

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milica D. Nedeljković

**MOLEKULARNO PROFILISANJE I  
KARAKTERIZACIJA TROSTRUKO NEGATIVNIH I  
HORMONSKI ZAVISNIH TUMORA DOJKE**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milica D. Nedeljković

**MOLECULAR PROFILING AND  
CHARACTERISATION OF TRIPLE NEGATIVE  
AND HORMONE DEPENDENT BREAST  
TUMORS**

doctoral dissertation

Belgrade, 2018

## **Mentori**

dr Nikola Tanić, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Gordana Konjević, naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije – u penziji od 3.12.2017.

## **Članovi komisije**

dr Nasta Tanić, viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Bogradu

dr Goran Brajušković, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## **Zahvalnica**

*Ova doktorska disertacija realizovana je u Laboratoriji za imunologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije i u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Identifikacija molekularnih markera za predikciju progresije tumora, odgovora na terapiju i ishoda bolesti“ (III41031) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Pre svega se zahvaljujem dr Nikoli Taniću, mom mentoru, na sveobuhvatnoj pomoći, stručnim i prijateljskim savetima, idejama i podršci koju mi je pružio u svim fazama izrade ove doktorske disertacije, kao i mentoru dr Gordani Konjević, na stručnoj pomoći, znanju i vremenu koje je podelila sa mnom tokom izrade teze. Posebno se zahvaljujem dr Nasti Tanić na divnoj saradnji, optimizmu i vrednim savetima kako prilikom mog laboratorijskog rada, tako i tokom pisanja disertacije. Za pomoć oko imunohistohemijske analize uzoraka, zahvaljujem se dr sci med. Zorki Miliovanović, Mirjani Prvanović i svim njihovim saradnicima.*

*Zahvaljujem se i kolegama iz Laboratorije za imunologiju, dr Katarini Mirjačić i dr Ani Vuletić na saradnji koju smo imali svih ovih godina kao i dr Tanji Dramićanin i svim kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku na pomoći prilikom mog eksperimentalnog rada.*

*Posebno se zahvaljujem kolegama dr Ani Damjanović, dr Mariji Đorđić Crnogorac, dr Ivani Matić, dr Nini Petrović, dr Ani Krivokući i Nađi Grozdanić Stanisavljević na druženju, idejama i podršci tokom svih ovih godina.*

*Od srca se zahvaljujem roditeljima koji su mi omogućili da se školujem, da se razvijam i pružili mi neizmernu ljubav i razumevanje. Zahvaljujem se bratu, njegovoj supruzi i njihovim klincima, na podršci, neiscrpoj energiji i entuzijazmu. Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj porodici.*

## ***Molekularno profilisanje i karakterizacija trostruko negativnih i hormonski zavisnih tumora dojke***

### ***Sažetak***

Karcinom dojke je i klinički i genetički heterogeno oboljenje sa varijabilnim odgovorom na terapiju. Estrogenski – ER, progesteronski – PR i receptor za humani epidermalni factor rasta 2 – HER2, najbitniji su biološki markeri na osnovu čije ekspresije se karcinomi dojke dele na: trostruko negativne (TNBC) koji ih ne ekspimiraju i na hormonski zavisne (ER+) tumore koji ekspimiraju ER, a pokazuju varijabilnu ekspresiju PR i HER2. Ovi markeri ključni su i za izbor terapije. TNBC i ER+ karcinomi dojke se razlikuju po svom kliničkom ponašanju, karakteristikama i agresivnosti. TNBC je daleko agresivniji. Navedene razlike posledica su genetičkih lezija čije bi tumačenje moglo da doprinese razvoju novih strategija u terapiji ovih tumora. U vezi sa tim, osnovni cilj ove studije bio je utvrđivanje amplifikacionog obrasca odabrane grupe onkogeno, *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1*, u oba tipa karcinoma dojke kao i povezivanje njihovog amplifikacionog statusa sa kliničkim tokom i ishodom bolesti.

Rezistencija na sistemsku terapiju je osnovni problem u tretmanu oba tipa karcinoma dojke. Ovaj problem posebno je izražen kod obolelih od TNBC koji se zbog odsustva ekspresije ER, PR i HER2, tretiraju isključivo citostaticima na koje vrlo često razvijaju rezistenciju. Zato je jedan od osnovnih ciljeva ove studije bio i identifikacija bioloških mehanizama koji leže u osnovi rezistencije na hemioterapiju, odnosno ispitivanje ekspresionog profila BCRP i MRP1 membranskih transportera i njihove povezanosti sa tokom i ishodom bolesti.

Amplifikacioni status analiziranih onkogeno ispitan je RT-qPCR metodom, a ekspresioni profil membranskih transportera imunohistochemijskom analizom – IHC.

Uporednom analizom amplifikacionog profila četiri onkogeno u dva tipa karcinoma dojke, utvrđeno je da se drugačije ponašanje, karakteristike i agresivnost TNBC tumora mogu pripisati značajno češćoj amplifikaciji *c-MYC*

onkogeni u ovoj grupi tumora. Utvrđeno je, takođe, da bi amplifikacioni profil *c-MYC* onkogeni mogao biti dobar prognostički marker i dobar parameter za odabir terapije obolelih od TNBC, jer je kod ove grupe bio u asocijaciji sa najvišim histološkim gradusom i stadijumom bolesti. Suprotno tome, u grupi ER+ tumora detektovana je značajno češća amplifikacija drugog, *CCND1* onkogeni. Iz ko-alteracione analize odabranih onkogeni u dve grupe karcinoma dojke, utvrđeno je da su ko-amplifikacije *c-MYC/FGFR1* i *FGFR1/EGFR* onkogeni značajno češće kod TNBC, a ko-amplifikacije onkogeni *FGFR1/CCND1* i *EGFR/CCND1* kod ER+ tumora.

Iz uporedne ekspresione analize membranskih transportera u obe grupe karcinoma dojke, utvrđeno je da bi BCRP i MRP1 mogli biti odgovorni za sticanje rezistencije na hemioterapiju u TNBC populaciji, jer su značajno češće i sa višim skorom eksprimirani kod obolelih iz ove grupe. Utvrđeno je da BCRP povećava rezistenciju i istovremeno smanjuje agresivnost tumora čime doprinosi boljem preživljavanju obolelih od TNBC-a. Drugim rečima, u ovoj studiji se po prvi put, ukazuje na dvostruku ulogu BCRP proteina kod obolelih od TNBC-a. Inhibicija MRP1, ali ne i BCRP, uz istovremenu primenu hemioterapije, mogla bi biti logična strategija u tretmanu obolelih od TNBC.

**Ključne reči:** *CCND1*; *c-MYC*; *FGFR1*; *EGFR*; povećanje broja kopija gena; trostruko negativan karcinom dojke; hormonski zavistan karcinom dojke; BCRP; MRP1; rezistencija na terapiju

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna biologija tumora

**UDK broj:** [616-036:[575.113+[576.41+577.112.86]]]:618.19-006(043.3)

## ***Molecular profiling and characterisation of triple negative and hormone dependent breast tumors***

### ***Abstract***

Breast cancer is both clinically and genetically a heterogeneous disease with variable response to therapy. Based on the expression of three most important biological markers, estrogen receptor – ER, progesterone receptor – PR and human epidermal growth factor receptor 2 – HER2, breast cancer can be divided into: triple negative (TNBC) that do not express these receptors and hormone dependent (ER+) tumors that express ER and have a variable expression of PR and HER2. These markers are key for determining therapy. TNBC and ER+ breast cancers differ in their clinical behavior, characteristics and aggressiveness. TNBC is by far more aggressive type. Clarification of genetic lesions that induce the mentioned differences could contribute to the development of new therapeutic strategies for these tumors. Therefore, the main aim of this study was to determine the amplification pattern of the selected oncogene group, *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* and *CCND1*, in both types of breast cancer, as well as to investigate a possible connection of amplification status of these oncogenes with the clinical course and outcome of the disease.

Resistance to systemic therapy is a primary problem in treatment of both types of breast cancer. This problem is especially pronounced in patients with TNBC that, due to the absence of ER, PR and HER2 expression, are only treated with cytostatics to which they frequently develop resistance. For this reason, one of the main aims of this study was to identify biological mechanism that are the basis of chemoresistance, namely, to investigate the expression profiles of BCRP and MRP1 membrane transporters and their connections with the clinical course and outcome of the disease.

The amplification profile of the analyzed oncogenes was investigated using RT-qPCR, while the expression profile of the membrane transporters was analysed by immunocytochemistry – IHC.

Comparative analysis of the amplification status of the four oncogenes in both types of breast cancer, revealed that the different behavior, characteristics and aggressiveness of TNBC could be contributed to significantly more frequent amplification of *c-MYC* oncogene in these tumors. The amplification profile of *c-MYC* could, potentially, be a good prognostic marker and a good parameter for choosing optimal therapy for TNBC patients since it was associated with the highest histological grade and stage of this disease. On the contrary, a significantly more frequent amplification of *CCND1* oncogene was detected in ER+ tumors. From co-alteration analysis of the selected oncogenes in both types of breast cancer, it was determined that co-amplifications of *c-MYC/FGFR1* and *FGFR1/EGFR* oncogenes were significantly more frequent in TNBC, while co-amplifications of *FGFR1/CCND1* and *EGFR/CCND1* were predominantly present in ER+ tumors.

Comparative, expression analysis of membrane transporters in both types of breast cancer revealed that BCRP and MRP1 were significantly more frequently and with a higher score, expressed in TNBC, and could, therefore, be responsible for the development of chemoresistance in TNBC population. It was determined that BCRP increases chemoresistance, while, at the same time, reduces tumor aggressiveness contributing to the better overall survival of TNBC patients. In other words, this study is the first to indicate a possible double role of BCRP protein in TNBC. The inhibition of MRP1, but not BCRP, together with chemotherapy, could be a logical strategy in treatment of TNBC patients.

