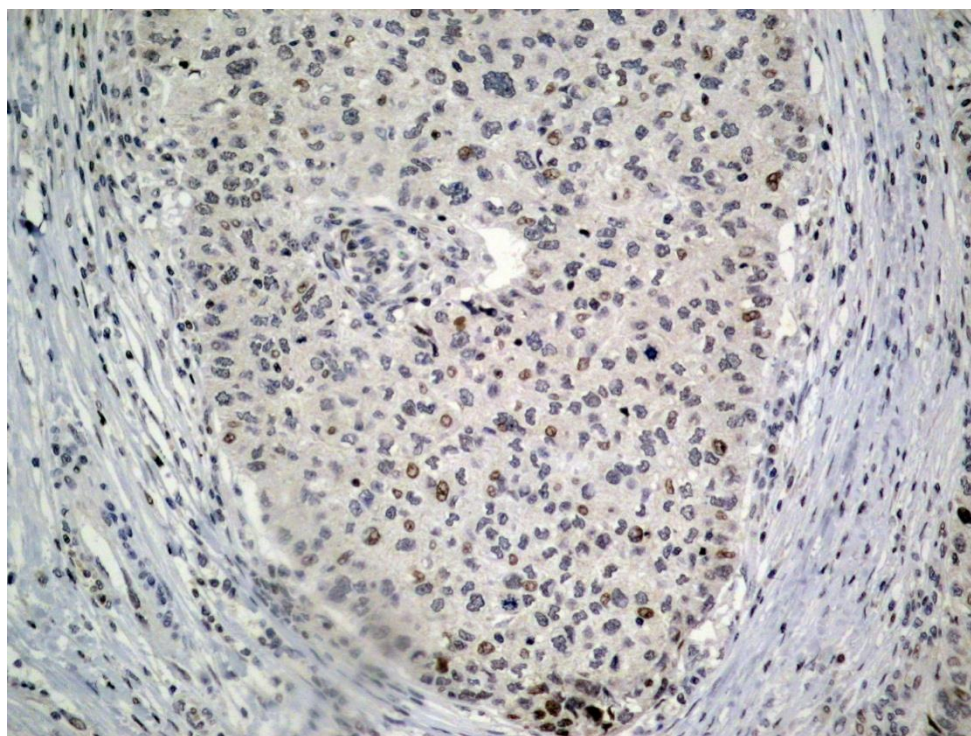


Slika 16. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8585/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .

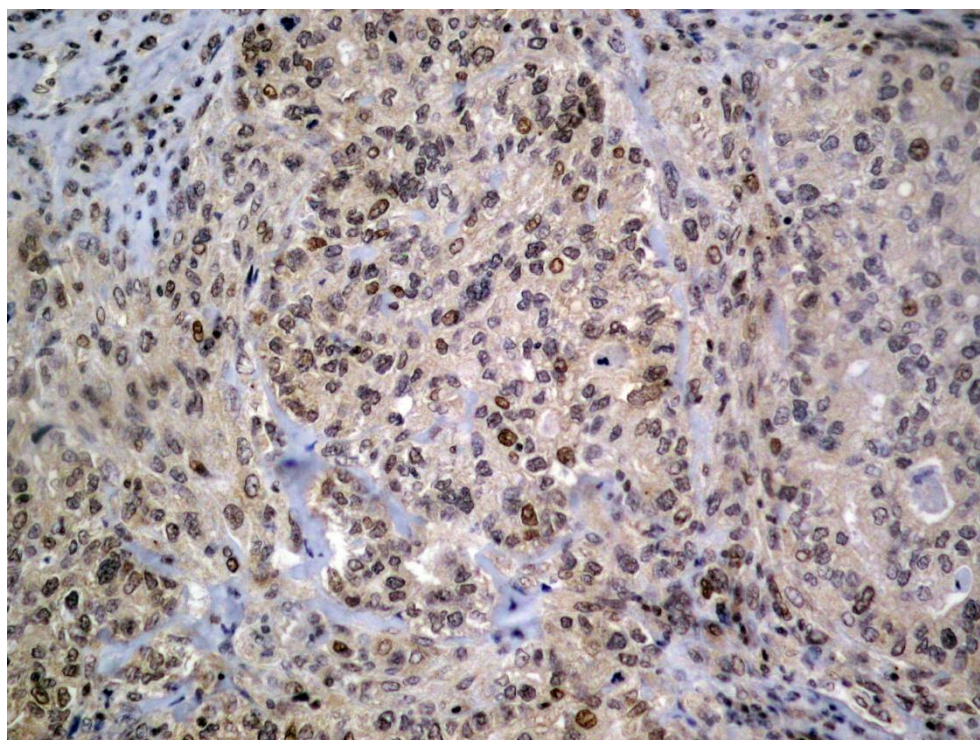




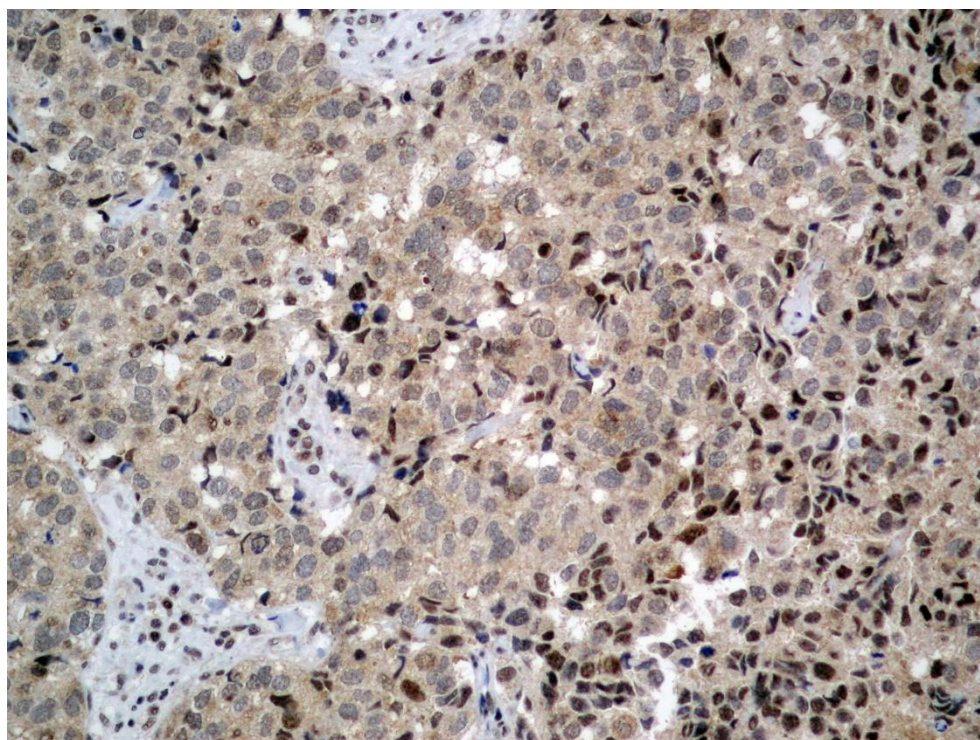
Slika 17. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8741/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



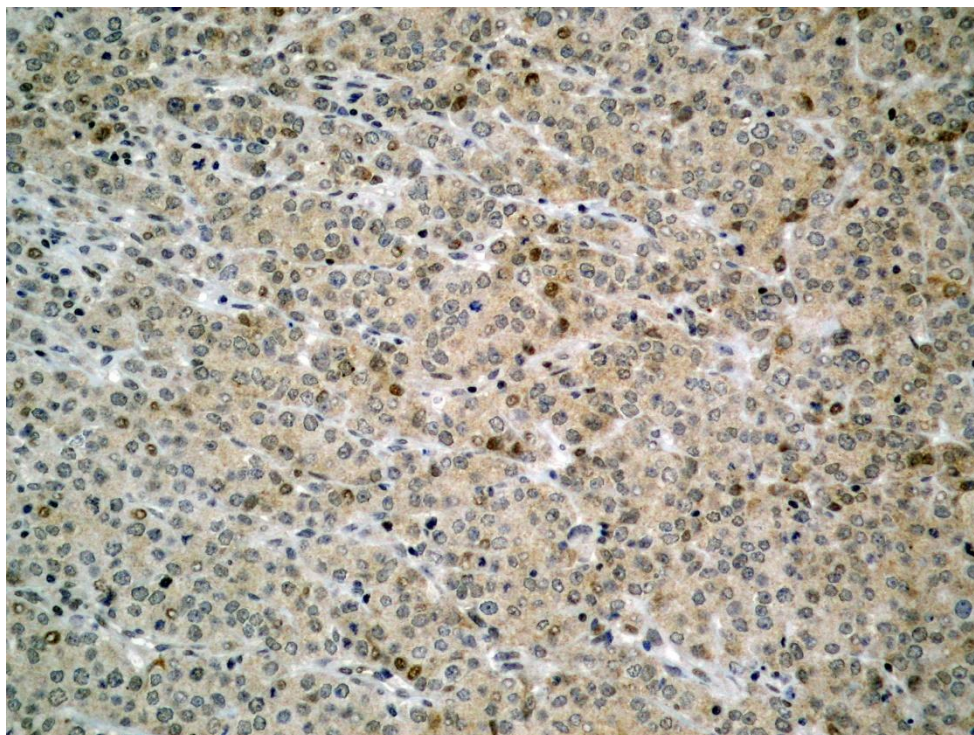
Slika 18. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 9486/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



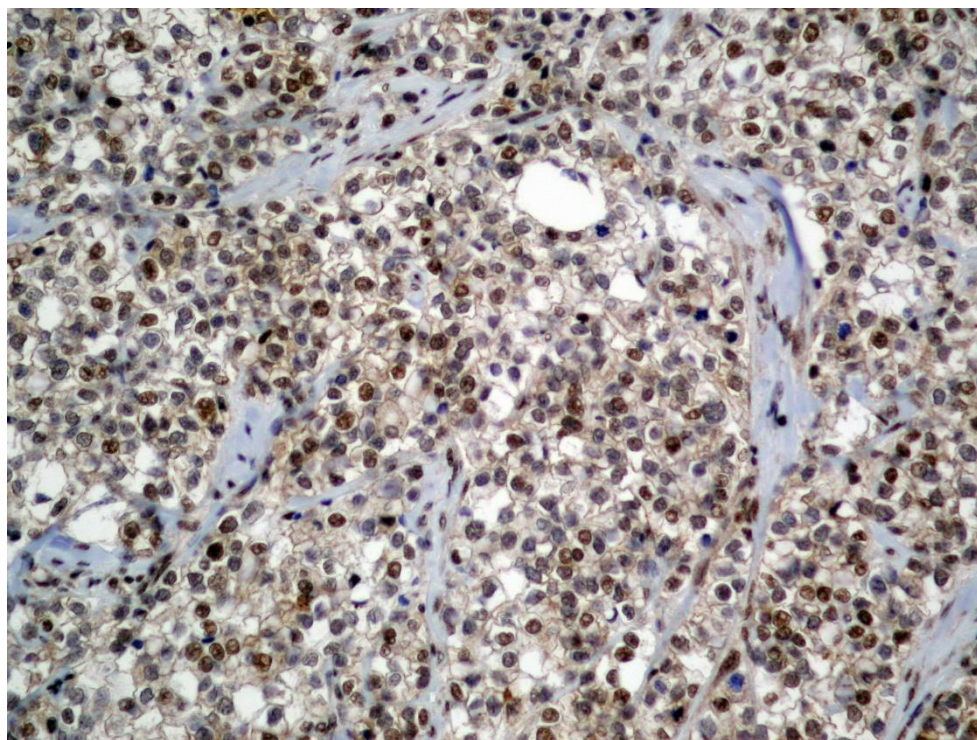
Slika 19. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 9490/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