**Key words:** CCND1; c-MYC; FGFR1; EGFR; copy number gain; triple negative breast cancer; hormone dependant breast cancer; BCRP; MRP1; chemotherapy resistance

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Tumor molecular biology

**UDK number:** [616-036:[575.113+[576.41+577.112.86]]]:618.19-006(043.3)



# Skraćenice

**ABC transporteri**, ATP vezujuća kasetna transporteri (eng. *ATP-binding cassette*)

**ABCB1**, gen koji kodira MDR1 protein

**ABCC1**, gen koji kodira MRP1 protein

**ABCG2**, gen koji kodira BCRP protein

**Akt (PKB)**, protein kinaza B (eng. *protein kinase B*, Akt (PKB))

**Bcl-2** – član proteinske familije regulatora apoptoze (engl. *B cell lymphoma-2*, Bcl-2)

**Bcr-Abl**, fuzioni protein karakterističan za određene tipove leukemije

**BCRP**, protein rezistencije karcinoma dojke (eng. *breast cancer resistance protein*, BCRP)

**BL**, tip karcinoma dojke po ekspresiji gena sličan bazalnim epitelijalnim ćelijama (eng. *Basal like*, BL)

**BRCA1**, tumor supresor gen od začaja u karcinomu dojke (eng. *breast cancer 1*, BRCA1)

**CDK**, ciklin zavisne kinazame (eng. *cyclin-dependent kinase*, CDK)

**CCND1**, gen koji kodira protein Ciklin D1

**c-MYC**, protoonkogen (kodira transkripcione faktore, koji regulišu ekspresiju velikog broja gena)

**DEPC**, dietilpirokarbonat (eng. *diethylpyrocarbonate*, DEPC)

**DFS**, preživljavanje bez progresije bolesti (eng. *disease free survival*, DFS)

**DNK**, dezoksiribonukleinska kiselina

**E2F**, familija transkripcionih faktora ključnih u kontroli ćelijskog ciklusa (eng. *E2 factors*, E2F)

**E-BOX**, kratka regulatorna sekvenca DNK (eng. *enhancer box*, E-BOX)

**EDTA**, eilendiaminotetraacetat (eng. *Ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA)

**EGFR**, receptor epidermalnog faktora rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*, EGFR)

**EMT**, epitelijalno-mezenhimalna tranzicija (eng. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT)

**ER**, estrogenski receptor

**EtBr**, etidijum bromid (eng. *ethidium bromide*, EtBr)

**EtOH**, etanol (eng. *ethyl alcohol*, EtOH)

**FAM**, fluorescentna reporter boja (eng. *6-carboxyfluorescein*, FAM)

**FGFR1**, receptor jedan fibroblasnog faktora rasta (eng. *fibroblast growth factor receptor 1*, FGFR1)

**Fos**, proto-onkogen, subjedinicna AP-1 transkripcionog faktora

**HER2**, receptor za humani epidermalni factor rasta 2 (eng. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2)

**HLH**, heliks-petlja-heliks domen (eng. *helix-loop-helix*, HLH)

**IDC**, invazivni duktalni karcinomi (eng. *invasive ductal carcinoma*, IDC)

**ILC**, invazivni lobularni karcinom (eng. *invasive lobular carcinoma*, ILC)

**IHC**, imunohistohemisjko bojenje (eng. *Immunohistochemistry*, IHC)

**INK4b/p15**, inhibitor b ciklin zavisne kinase 4 (eng. *cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B*, INK4b/p15)

**Jun**, proto-onkogen, subjedinicna AP-1 transkripcionog faktora

**MAD**, MAX dimerizacioni protein 1 (eng. *MAX dimerization protein 1*, MXD1/MAD)

**MAPK**, mitogenom aktivirane proteinske kinase

**MAX**, MYC asocirani faktor X (eng. *myc-associated factor X*, MAX)

**MDR**, otpornost na višestruke lekove (eng. *multiple drug resistance*, MDR)

**MDR1**, protein rezistencije na višestruke lekove tip 1 (eng. *multidrug resistance protein 1*, MDR1)

**MRP1**, protein asociran sa rezistencijom na višestruke lekove tip 1 (eng. *multidrug resistance-associated protein 1*, MRP1)

**NBD**, nukleotid vezujući domen (eng. *nucleotide-binding domain*, NBD)

**P27**, ciklin zavisnih kinaza inhibitor 1B (eng. cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, p27)

**PCR**, lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR)

**PI3K**, fosfatidilinozitol-4, 5-bisfosfat 3-kinaza (eng. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*, PIK)

**PKC**, proteinaza C

**PR**, progesteronski receptor

**PTEN**, fosfataza i tenzin homolog (eng. *phosphatase and tensin homolog*, PTEN)

**RAS**, citoplazmatski signalni protein, prvi put otkriven kod pacova (eng. *rat sarcoma*, RAS)

**Rb**, retinoblastoma protein

**RNase**, ribonukleaza

**RT-qPCR**, kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*, RT-qPCR)

**SDS**, natrijum dodecil sulfat (eng. *Sodium dodecyl sulfate*, SDS)

**STAT**, prenosioac signala i activator transkripcije (eng. *signal transducer and activator of transcription*, STAT)

**SZO**, Svetska zdravstvena organizacija

**TAD**, transaktivacioni domen (eng. *transactivation domain*, TAD)

**TAMRA**, 3' prigušivač fluorescentnih reporter boja (eng. *carboxy-tetramethyl-rhodamine*)

**TDLU**, terminalna duktalno-lobularna jedinica (eng. *terminal ductal lobular units*, TDLU)

**TE**, pufer koji se rutinski koristi za čuvanje DNK, sadrži Tris i EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA)

**TGF- $\alpha$** , transformišući faktor rasta-alfa (eng. *transforming growth factor-alpha*, TGF- $\alpha$ )

**TIMP3**, matriks metaloproteinazni inhibitor 3 (eng. *matrix metalloproteinase inhibitor 3*, TIMP3)

**TMD**, transmembranski domen (eng. *transmembrane domain*, TMD)

**TNBC**, trostruko negativni karcinom dojke (eng. *triple negative breast cancer*, TNBC)

**TRIS**, tris hidroksimetil aminometan (eng. *tris hydroxymethyl aminomethane*, TRIS)

**WAF1/p21**, inhibitor ciklin zavisnih kinaza 1 (eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*, WAF1/p21)

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1 Građa i funkcija dojke .....	2
1.2 Klasifikacija karcinoma dojke .....	4
1.3 Etiologija i karakteristike hormonski zavisnih i trostruko negativnih karcinoma dojke.....	7
1.4 Genetičke osnove karcinoma dojke.....	10
1.4.1 FGFR1 .....	13
1.4.2 EGFR .....	15
1.4.3 c-MYC .....	17
1.4.4 CCND1.....	19
1.5 Terapija karcinoma dojke.....	21
1.6 ABC transporteri i rezistencija na terapiju .....	22
1.6.1 MRP1 .....	26
1.6.2 BCRP .....	27
<b>2. Ciljevi</b> .....	29
<b>3. Materijali i metode</b> .....	31
3.1 Materijal.....	31
3.1.1 Kliničke i histopatološke karakteristike trostruko negativnih i hormonski zavisnih karcinoma dojke .....	32
3.2 Metode.....	35
3.2.1 Izolacija genomske DNK iz parafinskih preseka tkiva dojke.....	35
3.2.2 Određivanje koncentracije i provera kvaliteta izolovane DNK .....	37
3.2.3 Analiza amplifikacionog statusa gena kvantitativnim PCR-om u realnom vremenu .....	37
3.2.4 Određivanje broja kopija gena diferencijalnim PCR-om.....	39
3.2.5 Imunohistohemijsko određivanje ekspresije proteina .....	42
3.2.6 Statistička analiza .....	45
<b>4. Rezultati</b> .....	46
4.1 Imunohistohemijska detekcija ekspresije proteina ER, PR i HER2 .....	46

4.2. Usporedna analiza kliničkih i histopatoloških parametara kod trostruko negativnih i hormonski zavisnih karcinoma dojke .....	48
4.3 Usporedna analiza amplifikacionog statusa <i>FGFR1</i> , <i>c-MYC</i> , <i>EGFR</i> i <i>CCND1</i> onkogeno u TNBC i ER+ karcinomima dojke .....	51
4.3.1 Povezanost amplifikacionog statusa <i>FGFR1</i> , <i>c-MYC</i> , <i>EGFR</i> i <i>CCND1</i> gena sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC tumora .....	53
4.3.2 Povezanost amplifikacionog statusa <i>FGFR1</i> , <i>c-MYC</i> , <i>EGFR</i> i <i>CCND1</i> gena sa kliničkim i histopatološkim parametrima ER+ tumora .....	62
4.3.3 Uticaj amplifikacionog statusa <i>FGFR1</i> , <i>c-MYC</i> , <i>EGFR</i> i <i>CCND1</i> gena na ukupno preživljavanje obolelih od karcinoma dojke .....	69
4.4 Analiza ekspresije BCRP i MRP1 proteina u karcinomima dojke i zdravom tkivu dojke .....	73
4.4.1 Povezanost ekspresije BCRP i MRP1 proteina sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC i ER+ karcinoma dojke .....	78
4.4.2 Uticaj ekspresije BCRP i MRP1 proteina na ukupno preživljavanje obolelih od karcinoma dojke .....	85
<b>5. Diskusija .....</b>	<b>89</b>
5.1 Analiza amplifikacionog statusa <i>FGFR1</i> , <i>c-MYC</i> , <i>EGFR</i> i <i>CCND1</i> gena u TNBC i ER+ karcinomima dojke .....	91
5.2 Analiza ekspresije BCRP i MRP1 proteina u TNBC i ER+ karcinomima dojke .....	100
<b>6. Zaključci .....</b>	<b>106</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>109</b>

# 1. Uvod

---

Maligni tumori dojke spadaju u najčešće tipove maligniteta i vodeći su uzrok smrti od malignih bolesti u populaciji žena širom sveta (Jemal i sar., 1999; Parkin, 2004). Prema epidemiološkim podacima u svetu i dalje, uprkos multidisciplinarnom pristupu u rešavanju ovog problema, od karcinoma dojke umire 500 000 žena godišnje (Fitzmaurice i sar., 2015). Učestalost oboljevanja od ovog tipa maligniteta u visoko razvijenim zemljama se povećava (podaci svetske zdravstvene organizacije), dok stopa smrtnosti, zbog rane detekcije i sve efikasnije terapije, iz godine u godinu opada (Berry i sar., 2005). Nasuprot tome, u zemljama u razvoju, stopa smrtnosti kod žena obolelih od karcinoma dojke i dalje raste. Po broju novodijagnostifikovanih slučajeva, Srbija ne zaostaje za razvijenim a po stopi smrtnosti za zemljama u razvoju, što ovaj region sveta stavlja u izrazito loš položaj (<http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/Zakoni/Strategije/Nacionalni%20PrograP%20Za%20Prevenciju%20Raka%20Dojke.pdf>). Razumevanje fenomena koji čine osnovu maligne alteracije tkiva dojke, uslov je za svako ozbiljno unapređivanje terapijskih protokola i glavni razlog što se ova problematika već decenijama nalazi u žiži interesovanja molekularne onkogenetike.

Nastanak karcinoma dojke je višestepeni proces koji uključuje postepenu progresiju od benignih proliferativnih lezija do visoko invazivnih, metastatskih tumora. Neoplastična transformacija ćelija u tkivu dojke rezultat je poremećaja u kontroli i transdukciji mitogenih signala, odnosno strukturnih i/ili funkcionalnih promena u genima koji ih kontrolišu. Humani genom sadrži najmanje dve klase ovakvih "kancer" gena – onkogene i tumor supresorske gene.

Tumori dojke su ekstremno heterogena grupa humanih maligniteta o čijoj se etiologiji i dalje intenzivno polemiše. Prema podacima iz literature u faktore rizika za nastanak ovog oboljenja ubrajamo: pozitivnu porodičnu istoriju, životnu dob, ranu menarhu, kasnu menopauzu, dugotrajne hormonske terapije, način ishrane, izloženost različitim genotoksičnim i negenotoksičnim agensima itd

(Gross, 2000). Na osnovu dosadašnjih saznanja, jasan je značaj kako genetičkih odnosno endogenih, tako i sredinskih odnosno egzogenih faktora.

U etiologiji tumora dojke, naročito grupe hormon zavisnih, ključnu ulogu imaju estrogen i njegovi receptori. Oni su istovremeno i važni prediktivni faktori na osnovu kojih se vrši izbor odgovarajuće terapije. Hormonski zavisne karcinome dojke odlikuje ekspresija receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR), dok, sa druge strane, tumori dojke koji ne ekspimiraju pomenute receptore, ne zavise od stimulativnog dejstva steroidnih hormona. Ovi tumori se po mnogim svojim osobinama razlikuju od hormonski zavisnih karcinoma dojke, ali i dalje nisu razjašnjene specifične genetičke karakteristike odgovorne za opažene razlike između ova dva tipa tumora dojke.

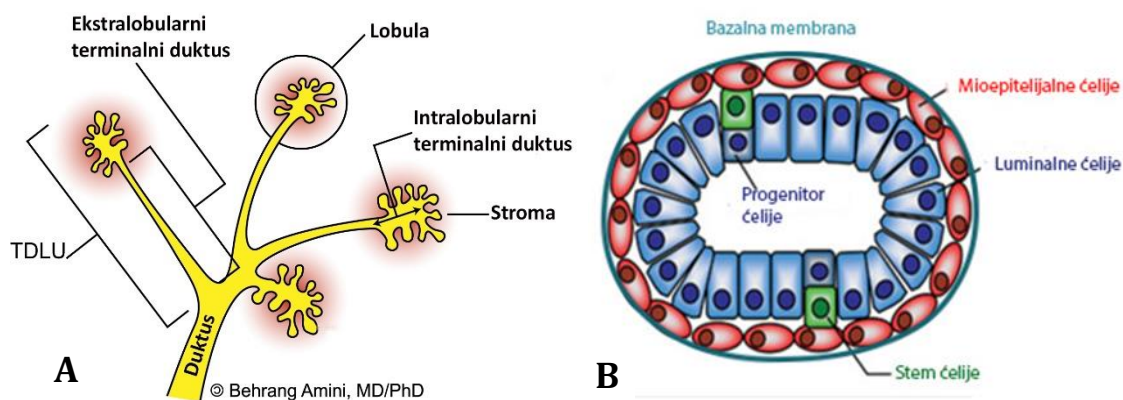
## 1.1 Građa i funkcija dojke

Dojka ili mlečna žlezda (lat. *mamma*) predstavlja simetrični parni organ koji se kod žena, tokom puberteta razvija u funkcionalnu mlečnu žlezdu, a kod muškaraca ostaje rudimentiran. Dojka je najveća kožna, apokrina žlezda svojstvena sisarima. Sastavljena je od strome koju čine vezivno i adipozno tkivo i parenhima odnosno žlezdang tkiva. Žlezdano tkivo dojke ili tkivo dojke u užem smislu, gradi 12 -20 režnjeva (lobusa) koji su okruženi masnim i vezivnim tkivom. Lobusi su izgrađeni od lobula - grupe alveola u kojima se luči mleko tokom laktacije. Od svake lobule polaze izvodni kanali (*duktusi*) koji se spajaju u veće duktuse (*ductus lactiferi*). Lobula i njen izvodni kanal, duktus, grade tzv. terminalnu duktalno-lobularnu jedinicu (eng. *terminal duct lobular unit*, TDLU) **(Slika 1.1)**. TDLU je osnovna funkcionalna i histopatološka jedinica mlečnih žlezda i istovremeno anatomski region u kome se razvija većina karcinoma dojke (Rosebrock i sar., 2013).

Duktusi i lobusi sastoje se od dva sloja epitelijalnih ćelija: luminalnih koje su orjentisane ka lumenu duktusa i mioepitelijalnih ćelija koje se nalaze između luminalnih i bazalne membrane. Bazalna membrana predstavlja fizički granicu



između žlezdanog tkiva i strome dojke (Gudjonsson i sar., 2002) **(Slika 1.1)**. Većina karcinoma dojke nastaje neoplastičnom tranformacijom luminalnih ćelija, mada se kao mesto maligne alteracije sve češće navode i adultene stem ćelije locirane između sloja luminalnih i mioepitelijalnih ćelija, a čija je uloga produkcija progenitora koji se diferenciraju u luminalne i/ili mioepitelijalne ćelije (Tiede i Kang, 2011) **(Slika 1.1)**. Uloga adultnih stem ćelija u nastanku karcinoma dojke je još uvek predmet diskusije (Polyak, 2007; Tiede i Kang, 2011).



**Slika 1.1.** A. Struktura terminalne duktalno-lobularne jedinice – TDLU, B. Građa duktusa. Modifikovano iz <http://roentgenrayreader.blogspot.com/2010/08/terminal-ductal-lobular-unit.html> i (Tiede i Kang, 2011).

## 1.2 Klasifikacija karcinoma dojke

Karcinomi dojke su i klinički i genetički izuzetno heterogena grupa maligniteta koji se u zavisnosti od toga koji kriterijum uzmemo kao polaznu osnovu mogu klasifikovati na više načina. Imajući u vidu ogromnu varijabilnost karcinoma dojke i u odgovoru na terapiju, precizna klasifikacija ovih tumora je od presudnog značaja za izbor adekvatnog pristupa lečenju.

Ako kao kriterijum za klasifikaciju uzmemo invazivnost, onda ih možemo podeliti na **neinvazivne** (*in situ*) - karcinome čije ćelije nisu probile bazalnu membranu niti su se infiltrirale u okolno tkivo i **invazivne** – karcinome čije ćelije penetriraju u okolna tkiva, regionalne limfne čvorove ili stiču sposobnost da nasele udaljena tkiva i organe (metastaze).

Ako je kriterijum za klasifikaciju histološki tip ćelije u kojoj se dogodila alteracija, tumori dojke dele se na duktalne, lobularne, mešovite (one koji sadrže obe komponente) i retke histološke tipove u koje spadaju medularni, tubularni, mucinozni i drugi tipovi.

Shodno gore navedenim kriterijumima, stepenu invazivnosti i histološkom tipu, razlikujemo: invazivne duktalne karcinome dojke (eng. *invasive ductal carcinoma*, IDC), invazivne lobularne karcinome dojke (eng. *invasive lobular carcinoma*, ILC), retke invazivne karcinome dojke, neinvazivne lobularne i neinvazivne duktalne karcinome dojke (Malhotra i sar., 2014) **(Slika 1.2)**.



**Slika 1.2.** Klasifikacija karcinoma dojke na osnovu invazivnosti i histoloških karakteristika. Modifikovano iz (Malhotra i sar., 2014).

Karcinomi dojke se u kliničkoj praksi dele i na osnovu histološkog gradusa i TNM stadijuma - važnih klasičnih parametara u prognozi i definisanju terapije karcinoma dojke (Inwald i sar., 2013). **Histološki gradus** ili stupanj diferenciranosti tumora pokazuje koliko tumorske ćelije nalikuju ćelijama zdravog tkiva iz kog su nastale. Po histološkom gradusu maligne tumore dojke delimo na: dobro diferencirane - G1, umereno diferencirane - G2 ili slabo diferencirane - G3. Što je histološki gradus viši to je tumor agresivniji i ima lošiju prognozu. **TNM sistem** definiše tačan stadijum karcinoma dojke a bazira se na tri parametra: veličini tumora (T), stepenu zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova (N) i prisustvu udaljenih metastaza (M). Na osnovu TNM klasifikacije razlikujemo pet TNM stadijuma karcinoma dojke: stadijum 0 - neinvazivni tumori, stadijumi I, II i III - veći karcinomi koji su se proširili na regionalna tkiva i stadijum IV - karcinomi koji su se proširili na udaljena tkiva i organe (Singletary i sar., 2002).