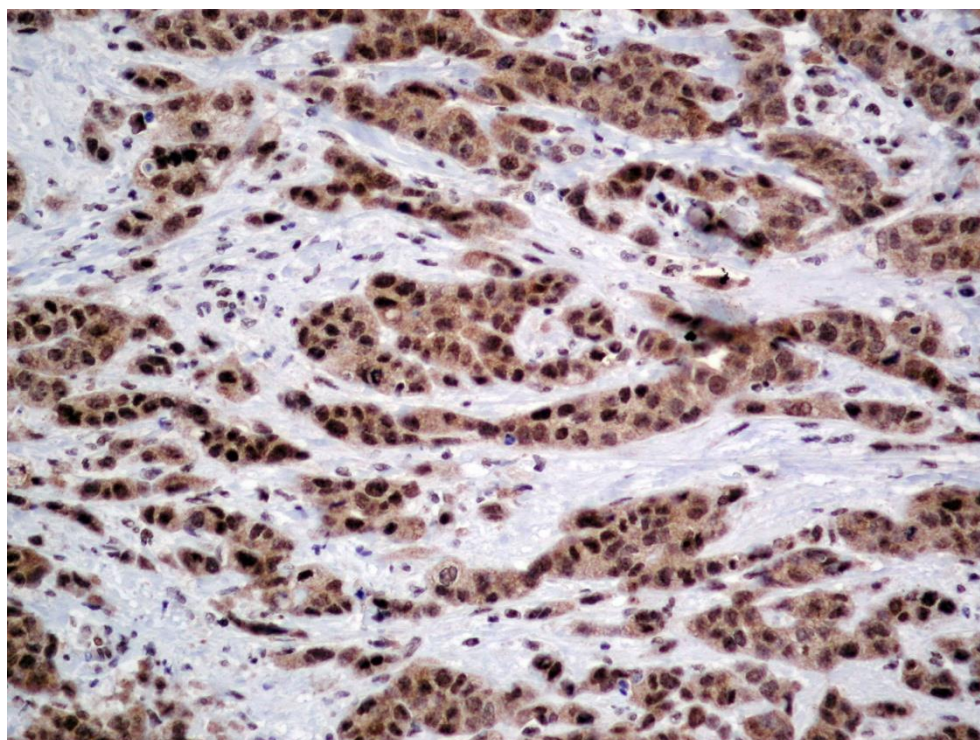
Slika 20. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 10089/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



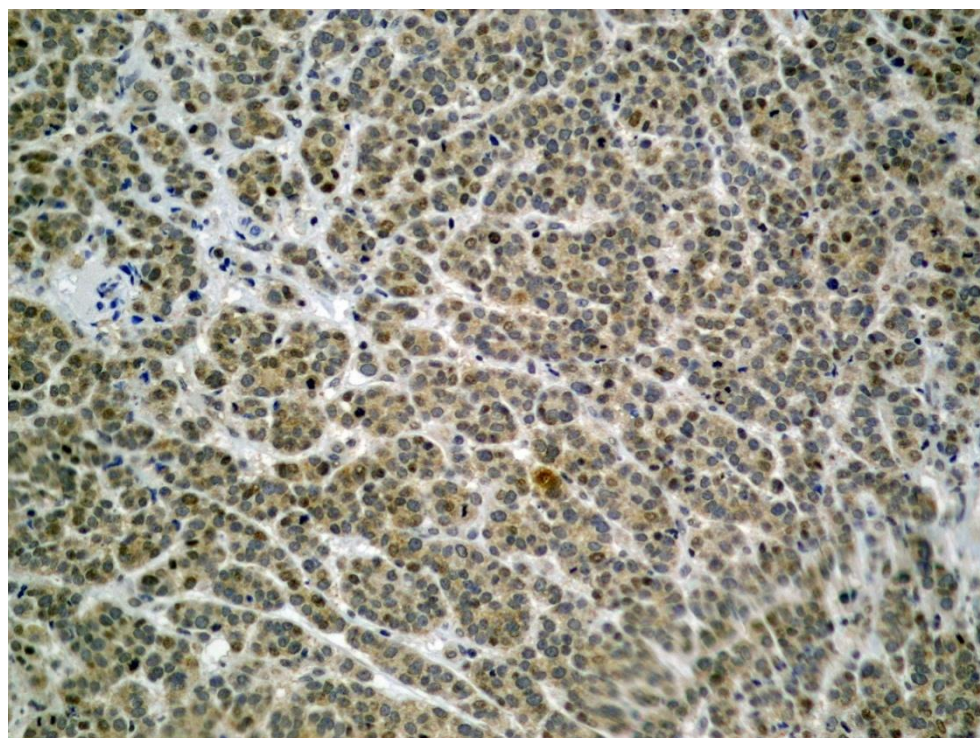
Slika 21. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 10285/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



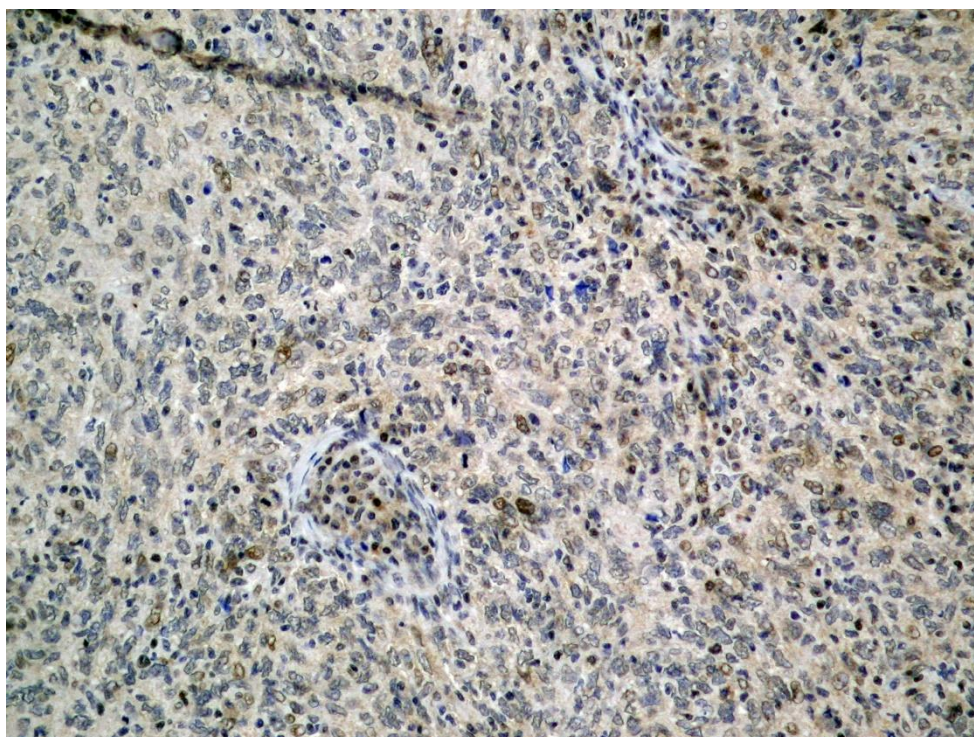
Slika 22. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 10042/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



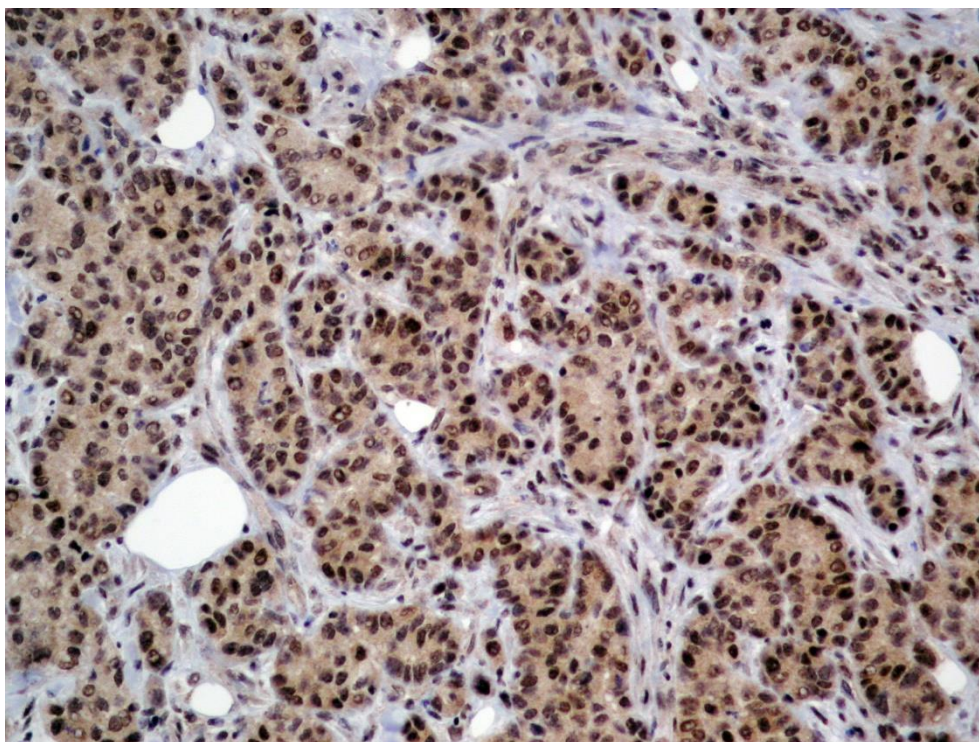
Slika 23. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11137/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



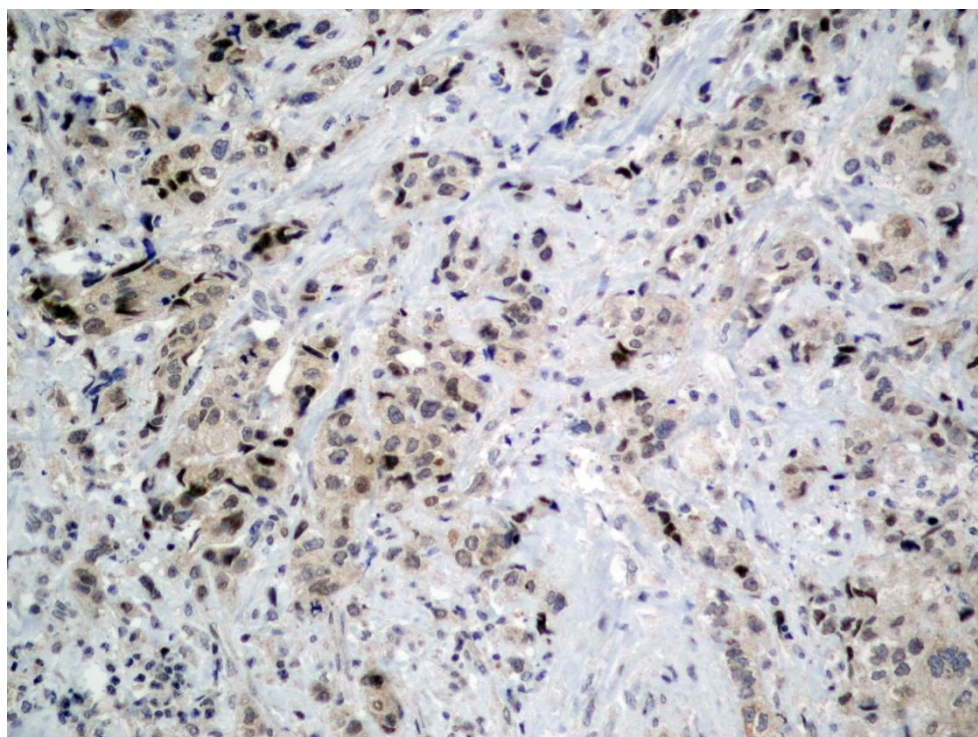
Slika 24. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11318/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



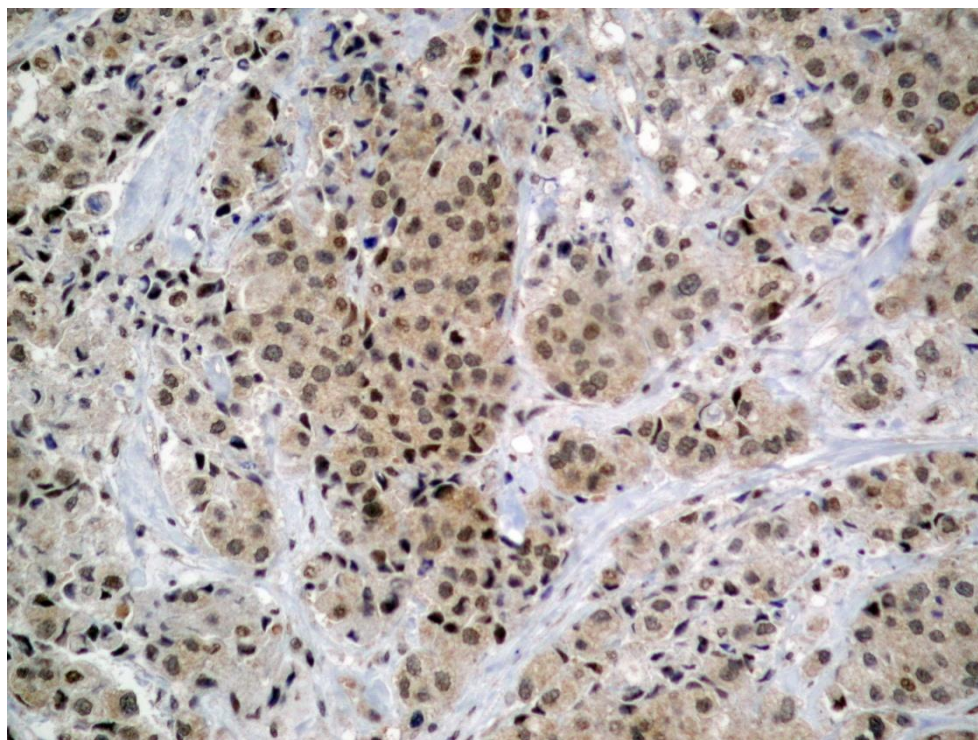
Slika 25. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11392/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