Neobično visoka heterogenost karcinoma dojke i potreba za što preciznijim definisanjem tipa/podtipa tumora, glavni su razlog uvođenja dodatnih, molekularnih kriterijuma u njihovu klasifikaciju. Dakle, ako je obrazac ekspresije gena osnova za klasifikaciju, onda tumore dojke delimo na (Sorlie i sar., 2001):

- **Luminalne A i B**, tumore čiji ekspresioni profil podseća na ekspresioni profil normalnih ćelija luminalnog epitelijuma. Karakteriše ih visoka ekspresija ER, PR i varijabilna ekspresija receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (eng. *human epidermal growth factor receptor 2, HER2*).
- **HER2 pozitivne**, tumori koje karakteriše visoka ekspresija HER2 ali istovremeno i niska ekspresija gena luminalnog epitelijuma. Drugim rečima, ovi karcinomi su najčešće istovremeno HER2+, ER- i PR-.
- **Sličane normalnom tkivu**, tumori koje odlikuje profil ekspresije gena nalik zdravom tkivu dojke (Bernard i sar., 2009).
- **Basal Like (BL)**, tumori čiji ekspresioni profil podseća na ekspresioni profil zdravih ćelija bazalnog sloja epitela. Oni su najčešće istovremeno, ER-, PR-, HER2-, imaju visok gradus, visok mitotski indeks i po pravilu, lošu prognozu (Livasy i sar., 2006; Nielsen i sar., 2004).
- **Klaudin niski**, tumori koji ne eksprimiraju ili jako slabo eksprimiraju atvezivne proteine i tipične površinske markere diferenciranih luminalnih ćelija, a istovremeno imaju visoku ekspresiju markera epitelijalno-mezenhimalne tranzicije (eng. *epithelial-mesenchymal transition, EMT*). (Prat i sar., 2010).

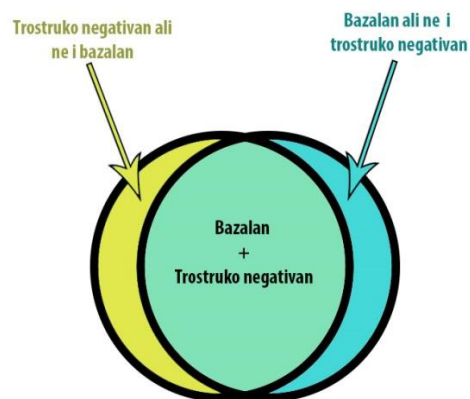
Međutim, u kliničkoj praksi poseban značaj ima podela tumora dojke koja se bazira na ekspresiji tri proteinska receptora: ER, PR i HER2. Ovi receptori su najvažniji biološki markeri za procenu prognoze karcinoma dojke i utvrđivanje optimalne terapije (Harris i sar., 2007).

Na osnovu ekspresije steroidnih (ER i PR) i HER2 receptora, tumore dojke delimo u dve velike grupe:

- **hormonski zavisne** – tumore sa obaveznom ekspresijom steroidnih i varijabilnom ekspresijom HER2 receptora i
- **trostruko negativne** (eng. *triple negative breast cancer, TNBC*) – tumore koji nikad ne eksprimiraju ni jedan od pomenutih receptora (ER-, PR-, HER2-), po čemu su i dobili ime.

Ova dva tipa karcinoma dojke razlikuju se i po svojim osobinama i po kliničkom ponašanju i po prognozi. Od svih dijagnostifikovanih, čak dve trećine karcinoma dojke spada u hormonski zavisne, odnosno pozitivno je na bar jedan od steroidnih receptora dok je u populaciji obolelih, TNBC tip daleko ređi. Suštinski, ova klasifikacija je najbliža tzv. molekularnoj klasifikaciji baziranoj na ekspresiji većeg broja gena jer prati ekspresiju tri, za ponašanje i terapiju

ključna gena. Zato se ekspresija ER, PR i HER2 u internacionalnoj kliničkoj praksi koristi i kao surogat za molekularnu klasifikaciju. Uzimajući u obzir pomenute podele, ne čudi što se u literaturi često BL tip poistovećuje sa TNBC-om. Ipak, iako je većina trostruko negativnih tumora u isto vreme BL i obrnuto, ovi termini se ne mogu potpuno izjednačiti (**Slika 1.3**). Istovremeno, treba naglasiti da i velika većina tumora iz kategorije kladin niskih pripada trostruko negativnim tumorima dojke (Prat i sar., 2010).



**Slika 1.3.** Trostruko negativni karcinom dojke, odnos između kliničkog fenotipa i molekularnog BL podtipa.

### 1.3 Etiologija i karakteristike hormonski zavisnih i trostruko negativnih karcinoma dojke

Karcinom dojke ima komplikovanu i ne sasvim poznatu etiologiju koja uključuje genetičke i opšte biološke, sredinske, socijalne i faktore ponašanja. U faktore rizika za nastanak karcinoma dojke tako spadaju nasledna genetička predispozicija i porodična istorija (Carroll i sar., 2008), benigne proliferativne promene na dojci (Degnim i sar., 2007), kasna menopauza i njen tip (Colditz i Rosner, 2000), izlaganje grudnog koša jonizujućem zračenju (Einstein i sar., 2007), povećana gustina žlezdanog tkiva (NF i sar., 2007), ponašanje uključujući ishranu i

naročito konzumaciju alkohola (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002).

Jedan od najvažnijih faktora u genezi hormonski zavisnih (ER+) karcinoma dojke je izloženost uticaju estrogena. Steroidni hormoni, a posebno estrogen, su snažni promoteri ćelijske proliferacije, a time i značajni faktori rizika. Nivo cirkulišućeg estrogena u organizmu zdrave žene varira u zavisnosti od ciklusa, životne dobi, trudnoće, telesne mase, životnih navika – ishrane, konzumacije alkohola, fizičke aktivnosti, itd. Zato rana menarha, kasna menopauza, nuliparitet i odsustvo dojenja predstavljaju značajne faktore rizika za sve hormonski zavisne tumore, jer produžavaju vreme izlaganja žlezdanog tkiva dojke dejstvu estrogena, odnosno vreme tokom koga ovo tkivo prolazi kroz proliferativne cikluse (Travis i Key, 2003). Suprotno hormonski zavisnim tumorima dojke, za pojavu TNBC-a, upravo visok paritet, ili veći broj trudnoća, predstavlja faktor rizika (Millikan i sar., 2008). Slično tome, gojaznost postmenopauzalnih žena predstavlja faktor rizika za nastanak ER+ karcinoma dojke (Van den Brandt i sar., 2000), dok je gojaznost i kod TNBC-a faktor rizik, ali isključivo za žene u premenopauzi (Millikan i sar., 2008). Dakle, podaci jasno pokazuju da estrogen ima bitnu, ali drugačiju ulogu u nastanku trostruko negativnih tumora dojke. Naime, dokazano je da estrogen stimuliše angiogenezu a time i promociju/progresiju tumora i to nezavisno od interakcije sa estrogenskim receptorom tumorskih ćelija (Gupta i sar., 2007).

Generalno, incidenca karcinoma dojke raste do starosti od 75 godina kada postepeno počinje da opada (Colditz GA, 2000). Ako se uporede trostruko negativni i hormonski zavisni karcinomi dojke, jasno se uočava da se TNBC češće javlja kod žena mlađih od 50 godina (Bauer i sar., 2007). Zbog izrazito brzog i agresivnog rasta kao i zbog daleko učestalije pojave kod žena ispod 50 godina, detekcija TNBC mamografijom je otežana. Drugim rečima, u poređenju sa hormonski zavisnim, trostruko negativni tumori su češći među takozvanim intervalnim karcinomima dojke (Collett i sar., 2005). Intervalnim karcinomima dojke nazivamo sve tumore dojke koji se razvijaju između dva mamografska skrininga.

Od ukupnog broja dijagnostifikovanih karcinoma dojke, 15-20% se klasifikuje u TNBC dok hormonski zavisni obuhvataju oko 60%. Iako histološki heterogen, TNBC najčešće pripada kategoriji invazivnih duktalnih karcinoma visokog gradusa (Aye Thike i sar., 2009), dok većina invazivnih lobularnih pripada hormonski zavisnim – ER+ tumorima dojke (Rakha i sar., 2008).

Trostruko negativne tumore dojke karakteriše značajno viši T stadijum (Boyle, 2012) i ređe prisustvo loko-regionalnih metastaza tj transformisanih ćelija u aksilarnim limfnim čvorovima, u poređenju sa ER+ karcinomima dojke (Cheang i sar., 2008). Ovi podaci u skladu su sa činjenicom da se trostruko negativni i hormonski zavisni karcinomi razlikuju i po obrascu metastatskog širenja. Tako, TNBC odlikuje pojava ranih visceralnih metastaza, naročito na plućima, kao i daleko veća učestalost metastaza na mozgu, dok hormonski zavisni karcinomi dojke češće metastaziraju na kosti (Dent i sar., 2009; Kennecke i sar., 2010). Zajedno, ovi nalazi sugerišu da se TNBC širi prvenstveno, krvotokom dajući visceralne metastaze, a hormon zavisni tumori dojke limfotokom (Foulkes i sar., 2003).

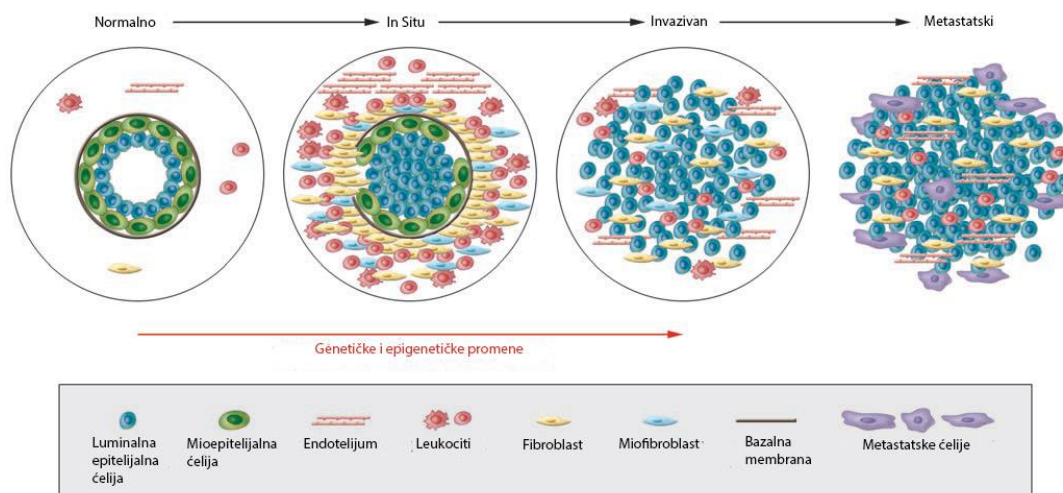
TNBC se razlikuje od hormonski zavisnih karcinoma dojke i po ishodu bolesti kao i po obrascu javljanja relapsa. U slučaju TNBC, do relapsa često dolazi već godinu dana nakon hirurške intervencije te je rizik za ponovno javljanje bolesti najviši tokom prve tri godine od hirurške intervencije, a zatim pada (Dent i sar., 2007). Sa druge strane, kod ER+ tumora stanje je potpuno suprotno jer se više od 50% relapsa dešava između 5 i 10 godina nakon prve hirurške intervencije (Kennecke i sar., 2010). Trogodišnje preživljavanje bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje su značajno lošiji kod bolesnica sa TNBC u poređenju sa osobama koje boluju od drugih tipova karcinoma dojke. Sve do sada navedeno jasno ukazuje na ranu i agresivnu prirodu relapsa kod TNBC te ne čudi da TNBC ima i viši mortalitet u odnosu na ER+ karcinome dojke što je možda posledica i drugačijeg načina metastatskog širenja (Dent i sar., 2009; Liedtke i sar., 2008).

Osnovu svih razlika između pomenutih tipova tumora dojke, sasvim sigurno čine razlike u genetičkom profilu određenih grupa gena čiji su proteinski produkti

odgovorni za elementarne procese u ćeliji. Međutim, odgovor na pitanje koje genetičke promene uzrokuju ovako očigledne razlike u ponašanju i osobinama trostruko negativnih i hormonski zavisnih karcinoma dojke, još uvek nemamo.

## 1.4 Genetičke osnove karcinoma dojke

Genetičke promene imaju ključnu ulogu u neoplastičnoj transformaciji uključujući i transformaciju ćelija tkiva dojke. Kancerogeneza je višefazni proces koji karakteriše progresivna akumulacija genetičkih promena, naročito u signalnim putevima koji kontrolišu proliferaciju i diferencijaciju ćelija (**Slika 1.4**). Danas se smatra da je genomska nestabilnost krucijalan događaj u kancerogenezi koji omogućava dalju akumulaciju mutacija i drugih aberacija (Hanahan i Weinberg, 2011). U najbitnije genetičke promene/lezije odgovorne za malignu alteraciju ćelija spadaju inaktivacije tumor supresorskih gena i aktivacija proto-onkogeni (Vogelstein i Kinzler, 2004).



**Slika 1.4.** Klasičan model progresije karcinoma dojke. Modifikovano iz (Polyak, 2007).

Tumor supresorski geni su inhibitori nekontrolisanog rasta i proliferacije ćelija sa oštećenim genomom čime vrše supresiju neoplastične transformacije. Njihovi proteinski produkti učestvuju u regulaciji i kontroli ćelijskog ciklusa,



programirane ćelijske smrti (apoptoze), kao i u regulaciji popravke grešaka na DNK (Sun i Yang, 2010). Pripadnici ove klase kancer gena kontrolišu i procese angiogeneze i remodeliranja ekstraćelijskog matriksa (Osborne, 2004). Osnovna uloga tumor supresora je zaustavljanje deobe ćelija sa oštećenim naslednim materijalom, čime se specijalizovanim enzimskim sistemima otvara prostor za saniranje nastalih oštećenja. U slučaju nepopravljivih oštećenja genetičkog materijala, tumor supresori će aktivacijom apoptoze, sprečiti propagaciju takve ćelije. Na taj način tumor supresori čuvaju integritet genoma po čemu su i dobili ime (Levitt i Hickson, 2002).

Najčešće izmenjeni tumor supresorski geni u karcinomima dojke su *Tp53* (Nigro i sar., 1989), *PTEN* (eng. *phosphatase and tensin homolog*) (Depowski i sar., 2001), *TIMP3* (eng. *metalloproteinase inhibitor 3*) (Loging i Reisman, 1999), *Rb* (Ertel i sar., 2010), *BRCA-1* i *BRCA-2* (Ford i sar., 1998; Thompson i sar., 1995). *BRCA-1* je tumor supresor koji učestvuje u popravci dvolančanih prekida DNK pa njegova deficijencija dovodi do povećane genomske nestabilnosti. Ovaj tumor supresorski gen često je inaktiviran u TNBC, kako mutacijama tako i epigenetičkim mehanizmima (Foulkes i sar., 2010; Gonzalez-Angulo i sar., 2011; Lakhani i sar., 2005; Meyer i sar., 2012; Zhu i sar., 2015). *BRCA-1* normalno suprimira ekspresiju gena vezanih za BL fenotip (Gorski i sar., 2010) što ukazuje da bi disfunkcije u *BRCA-1* reparacionom sistemu mogla da bude jedan od glavnih pokretača nastanka TNBC.

Proto-onkogeni su geni čiji proteinski produkti primaju, prenose i/ili realizuju mitogeni signal što ih praktično, čini najpotentnijim promoterima ili stimulatorima ćelijskih deoba. Aktivacija proto-onkogeni vodi ćeliju u hiperproliferaciju, a time i neoplastičnu transformaciju. Zato, izmenjene ili mutirane forme proto-onkogeni nazivamo onkogenima. Osim toga, proteinski produkti nekih onkogeni, suprotno antionkogenima, inhibiraju programiranu ćelijsku smrt, apoptozu (npr. *bcl-2* i *bcr-abl*). Dakle, onkogeni uvek stimulišu proliferaciju i preživljavanje ćelija (Osborne, 2004). Prema lokaciji, osobinama i funkciji koju imaju u ćeliji, razlikujemo sledeće tipove proto-onkogeni:

- faktore rasta – signalne proteine koji stimuliraju rast i proliferaciju ćelija,
- receptore za faktore rasta – transmembranske protein kinaze koje nakon vezivanja odgovarajućeg faktora rasta iniciraju transdukciju, odnosno prenos mitogenog signala ka nukleusu. Tipični predstavnici ove grupe su HER2, EGFR i FGFR,
- proteine sa GTP-aznom aktivnošću – proteini koji posreduju u transdukciji mitogenog signala od receptora do citoplazmatskih kinaza ili onkoproteina u nukleusu (npr. HRAS, KRAS, NRAS),
- citoplazmatske serin/treonin kinaze – proteini uključeni u prenos mitogenih signala i regulaciju ćelijskog ciklusa (npr. AKT i MAPK),
- jedarne regulatorne proteine – onkoproteini koji obavljaju funkciju transaktivatora i/ili transrepresora. To su transkripcijski faktori kao što su myc, fos, jun i dr.

Promene u strukturi ili ekspresiji proto-onkogenih preduslov su svake maligne alteracije. U osnovi, postoje četiri mehanizma njihove onkogene aktivacije: tačkaste mutacije, translokacije, inserciona mutagenaza i amplifikacija gena.

Aktivacija proto-onkogenih amplifikacijom podrazumeva povećanje broja kopija gena po ćeliji što uzrokuje pojačanu produkciju proteinskog produkta datog gena. Amplifikacija je najčešći mehanizam aktivacije *c-MYC*, *CCND1*, *CCNE*, *MYB*, *MDM2*, *HER2* i drugih onkogenih (Kufe i sar., 2003).

Generalno, različiti mehanizmi aktivacije specifičnosti su različitih familija proto-onkogenih. Tako se na primer, geni familije *ras* uglavnom aktiviraju tačkastim mutacijama mada su sporadično zabeležene i aktivacije insercionom mutagenozom i amplifikacijom (Fernández-Medarde i Santos, 2011). Slično tome, osnovni mehanizam aktivacije *c-MYC* gena je amplifikacija (Kalkat i sar., 2017), iako se u nekim, posebnim slučajevima ovaj onkogen može aktivirati i translokacijama – npr. translokacija 8/14 kod Burkittovog limfoma (Boxer i Dang, 2001). Amplifikacija je veoma čest mehanizam aktivacije i *EGFR*, *FGFR1* i *CCND1* onkogenih i to posebno u tumorima dojke.

Analize onkogenog statusa pokazuju da u karcinomu dojke mogu biti aktivirani brojni onkogeni. Tako, u najčešće mutirane spadaju *PI3K* i njegov nizvodni efektor *mTOR* (Hare i Harvey, 2017; Mukohara, 2015), dok u najčešće amplifikovane spadaju *c-MYC* (Deming i sar., 2000), *HER2* (Ellis i sar., 2005), *CCND1* (Arnold i Papanikolaou, 2005), *EGFR* (Lv i sar., 2011) i *FGFR* (Brady i sar., 2013).