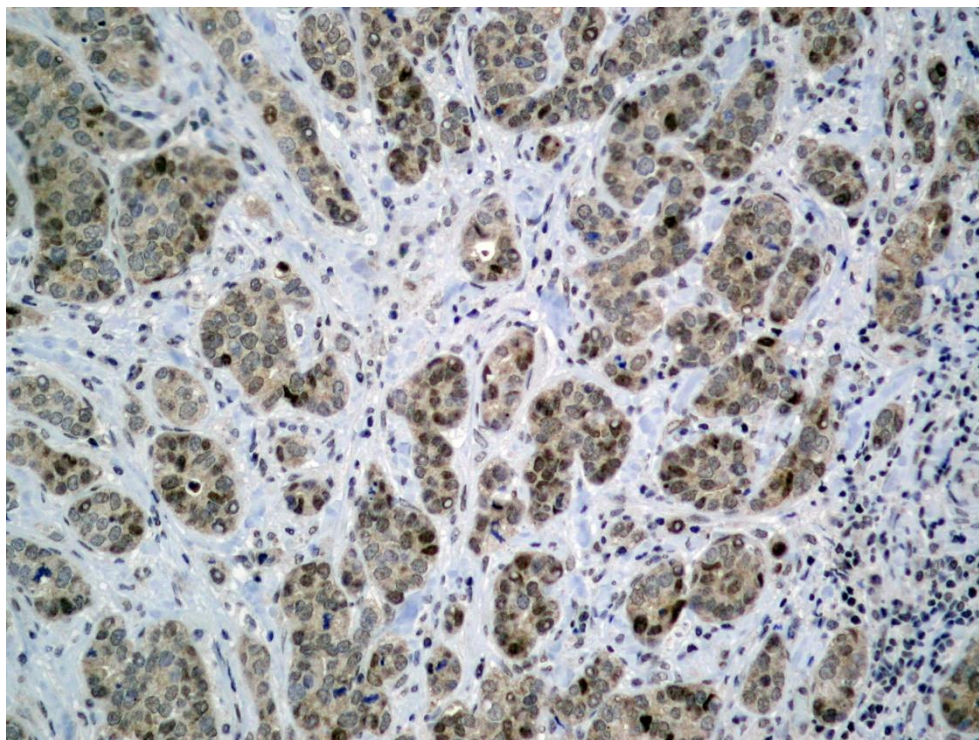
Slika 26. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11959/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



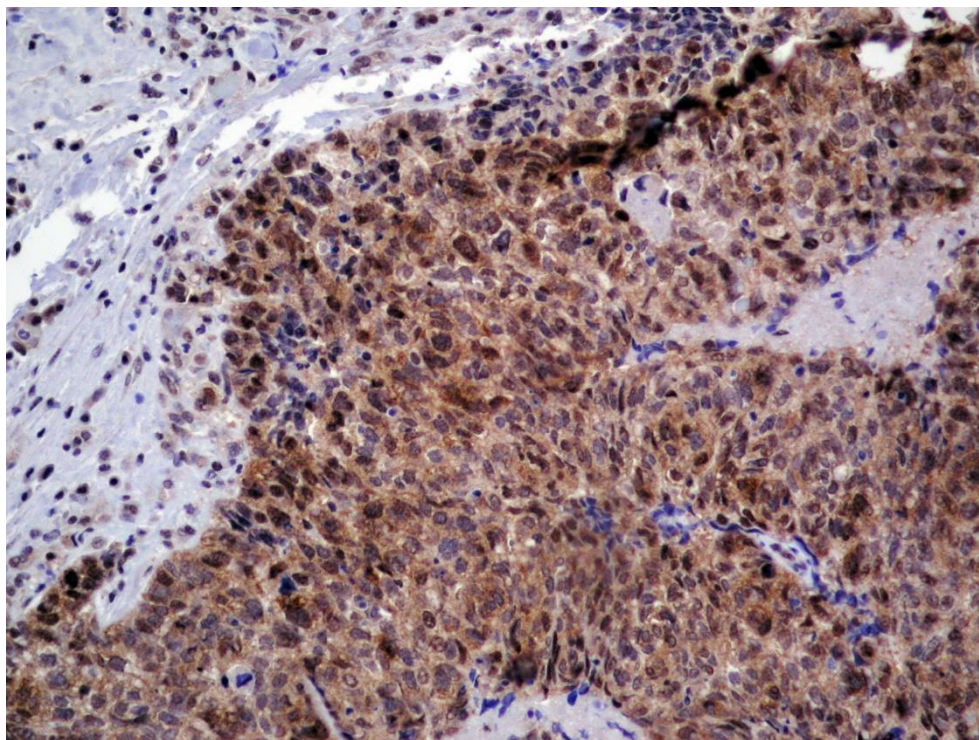
Slika 27. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 12115/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



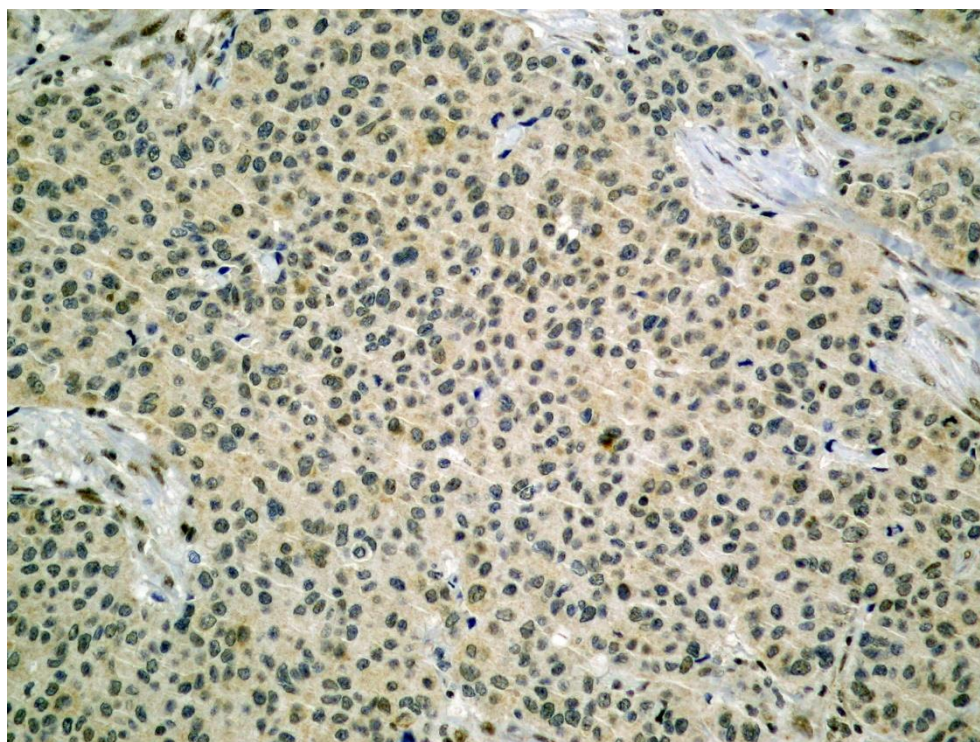
Slika 28. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 13970/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



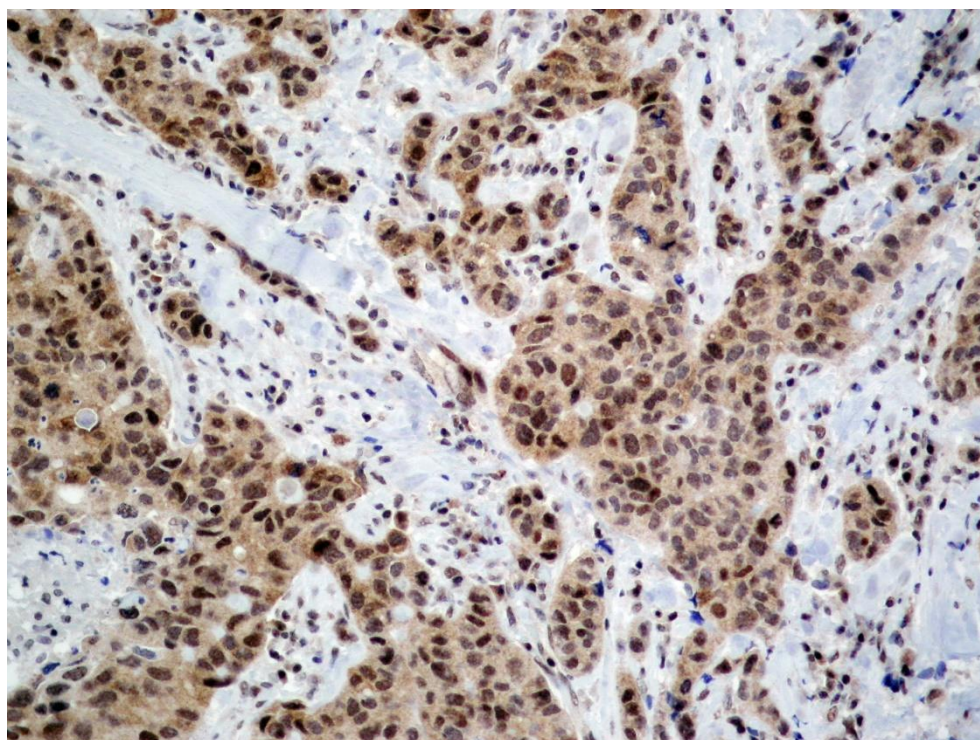
Slika 29. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 13973/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



Slika 30. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 14088/2011, ER $\beta$ , 200 $\times$ .

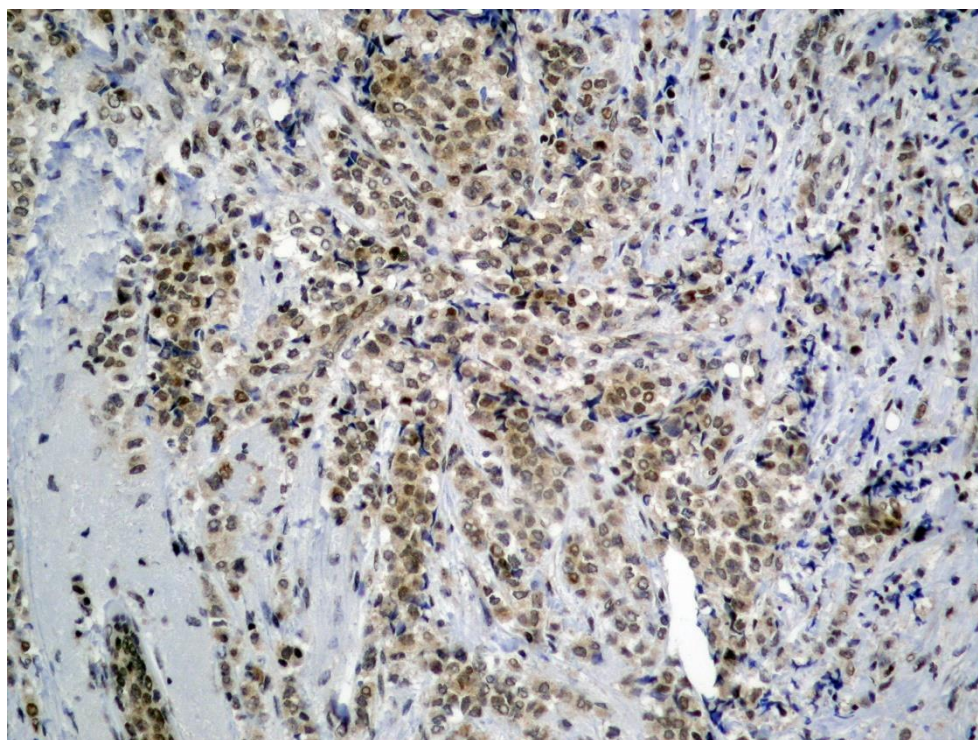


Slika 31. Kontrolna skupina, 46/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .

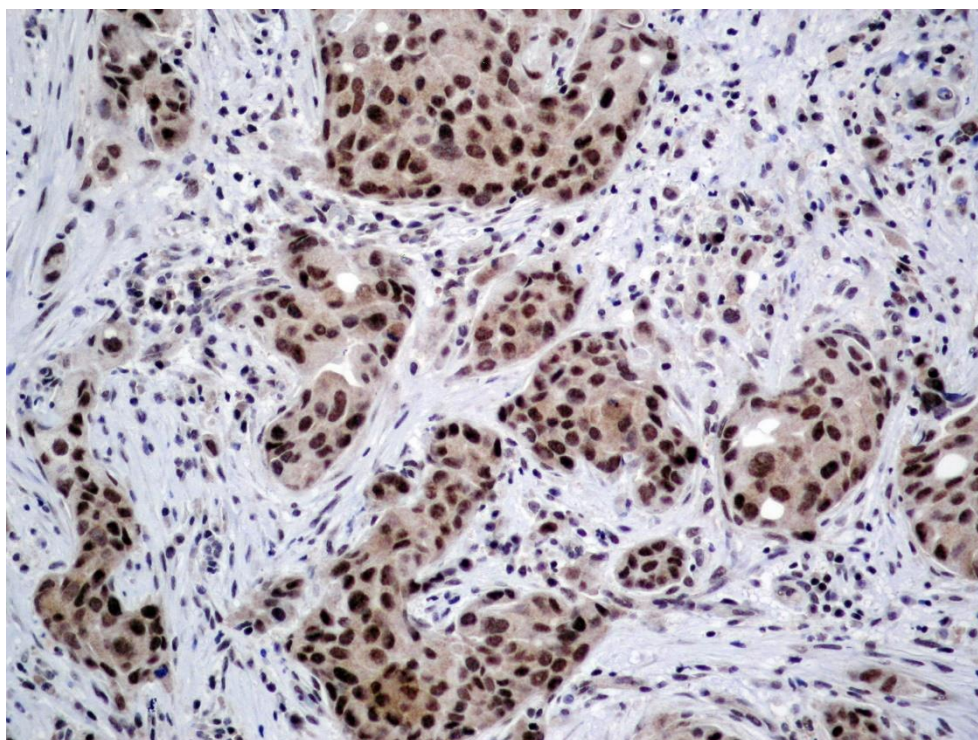


Slika 32. Kontrolna skupina, 113/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .

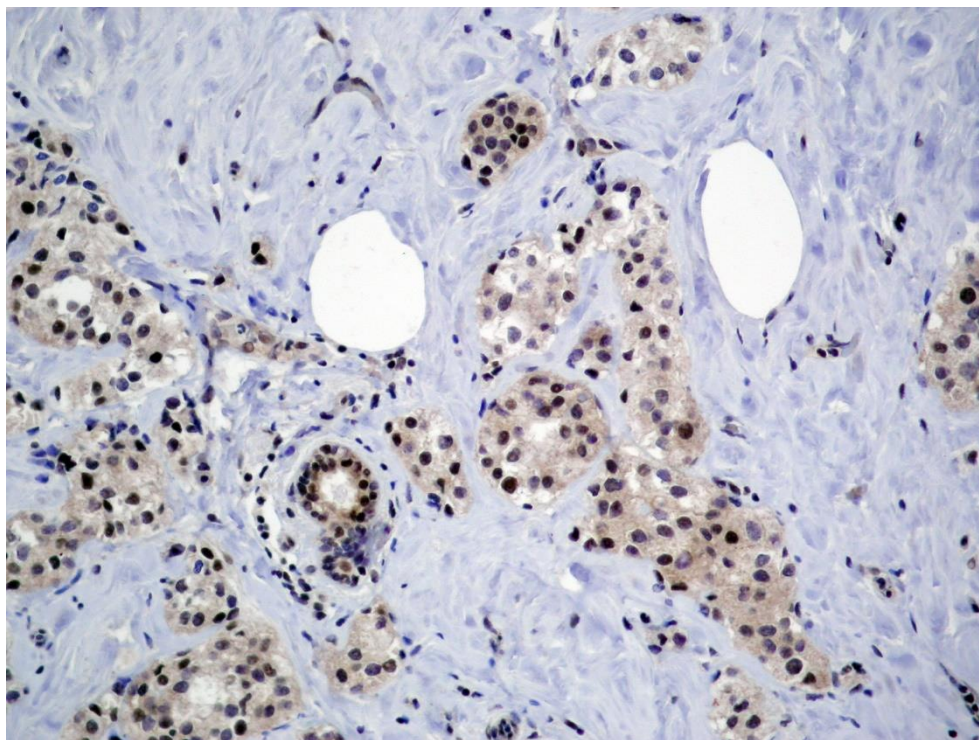




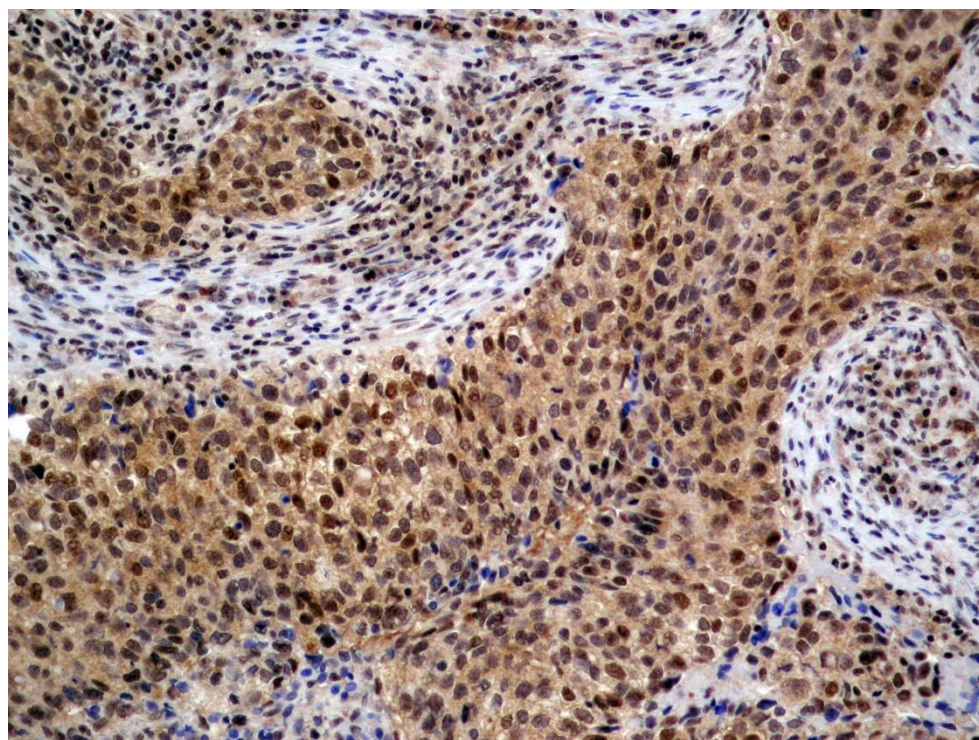
Slika 33. Kontrolna skupina, 645/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



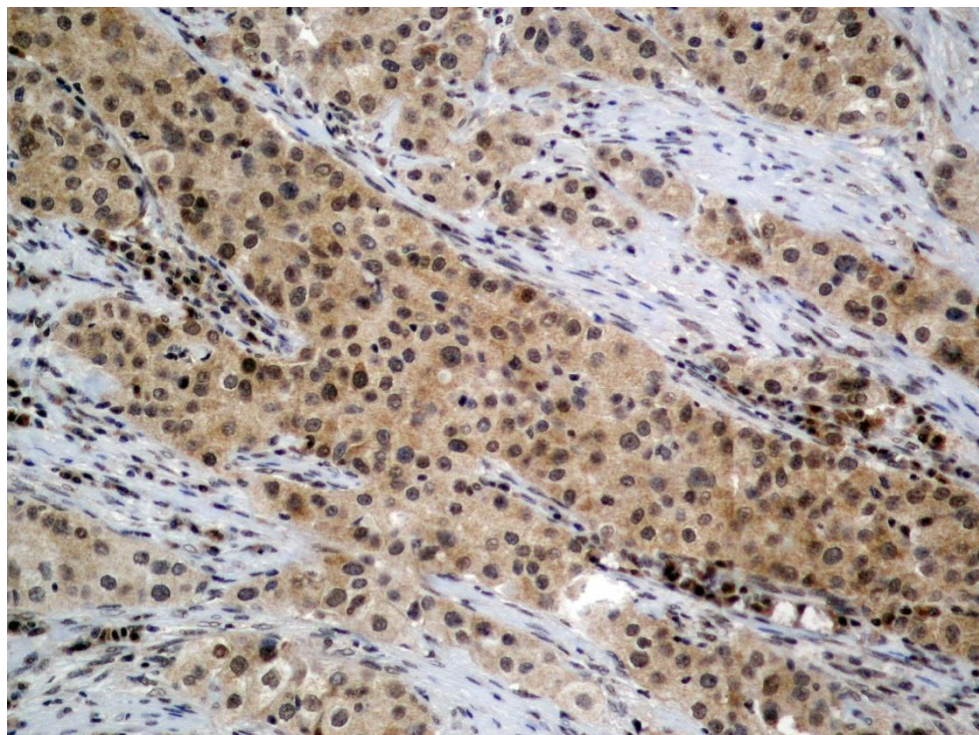
Slika 34. Kontrolna skupina, 656/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



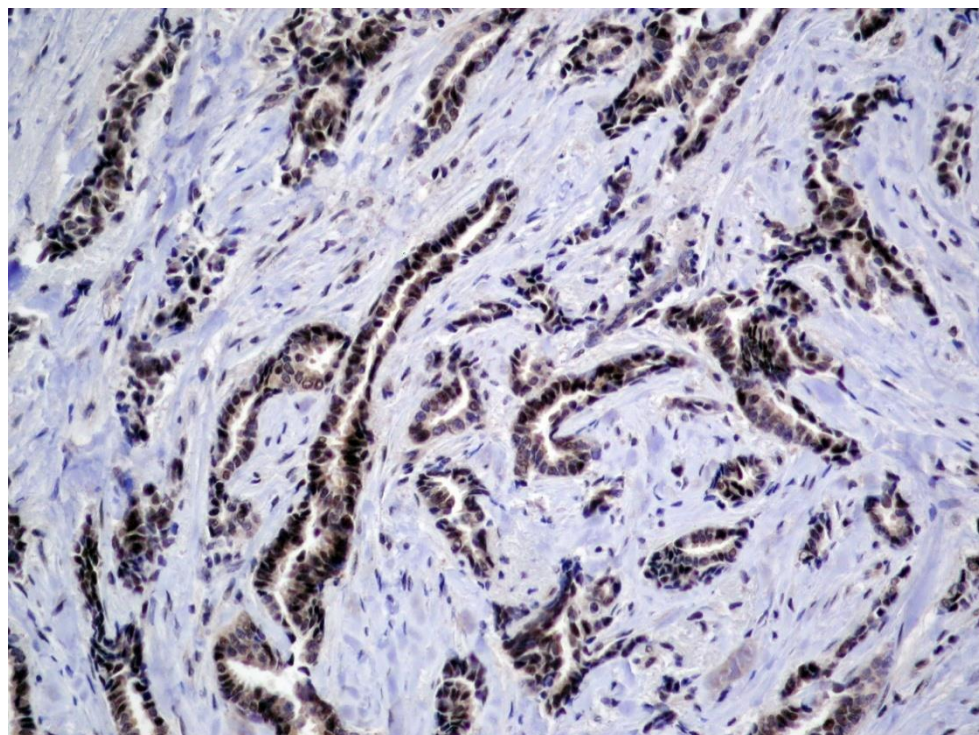
Slika 35. Kontrolna skupina, 839/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



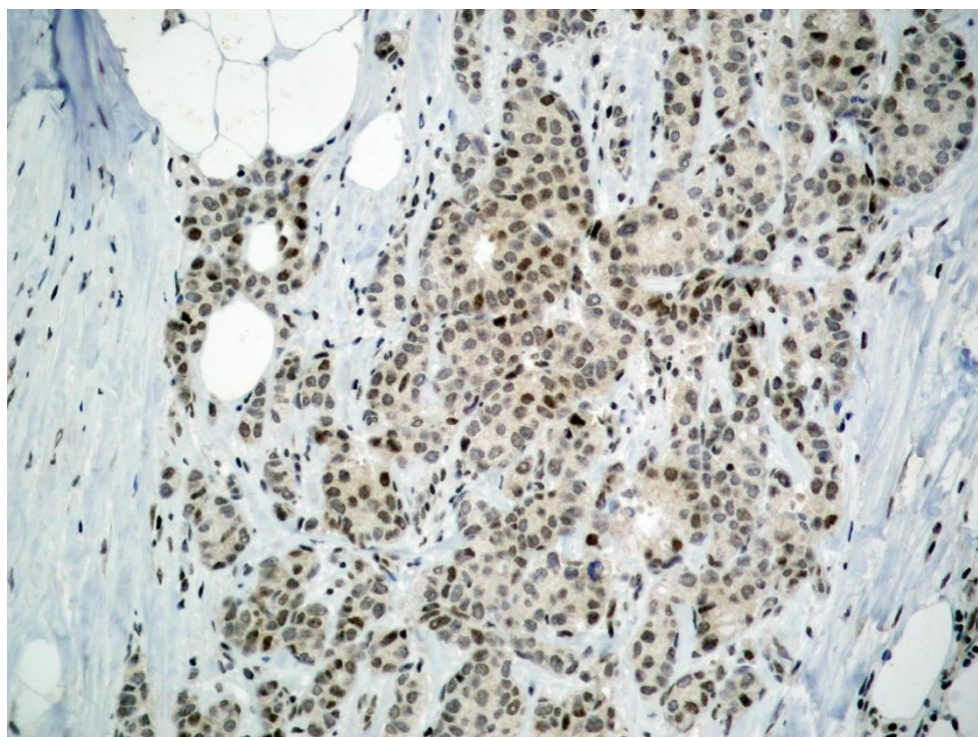
Slika 36. Kontrolna skupina, 903/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