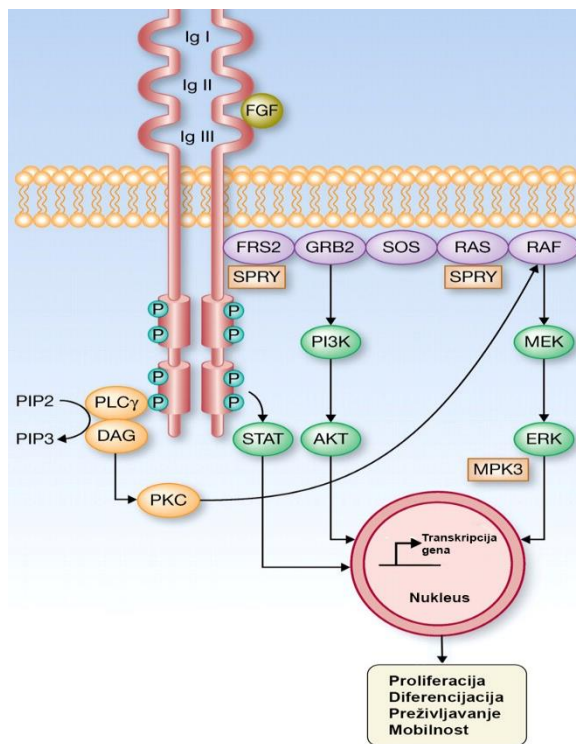
#### 1.4.1 FGFR1

Receptor za fibroblasni faktor rasta 1 (eng. *fibroblast growth factor receptor 1*, FGFR1) pripada visoko konzerviranoj FGFR porodici tirozin-kinaznih receptora koju čine još tri člana - FGFR2, 3, 4 (Johnson, DE. Williams, 1993). *FGFR1* je lociran na hromozomu 8 - 8p12 i igra važnu ulogu u različitim ćelijskim procesima uključujući diferencijaciju, proliferaciju, migraciju i apoptozu kao i u održavanju homeostaze adultnih tkiva (Haugsten i sar., 2010).

Tirozin - kinazni receptori se generalno sastoje iz tri domena: ekstracelularnog koji prepoznaje i vezuje ligand, transmembranskog koji prenosi generisani signal na citoplazmatski domen koji funkcioniše kao tirozin kinaza i prenosi signale dalje na citoplazmatske proteine fosforilacijom njihovih tirozinskih ostataka (Hubbard, 1999). Kod pripadnika FGFR porodice, ligand-vezujući domen se sastoji od tri imunoglobulinima-nalik domena (Ig I-III) (Johnson, DE. Williams, 1993) za koje se vezuju 22 strukturno slična člana porodice fibroblasnog faktora rasta (Itoh i Ornitz, 2004). Vezivanje liganda indukuje dimerizaciju receptora i zatim, transfosforilaciju tirozinskih ostataka u kinaznom domenu što dalje omogućava aktivaciju unutarćelijskih signalnih molekula i pokretanje nizvodnih kaskada.

Krajnji rezultat aktivacije ovih signalnih kaskada biće stimulacija preživljavanja i rasta ćelije kao i povećanje njenih migratornih sposobnosti što je jedno od osnovnih obeležja invazivnosti (Brooks i sar., 2012) **(Slika 1.5)**. Uzimajući u obzir krajnje efekte signalne kaskade, sasvim je jasan onkogeni potencijal ovog gena.

Svaki od 22 specifična liganda može se selektivno vezati i aktivirati jedan ili više FGFR receptora što ovaj signalni put čini izuzetno kompleksnim. Aktivnost ovog gena strogo je kontrolisana i regulisana vremenskim i prostornim obrascom ekspresije različitih liganda i samog receptora.



**Slika 1.5.** Struktura i signalna kaskada FGFR1 proteina.  
Modifikovano iz (Brooks i sar., 2012).

Dosadašnje studije pokazale su da je geneza različitih humanih maligniteta jasno povezana sa poremećajima u transdukciji signala koji se realizuju preko FGFR1 receptora (Haugsten i sar., 2010). Poremećaj u aktivnosti FGFR-a može nastati usled: amplifikacije i/ili povećane ekspresije ovog gena, mutacija koje uzrokuju aktivnosti FGFR receptora u odsustvu liganda, inaktivacije kontrolnih-inhibitornih proteina ili autokrine sinteze liganda (Haugsten i sar., 2010).

U slučaju karcinoma dojke, jedna od najčešće detektovanih aberacija *FGFR1* je amplifikacija. Amplifikacija *FGFR1* gena može dovesti do povećanja osetljivosti na ligand. Međutim, izrazito visok nivo ekspresije FGFR1 receptora može uzrokovati i ligand-nezavisnu aktivaciju. Poznato je da aktivirani FGFR1 doprinosi progresiji karcinoma dojke i lošijem preživljavanju obolelih naročito u populaciji

hormon zavisnih, ER+ karcinoma (Elbauomy Elsheikh i sar., 2007). Dokazano je takođe, da je učestalost aberacija FGFR1 gena u populaciji invazivnih karcinoma dojke značajno povećana (Jang i sar., 2012) , kao i da ovaj gen igra važnu ulogu u indukciji epitelno-mezenhimalne tranzicije - EMT (Tomlinson i sar., 2012). Pođemo li od ovog i činjenice da je velika većina trostruko negativnih tumora invazivna kao i da su svi takozvani kladin niski karcinomi, koje karakteriše EMT, iz grupe TNBC-ova, nameće se zaključak da bi promene *FGFR1* gena mogle biti značajne za nastanak i/ili razvoj ovih maligniteta. Pa ipak, studije onkogenog statusa *FGFR1* su ne samo malobrojne nego i sa vrlo kontradiktornim rezultatima.

### 1.4.2 EGFR

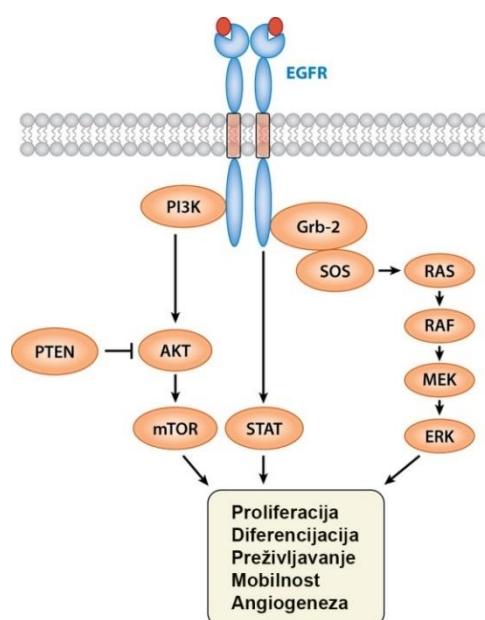
Receptor za epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*. EGFR) zajedno sa HER2, HER3 i HER4 pripada velikoj HER familiji transmembranskih receptorskih tirozin kinaza tipa 1 koje igraju važnu ulogu u osnovnim ćelijskim procesima kao što su rast ćelije, ćelijska adhezija, mobilnost i inhibicija apoptoze (Olayioye i sar., 2000; Yarden i Sliwkowski, 2001). Aktivacija EGFR proto-onkogeno stimuliše invazivnost i angiogenezu (Eccles, 2011).

*EGFR* gen je lociran na hromozomu 7 - 7p11.2, a njegov proteinski produkt sastoji od tri domena karakteristična za sve receptorske tirozin kinaze: ekstracelularnog ili ligand vezujućeg, transmembranskog i citoplazmatskog sa tirozin kinaznom aktivnošću. EGFR aktiviraju različiti faktori rasta - ligandi, a prvenstveno epidermalni (eng. *epidermal growth factor*, EGF) i transformišući faktor rasta-alfa (eng. *transforming growth factor-alpha*, TGF- $\alpha$ ). Vezivanje liganda signal je za aktivaciju receptora koja se odigrava kroz homo- ili heterodimerizaciju, odnosno spajanje dva ista, EGFR monomera ili EGFR monomera sa monomerom bilo kog drugog člana ove receptorske familije u dimer. Krajnji rezultat ove aktivacije je aktivacija neke od više nizvodnih, signalnih kaskada među kojima su najpoznatije PI3K/AKT i Ras/MAPK (**Slika 1.6**). Signali koji se sa EGFR-a transdukuju signalnim putevima ključni su za ponašanje svake normalne epitelne

ćelije što implicira značaj onkogene aktivacije EGFR-a u malignoj transformaciji (da Cunha Santos i sar., 2011; Riese i Stern, 1998; Yarden i Sliwkowski, 2001).

Istraživanja su pokazala da su i prekomerna ekspresija i amplifikacija *EGFR* gena asocirane sa lošijom prognozom obolelih od karcinoma dojke (Liu i sar., 2012; Zhang i sar., 2014). Po svemu sudeći, visoka ekspresija ovog receptora karakteriše prvenstveno populaciju TNBC-a jer korelira sa izrazito niskom ili nepostojećom ekspresijom ER (Witton i sar., 2003). Sa učestaloću od 60%, ekspresija EGFR-a je daleko češća kod trostruko negativnih, u poređenju sa hormon zavisnim tumorima dojke (Toyama i sar., 2008; Zhang i sar., 2014).

Polazeći od navedenog, EGFR se već duže smatra potencijalno dobrom metom za ciljanu terapiju TNBC-a (Liu i sar., 2012; Nakai i sar., 2016). Na žalost, u kliničkim istraživanjima, terapija bazirana na EGFR nije dala željene rezultate što je verovatno, posledica aktivacije FGFR1 signalnog puta. Naime, utvrđeno je da gubitak EGFR signalnog puta, tumorske ćelije u kulturi kompenzuju aktivacijom alternativnog FGFR1 signalnog puta (Azuma i sar., 2014).