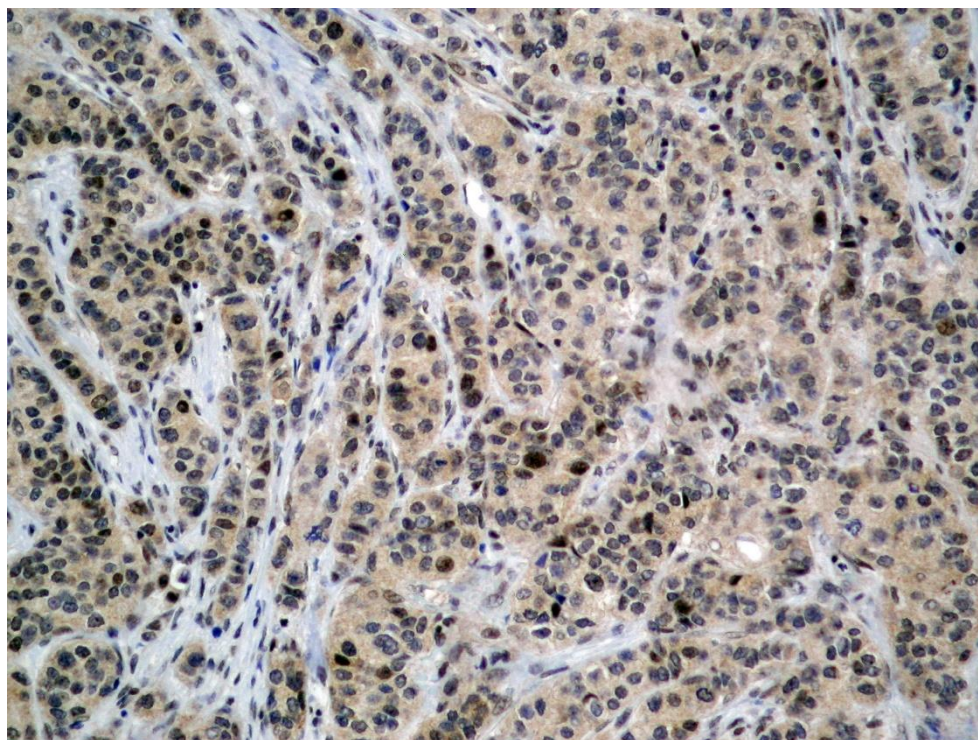
Slika 37. Kontrolna skupina, 1068/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



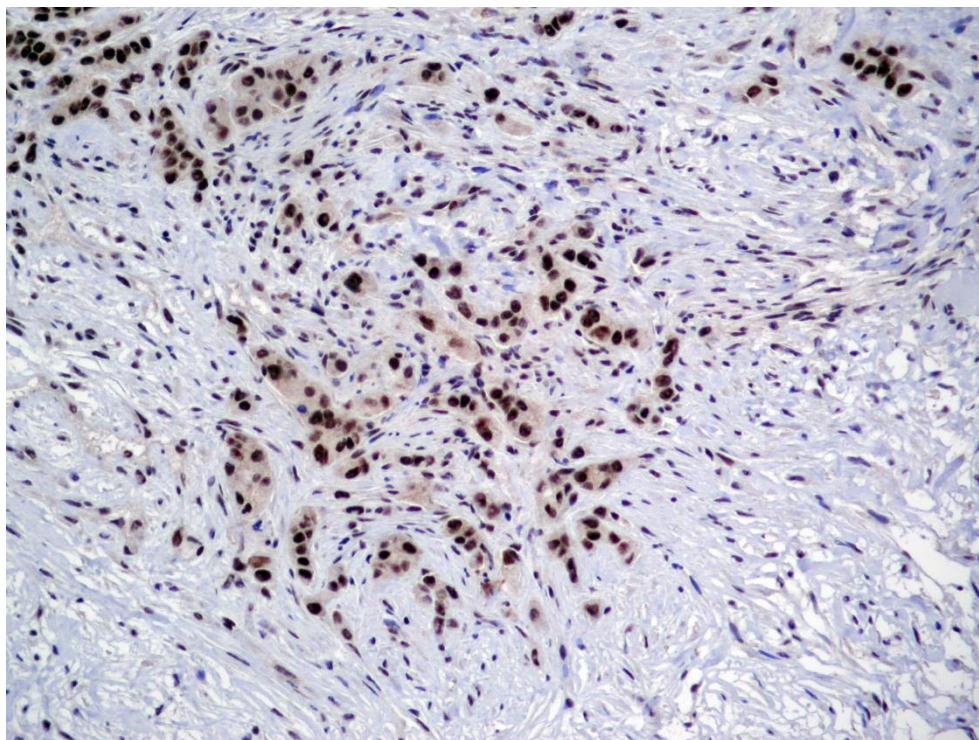
Slika 38. Kontrolna skupina, 1124/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



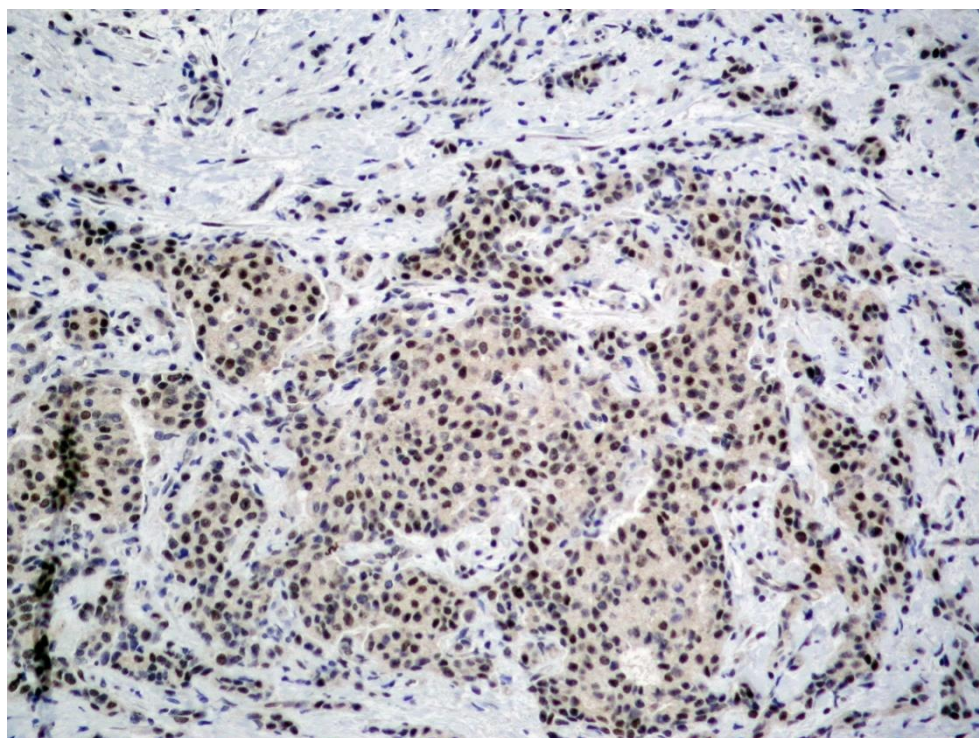
Slika 39. Kontrolna skupina, 1182/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



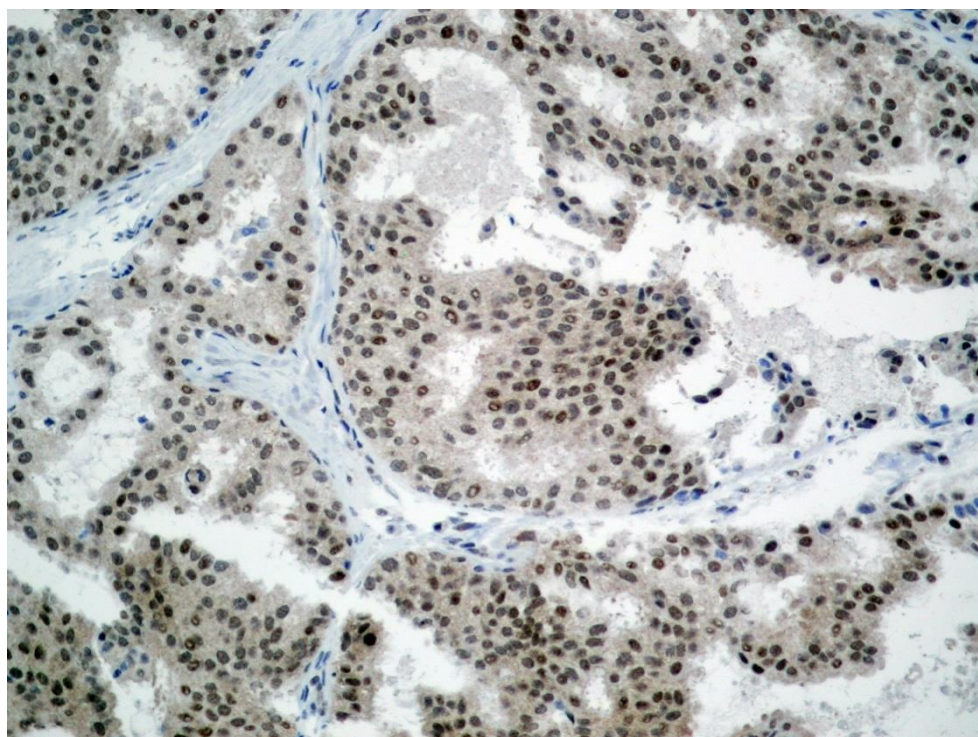
Slika 40. Kontrolna skupina, 1253/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



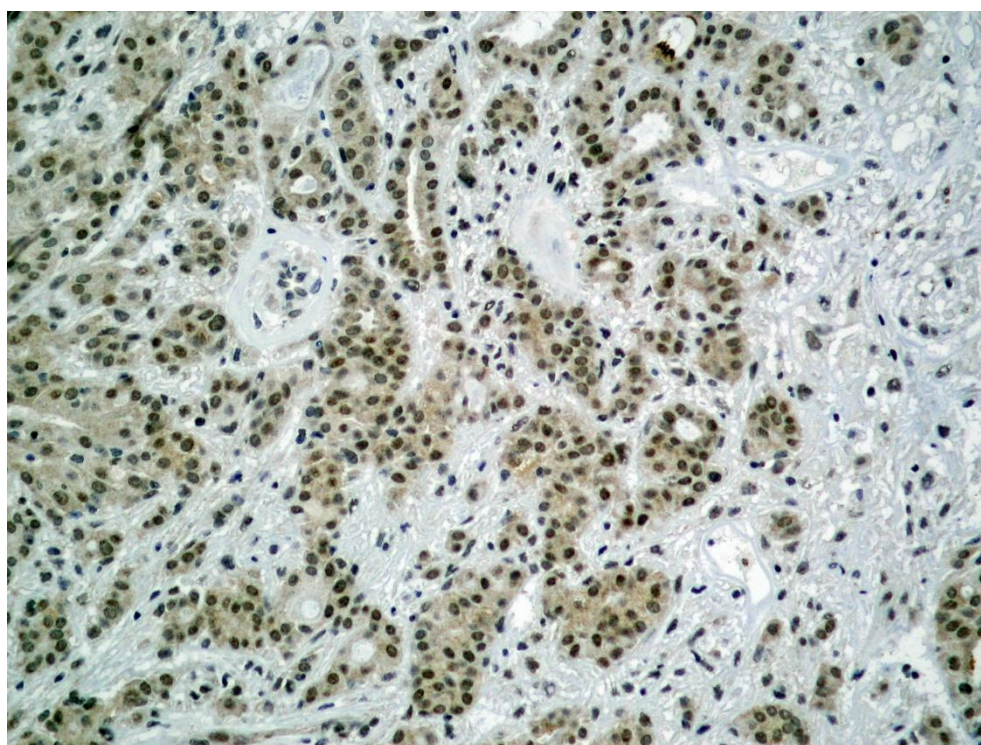
Slika 41. Kontrolna skupina, 1409/2010, ERβ, 200×.



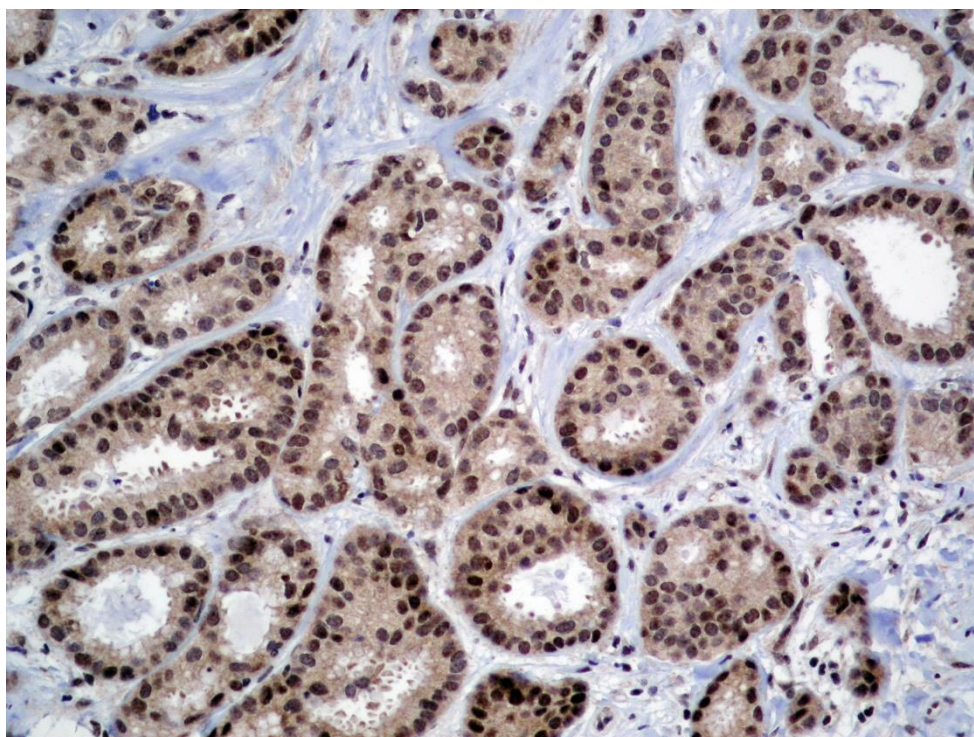
Slika 42. Kontrolna skupina, 1533/2010, ERβ, 200×.



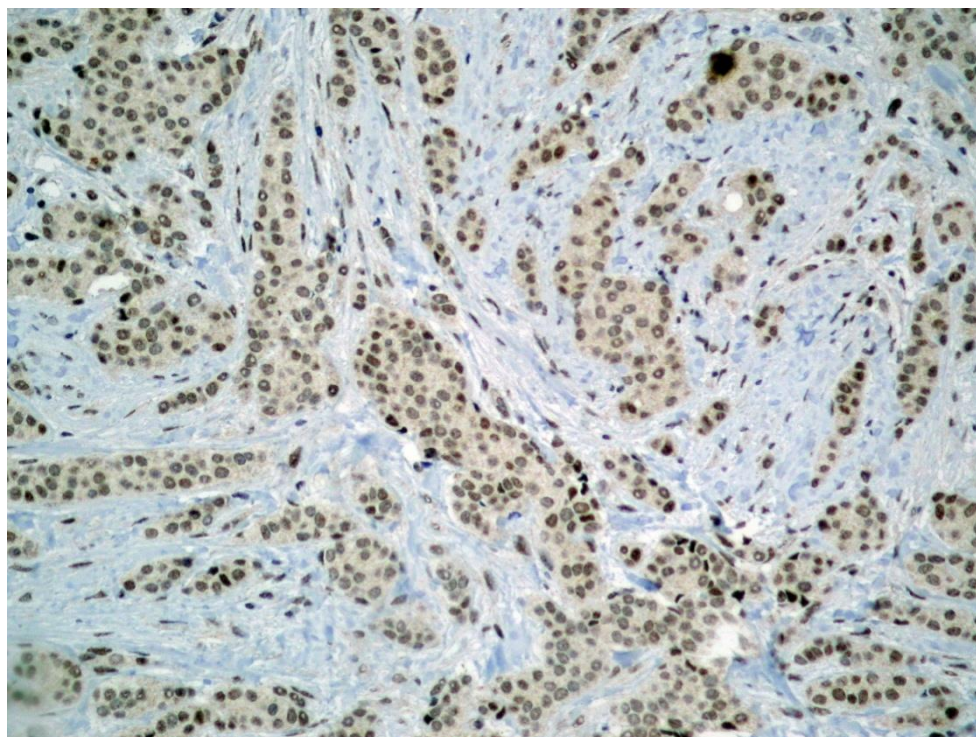
Slika 43. Kontrolna skupina, 1658/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



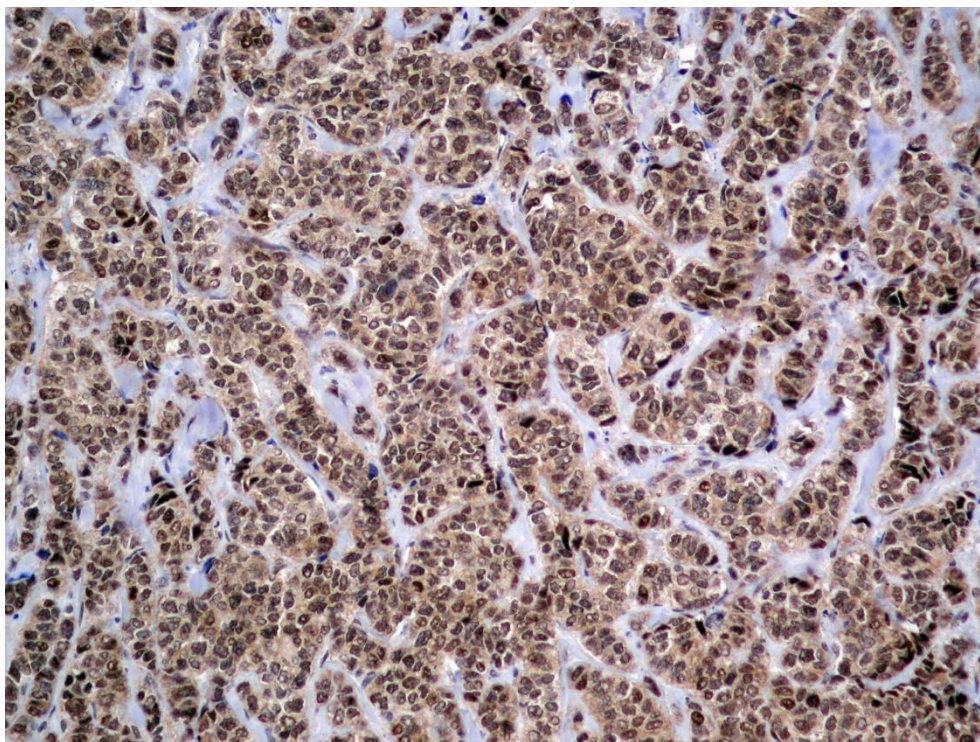
Slika 44. Kontrolna skupina, 1841/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



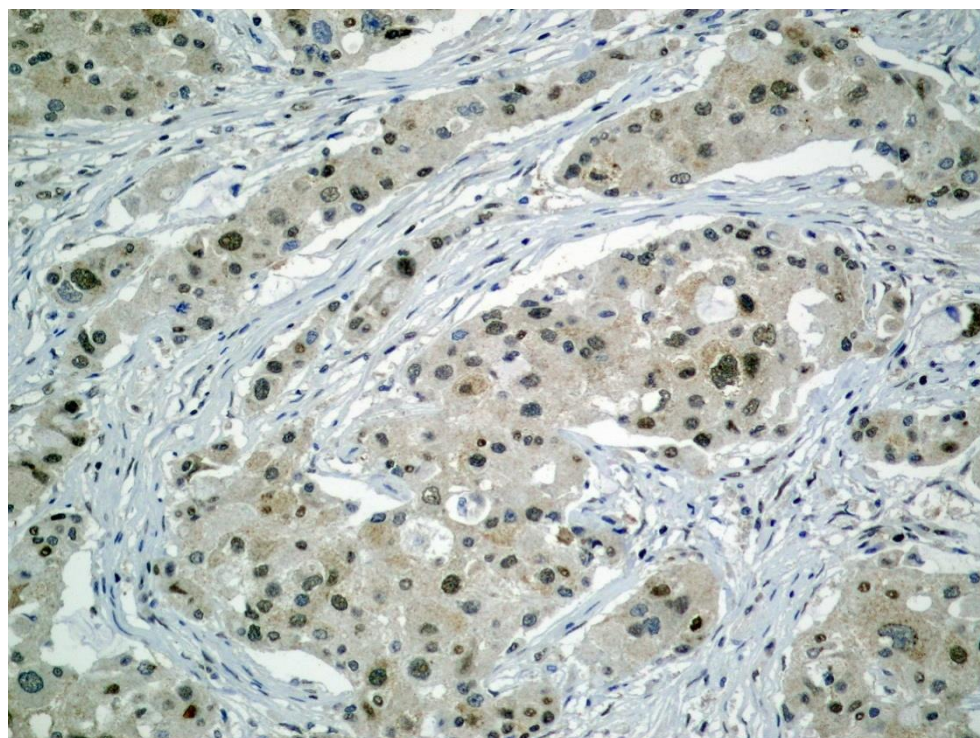
Slika 45. Kontrolna skupina, 1925/2010, ERβ, 200×.



Slika 46. Kontrolna skupina, 2200/2010, ERβ, 200×.

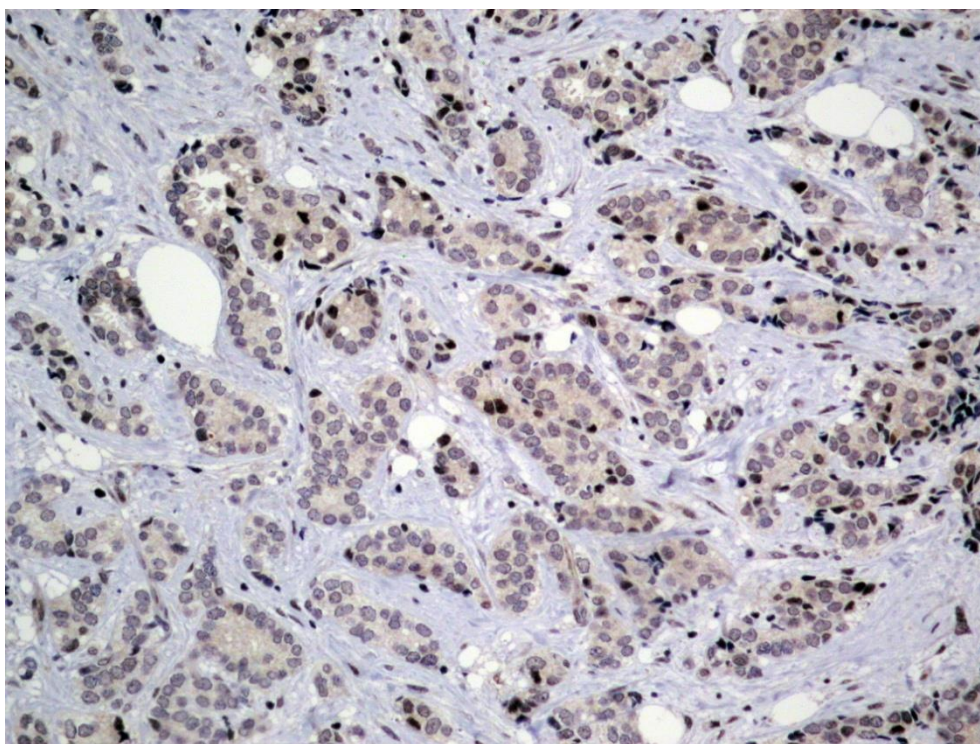


Slika 47. Kontrolna skupina, 2227/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .