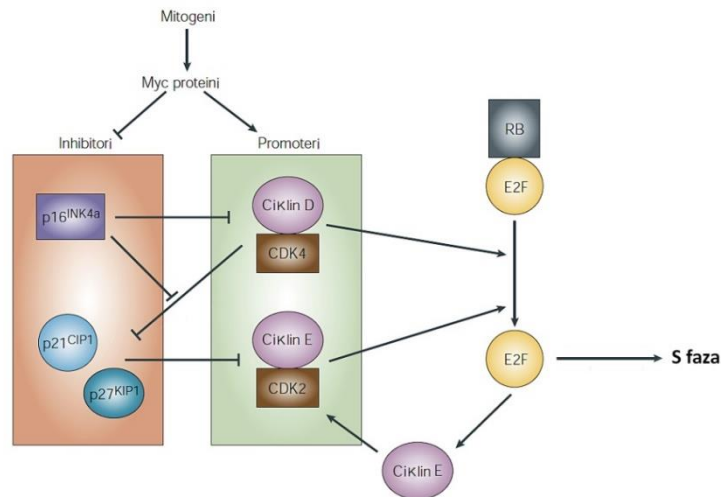
**Slika 1.6.** Struktura i signalna kaskada EGFR proteina. Modifikovano iz (da Cunha Santos i sar., 2011).

### 1.4.3 c-MYC

Familiju *MYC* čini nekoliko funkcionalnih gena (*c-MYC*, *N-MYC* i *L-MYC*) od kojih je najbolje proučen *c-MYC*. *c-MYC* je lociran na hromozomu 8 – 8q12.4. Proteinski produkt ovog gena je transkripcioni faktor koji služi kao ključni regulator većine ćelijskih procesa. Tako *c-MYC* kontroliše metabolizam, rast, replikaciju, diferencijaciju i apoptozu (Liao i Dickson, 2000).

U zdravim ćelijama nivo ekspresije *c-MYC* strogo je kontrolisan, jer prekomerna ekspresija ovog onkoproteina doprinosi pojavi hiperproliferacije. Ovaj se transkripcioni faktor, u zdravoj ćeliji, ponaša i kao transrepresor i kao transaktivator. Naime, on koči ekspresiju čitavog niza gena koji kodiraju inhibitore ćelijskog rasta poput *ink4b/p15* i *waf1/p21*, a aktivira ekspresiju niza ciklina i ciklin zavisnih kinaza (ciklin E, D1, A, *cdc2*, *cdc25A*) koji fosforilacijom Rb-a (eng. *retinoblastoma protein*, Rb) oslobađaju E2F transkripcioni faktor. Inače, poznato je da je porast koncentracije slobodnog E2F transkripcionog faktora u G1 fazi ćelijskog ciklusa uslov za prolaz ćelije kroz glavni kontrolni punkt proliferacije - restrikcionu tačku, u S fazu ćelijskog ciklusa i napredovanje ka mitozu (Hipfner i Cohen, 2004) (**Slika 1.7**). Transkripciju *c-MYC* gena stimulišu mitogeni signali, odnosno faktori rasta što izaziva progresiju ćelije kroz ćelijski ciklus (Waters i sar., 1991). Generalno, uvećana ekspresija *c-MYC* proteina je za ćeliju u kojoj se desila, loš znak. Međutim, ako joj nisu prethodile nikakve druge genetičke/epigenetičke lezije *c-MYC* protein će, aktivacijom ARF - p53 puta, umesto u hiperproliferaciju uvesti ćeliju u apoptozu (McMahon, 2014). Drugim rečima, zdrave ćelije čiji je nivo ekspresije *c-MYC*-a skočio daleko iznad uobičajenog, biće eliminisane apoptozom da bi se organizam zaštitio od potencijalno letalnih lezija u genomu, kao i od eventualnog, generisanja genomske nestabilnosti (Dedović, 2004).

*c-MYC* protein se sastoji od transaktivacionog domena (eng. *transactivation domain*, TAD) na amino-terminalnom delu, bazičnog domena i dimerizacionog motiva sačinjenog od heliks-petlja-heliks (eng. *helix-loop-helix*, HLH) i leucinski patent (eng. *leucine zipper*, LZ) domena na karboksilnom terminalnom delu.



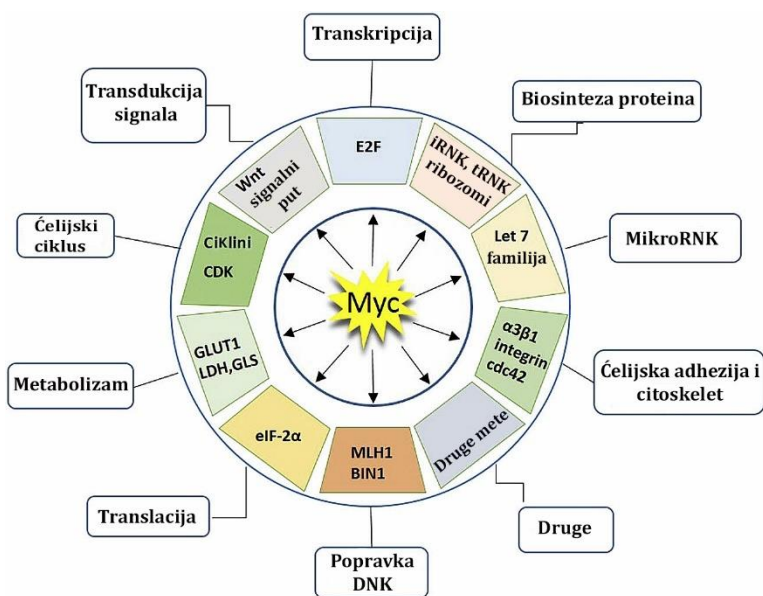
**Slika 1.7.** c-MYC reguliše progresiju iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa. Modifikovano iz (Hipfner i Cohen, 2004).

c-MYC svoju funkciju obavlja u formi heterodimera sa srodnim Max proteinom pri čemu je c-MYC ključna komponenta kompleksa pošto u sklopu TAD sadrži visoko konzervirane sekvence za koje se vezuju proteini transkripcione mašinerije (Kato i sar., 1992). Bazični domen prepoznaje specifičnu DNK sekvencu, takozvani E-box i tako omogućava pravilno pozicioniranje MYC-Max kompleksa. Pored c-MYC, Max je u stanju da formira heterodimere i sa Mad proteinom. Mad-Max heterodimeri funkcionišu kao transkripcioni represori i omogućavaju ćeliji da nakon deobe krene u diferencijaciju. Koncentracija Max proteina je konstantna u ćeliji dok su koncentracije c-MYC i Mad obrnuto proporcionalne i zavise od ekstraćelijskih signala (Kato i sar., 1992).

c-MYC poseduje još čitav niz funkcija koje, u slučaju njegove kontinuirane aktivacije, doprinose brzom i agresivnom razvoju malignog fenotipa. U njih, prvenstveno, spadaju: regulacija ćelijskog metabolizma, odnosno stimulacija metabolizma gvožđa i anaerobnog metabolizma glukoze (Warburg, 1925), povećanje ćelijske mase aktivacijom ekspresije gena koji kodiraju faktore translacije i ribozomalne proteine kao i blokiranje gena za fibronektin, kolagen, tropomiozin, trombospondin koji definišu oblik ćelije i njenu adhezivnost (Chen i sar., 2018; Dang, 1999) **(Slika 1.8)**.



Uzimajući u obzir sve do sada navedeno, uopšte ne čudi važna uloga *c-MYC* u nastanku i razvoju brojnih tumora kod čoveka uključujući i karcinom dojke. Učestalost amplifikacije ovog onkogeneta u tumorima dojke je vrlo visoka i po nekim podacima ide čak i do 94% (Deming i sar., 2000). Takođe, istraživanja su pokazala da je aktivacija *c-MYC* gena amplifikacijom posebno česta kod agresivnih i invazivnih tumora dojke kakvi su upravo tumori TNBC tipa (Aulmann, 2006; Robanus-Maandag i sar., 2003).



**Slika 1.8.** *c-Myc* reguliše širok spektar ćelijskih funkcija. Modifikovano iz (Chen i sar., 2018).

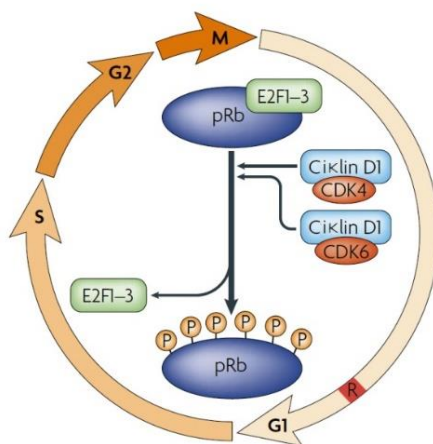
#### 1.4.4 CCND1

Ciklin D1, koga kodira *CCND1* gen lociran na hromozomu 11 – 11q13, pripada familiji ciklina, proteina sa ključnom ulogom u regulaciji ćelijskog ciklusa (Gillett i sar., 1994). Kao glavni senzor i mesto integracije mitogenih van-ćelijskih signala u ranoj G1 fazi, Ciklin D1 je neophodan za progresiju iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa (Fu i sar., 2004). U ćelijskom ciklusu, ciklin D1 je funkcionalan samo kada je u kompleksu sa ciklin zavisnim kinazama CDK4/6 (eng. *cyclin-dependent kinase*, CDK). Ovaj kompleks fosforiliše Rb i tako oslobađanja E2F transkripcioni faktor odgovoran za progresiju kroz restrikcionu tačku ciklusa i ulazak u S fazu (Coller,

2007; Sherr, 1996) (**Slika 1.9**). Pored toga, kompleks ciklin D1-CDK4 indirektno neutrališe p27 i p21, potentne inhibitore kompleksa Cyc/CDK koje su aktivne u kasnoj G1 fazi ćelijskog ciklusa (Musgrove i sar., 2011). Konkretno, ovo se odnosi na cikline A i E i njihove CDK.