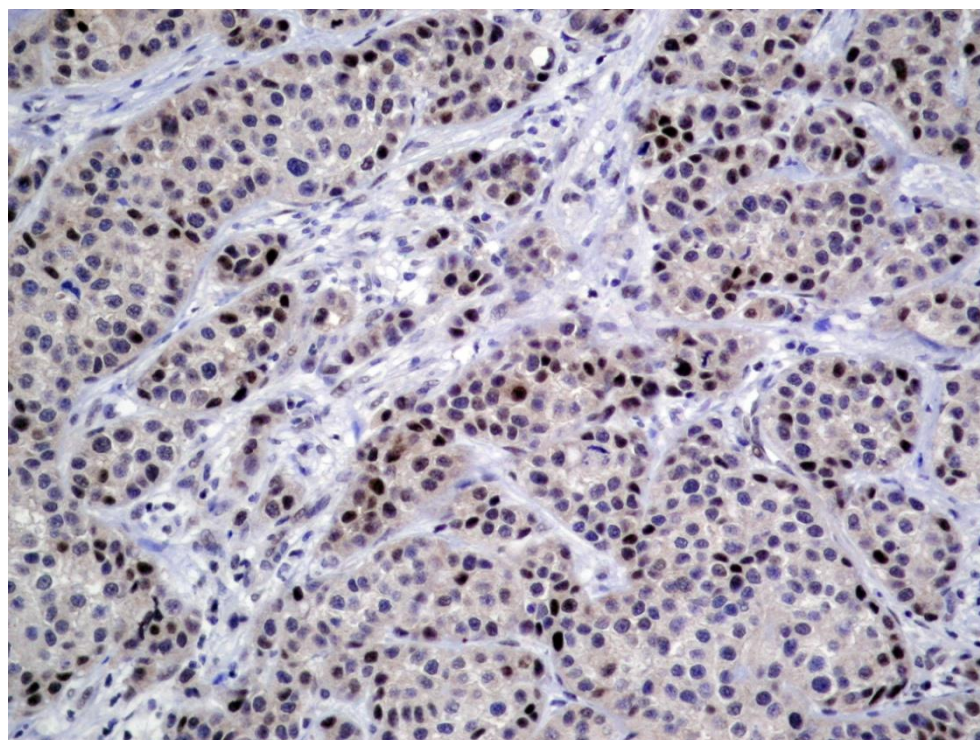


Slika 48. Kontrolna skupina, 2266/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .

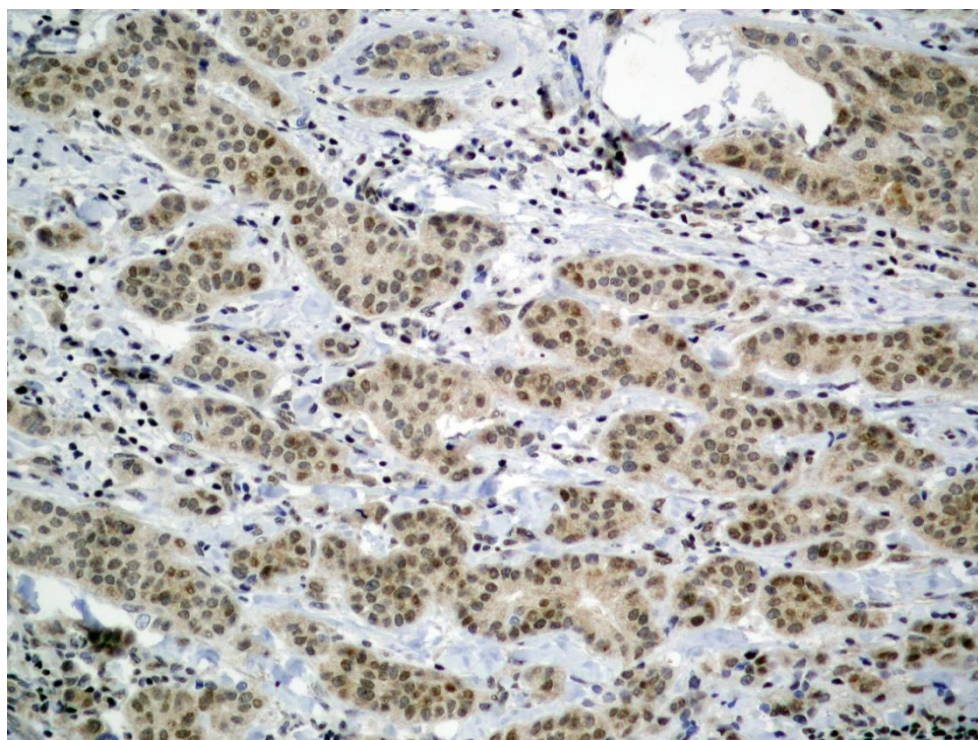




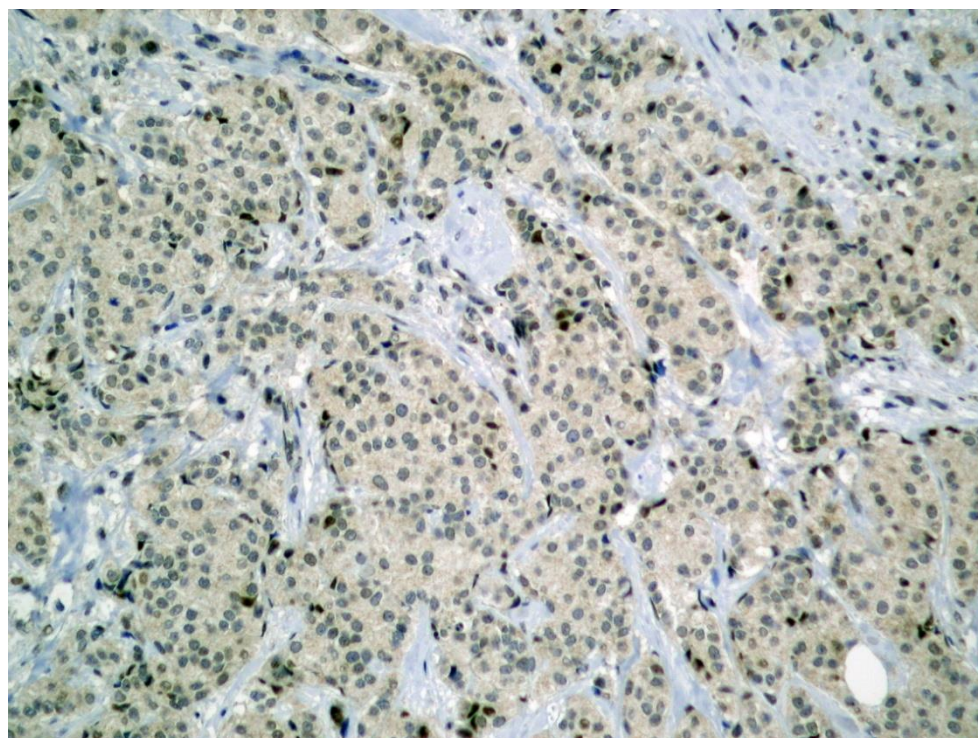
Slika 49. Kontrolna skupina, 2363/2010, ERβ, 200×.



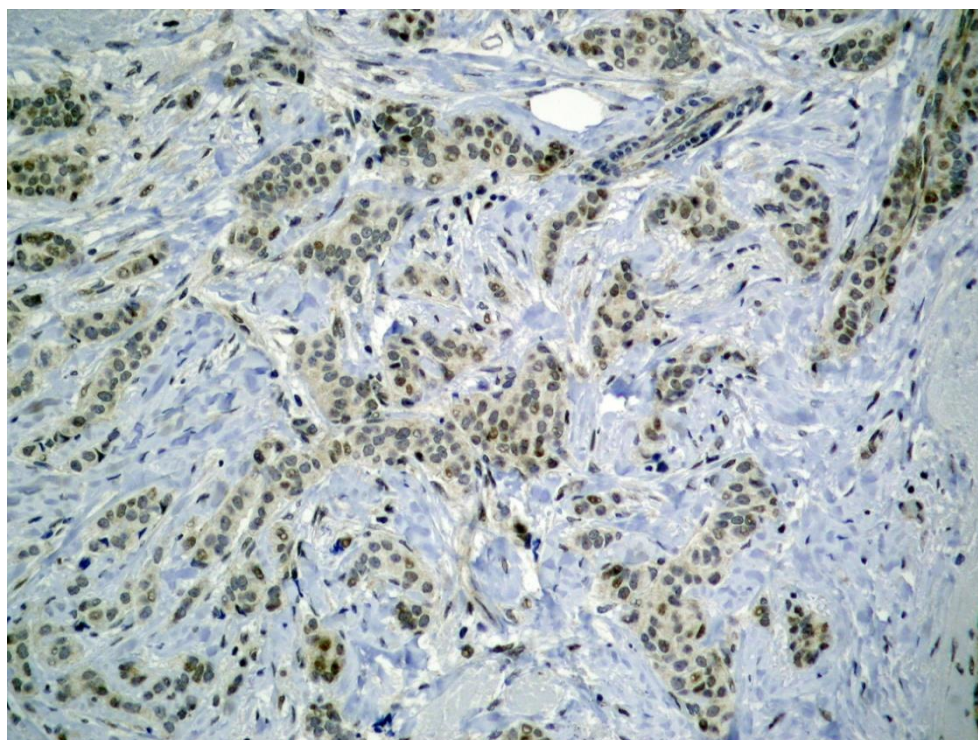
Slika 50. Kontrolna skupina, 2781/2010, ERβ, 200×.



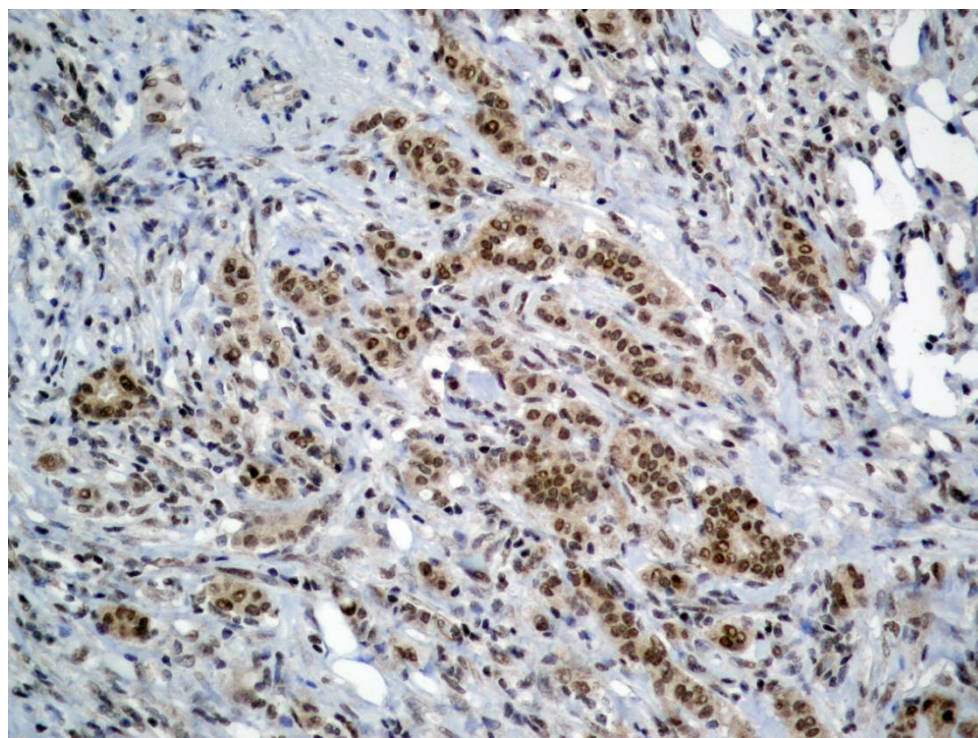
Slika 51. Kontrolna skupina, 2953/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



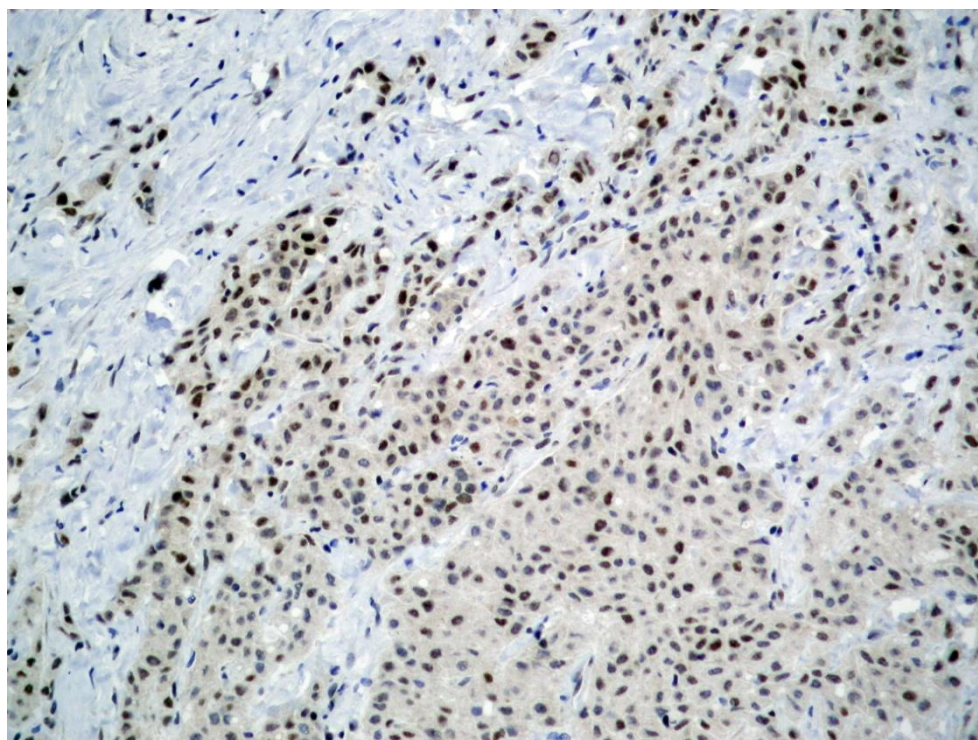
Slika 52. Kontrolna skupina, 3025/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



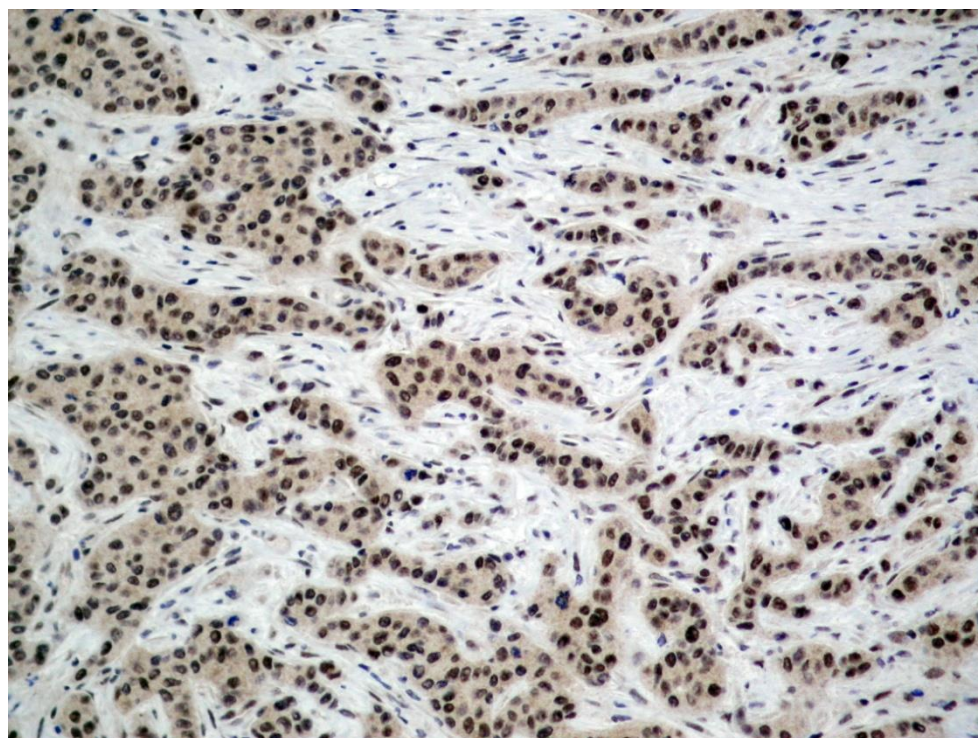
Slika 53. Kontrolna skupina, 3030/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



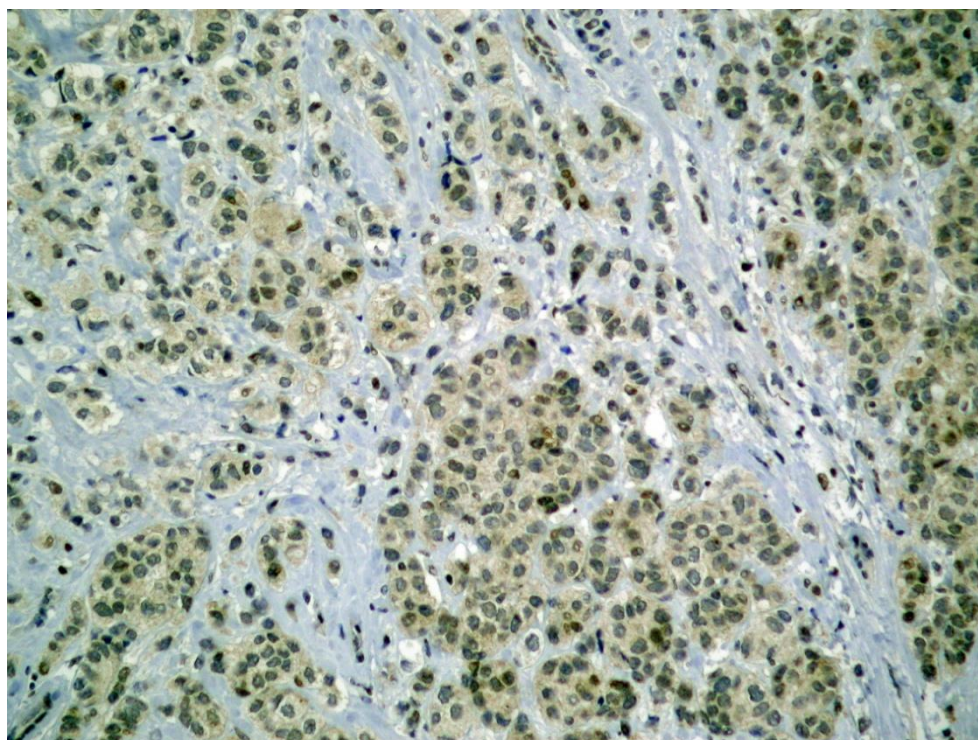
Slika 54. Kontrolna skupina, 3140/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



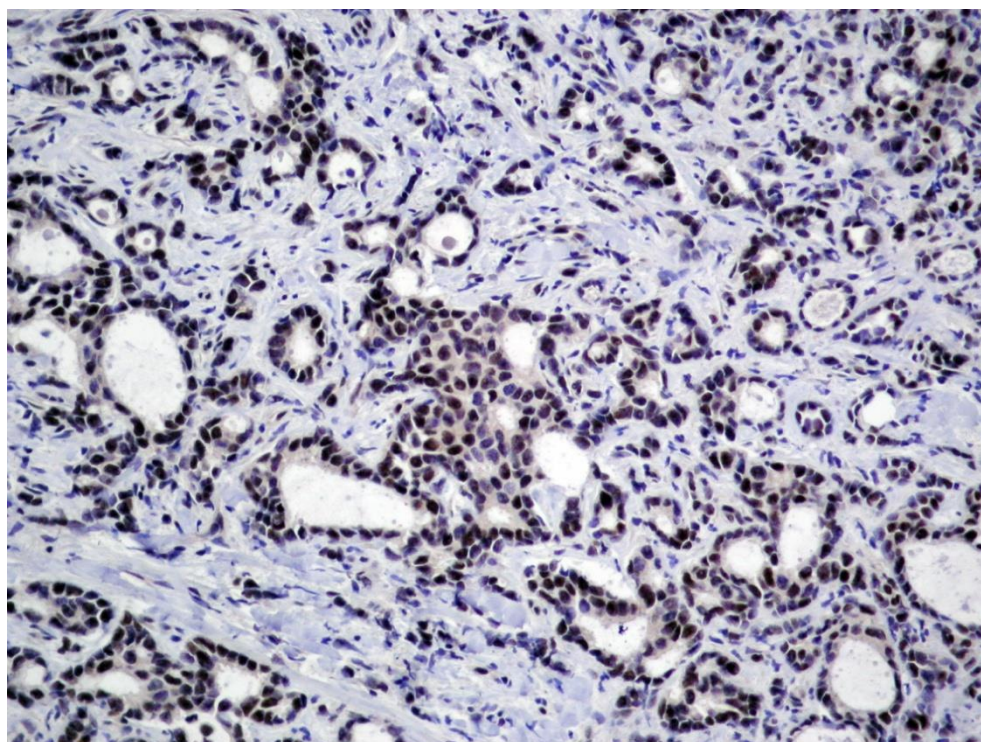
Slika 55. Kontrolna skupina, 3287/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



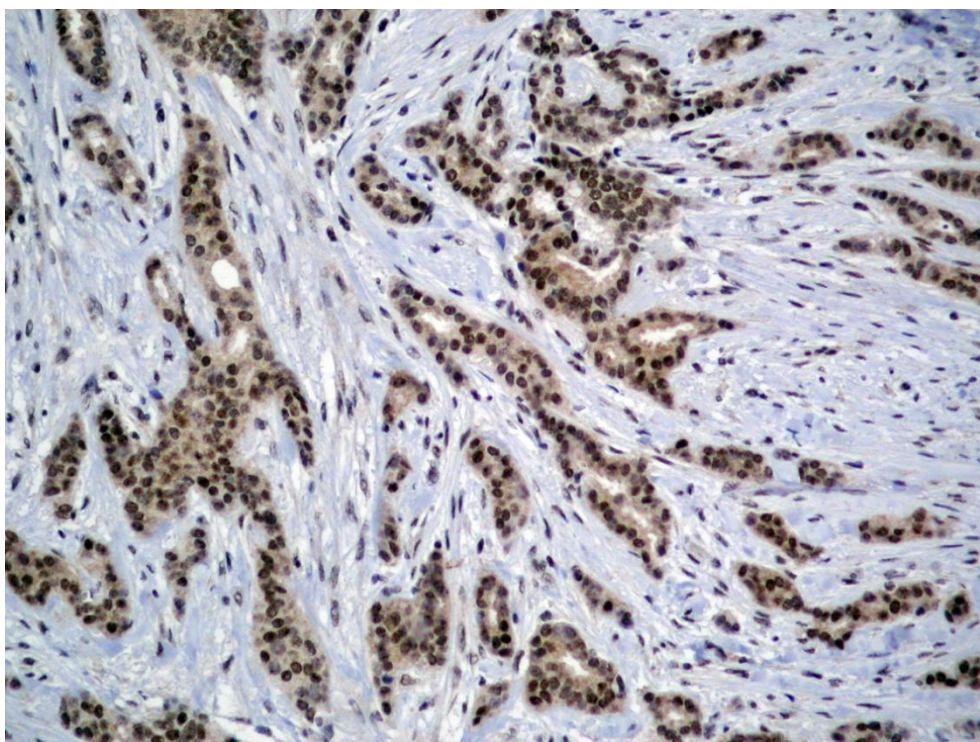
Slika 56. Kontrolna skupina, 3405/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



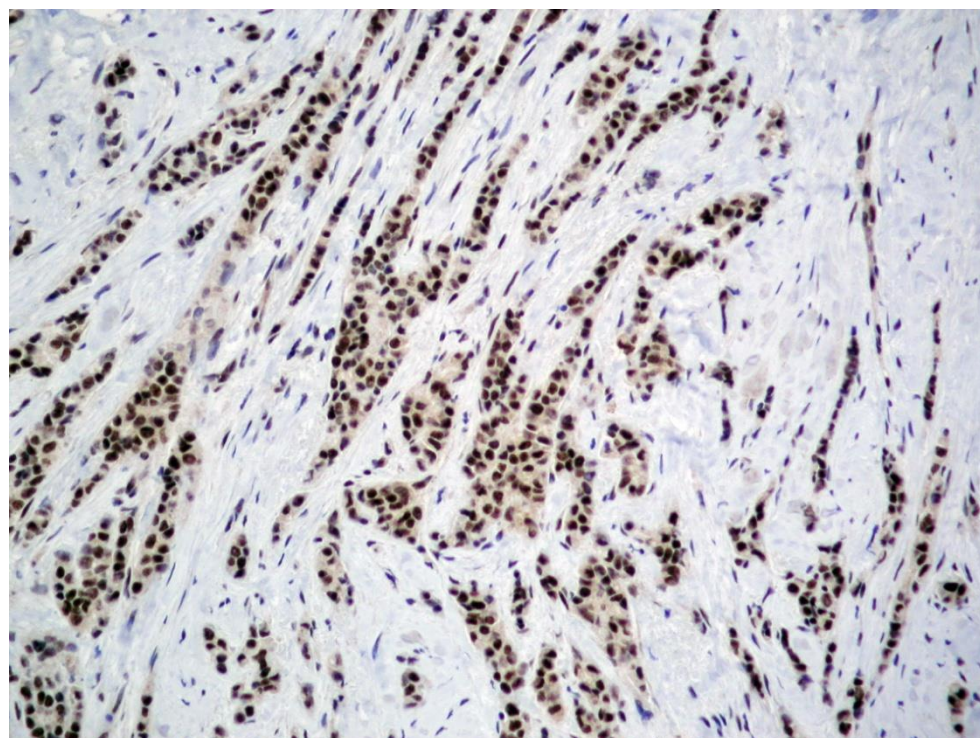
Slika 57. Kontrolna skupina, 3578/2010, ERβ, 200×.



Slika 58. Kontrolna skupina, 3973/2010, ERβ, 200×.



Slika 59. Kontrolna skupina, 3992/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .



Slika 60. Kontrolna skupina, 4036/2010, ER $\beta$ , 200 $\times$ .