Osim u kompleksu sa ciklin zavisnim kinazama, CDK4/6, neke od svojih funkcija, ciklin D1 ostvaruje kao nezavisan, potpuno samostalan protein. Tako je preko interakcija sa histonskim acetilazama/deacetilazama i različitim transkripcionim faktorima, ovaj protein uključen u regulaciju proliferacije, rasta i diferencijacije ćelija (Musgrove i sar., 2011). Osim toga, uočeno je da ciklin D1 vezuje i aktivira ER potpuno nezavisno od liganda. Drugim rečima, ciklin D1 pokreće ER posredovanu transkripciju brojnih gena u odsustvu estrogena što može imati važne kliničke posledice za hormonski zavisne tumore dojke i doprineti rezistenciji na endokrinu terapiju (Coqueret, 2002). Takođe, ciklin D1 utiče na pokretljivost i adhezivnost ćelije, što znači da može značajno doprineti i invazivnom i metastatskom potencijalu tumora (Neumeister i sar., 2003).

Onkogeni aktivacija ciklina D1 je važan faktor u gubitku kontrole nad ćelijskim ciklusom tokom procesa kancerogeneze. Ciklin D1 je jedan od najčešće prekomerno eksprimiranih proteina u karcinomu dojke dok je amplifikacija *CCND1* gena opažena u oko 5-20% primarnih karcinoma dojke (Roy i Thompson, 2006). Postoje dokazi koji povezuju amplifikaciju *CCND1* gena sa progresijom i lošom prognozom karcinoma dojke (Arnold i Papanikolaou, 2005).



**Slika 1.9.** Ciklin D1 i regulacija ćelijskog ciklusa. Modifikovano iz (Coller, 2007).

## 1.5 Terapija karcinoma dojke

U lečenju karcinoma dojke koristi se više terapijskih protokola od kojih je jedan primaran. Najčešći primarni tretman je hirurška intervencija, koja može biti poštena – uklanja se tumor sa okolnim zdravim tkivom ili radikalna – uklanja se cela zahvaćena dojka (van Dongen, 2000). Osim operacije, lečenje karcinoma dojke oslanja se na još četiri osnovna tipa terapije: radioterapija, hemioterapija, endokrina terapija i ciljana terapija.

Hemioterapija podrazumeva korišćenje citotoksičnih supstanci, kao što su jedinjenja iz grupe antraciklina, antifolata i taksena, koje uništavaju intenzivno proliferišuće ćelije što je karakteristika tumorskih ali i nekih normalnih ćelija (ćelije koštane srži, folikula dlake itd). Tip primenjene hemioterapije zavisi od karakteristika tumora i stanja pacijenta (Hassan i sar., 2010).

Endokrina terapija, kojom se ili uklanjaju izvori estrogena ili sprečava njegovo dejstvo, je efikasna samo u lečenju hormonski zavisnih tumora. “Zlatni standard” i najšire korišćen medikament u endokrinoj terapiji karcinoma dojke je tamoksifen – potentan modulator ER u tkivu dojke (Jordan, 2003).

Ciljana ili biološka terapija je po svom karakteru selektivna i najmanje toksična jer deluje isključivo na određene receptore i enzimske sisteme karakteristične za tumorske ćelije. U ciljanoj terapiji koriste se dva osnovna pristupa: prvi baziran na upotrebi monoklonskih antitela, kao što je na primer herceptin koji blokira HER2 i drugi baziran na upotrebi malih molekula - inhibitora tirozin-kinaza, poput lapatinib-a koji inhibira HER2 i EGFR (Arteaga i sar., 2011; Untch i Lück, 2010).

Hemioterapija je jedina sistemska terapija trenutno dostupna za lečenje trostruko negativnih tumora jer su endokrina i ciljana terapija efikasne samo u tretmanu onih karcinoma dojke koji eksprimiraju ER i HER2 receptore. TNBC kao grupa, nakon primene hemioterapije, imaju lošije ukupno preživljavanje u odnosu na hormonski zavisne karcinome dojke. Naime, iako mali broj TNBC-a dobro

odgovara na hemioterapiju, velika većina je rezistentna i ima izrazito lošu prognozu (Foulkes i sar., 2010; Liedtke i sar., 2008). Mogućnosti za lečenje TNBC rezistentnog na hemioterapiju su veoma ograničene jer ciljana terapija za ove tumore još uvek ne postoji. Do sada testirani inhibitori i monoklonska antitela su pokazali nedovoljnu aktivnost (Peddi i sar., 2012).

Neophodno je da se prodube saznanja o molekularnim procesima koji leže u osnovi trostruko negativnih karcinoma dojke kako bi se indetifikovali novi terapijski pristupi. Ipak, za sada hemioterapija ostaje osnovna terapija u lečenju TNBC. Iz tih razloga, od izuzetnog je značaja da se razjasne mehanizmi koji dovode do razvoja rezistencije na hemioterapiju kod ovih karcinoma.

## 1.6 ABC transporteri i rezistencija na terapiju

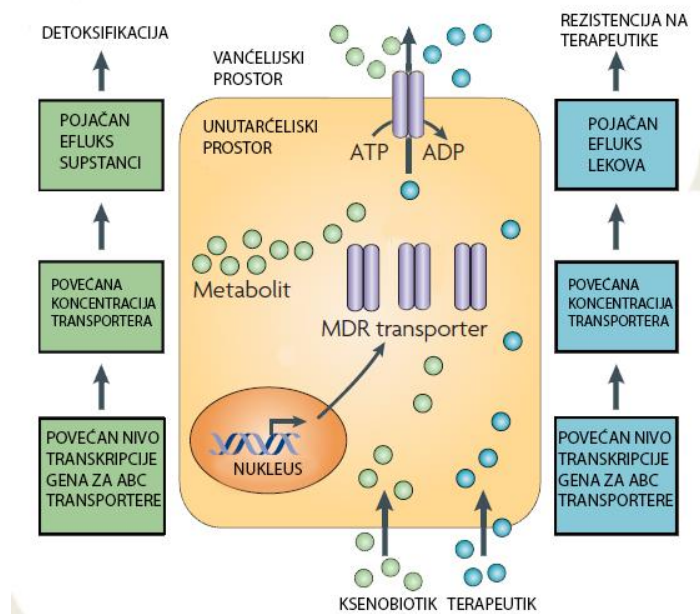
Pojavu da tumor ne odgovara na terapiju nazivamo rezistencijom. Rezistencija može biti primarna ili urođena – rezistencija koja je prisutna pre primene lekova i sekundarna ili stečena – rezistencija koja se javlja tokom primene terapije. Rezistencija na terapiju značajno otežava lečenje svih tipova tumora i predstavlja jednu od glavnih prepreka za uspešnost terapije. Dodatni problem u terapiji predstavlja to što su mnogi tumori istovremeno rezistentni na primenjeni kao i na veći broj terapeutika sa potpuno drugačijom strukturom i mehanizmom dejstva.

Pojava da su tumori rezistentni na širok spektar nesrodnih hemioterapeutika naziva se višestruke rezistencija na lekove (eng. *multiple drug resistance*, MDR). MDR se smatra glavnim razlogom za neuspeh terapije kod čak 90% metastatskih karcinoma (Longley i Johnston, 2005).

Brojni procesi utiču na uspostavljanje rezistencije na terapiju. Među njima značajnu ulogu igraju mehanizmi koji deluju na sposobnost terapeutika da dopre do svog cilja unutar ćelije odnosno mehanizmi koji regulišu influks/efluks aktivnih suspanci kroz ćelijske membrane. Povećana aktivnost transmembranskih

transportera odgovornih za efluks hemioterapeutika kroz ćelijsku membranu smanjuje unutarćelijsku koncentraciju citostatika i time sprečava njihovu interakciju sa ciljnim molekulom (Baguley, 2010).

ABC (eng. *ATP-binding cassette*) transporteri su superfamilija proteina koja vrši energetski zavistan – ATP zavistan, transport raznovrsnih supstrata kroz ćelijske membrane (**Slika 1.10**). Prisutni su u svim organizmima od prokariota do čoveka (Higgins, 1992). Svi ABC transporteri poseduju transmembranski domen (eng. *transmembrane domain*, TMD) i nukleotid vezujući domen (eng. *nucleotide-binding domain*, NBD) koji se nalazi u citoplazmi. TMD domen je i po sekvenci i po strukturi visoko varijabilan što različitim ABC transporterima daje sposobnost da prepoznaju mnogobrojne različite supstrate. Sa druge strane, NBD je evolutivno visoko konzerviran i odgovoran je za specifično vezivanje i hidrolizu ATP-a. Interakcija TMD domena sa supstratom uzrokuje hidrolizu vezanog ATP-a što oslobađa energiju potrebnu za transport supstrata kroz membranu. Većina ABC transportera poseduje dva TMD i dva NBD domena (Biemans-Oldehinkel i sar., 2006).



**Slika 1.10.** ABC transporteri i rezistencija na terapeutike. Modifikovano iz (Fletcher i sar., 2010).

Na osnovu strukture i homologije u sekvenci, ABC superfamilija proteina se deli na sedam podfamilija (A-G). Kod čoveka je do sada indentifikovano 48 različitih ABC transportera (Dean i sar., 2001). Oni igraju važnu ulogu u brojnim procesima u organizmu i učestvuju u održavanju homeostaze. Tako su ABC transporteri odgovorni za transport ksenobiotika (Ishikawa, 1992), lipida (Marcil i sar., 1999; Takahashi i sar., 2005), štetnih produkata metabolizma i toksina, ključna komponenta u prezentaciji antigena glavnom histokompatibilnom kompleksu 1 (Herget i Tampé, 2007). Ekspimirani su u placenti (Macfarland i sar., 1994), važni u uspostavljanju krvno-moždane barijere (Dauchy i sar., 2008) i dr.

Između ekspresije ABC transportera i pojave rezistencije, MDR-a, postoji jasna veza. Upravo zbog toga, najviše su ispitivana tri ABC transportera: MDR1 (eng. *multidrug resistance protein 1*), MRP1 (eng. *multidrug resistance-associated protein 1*) i BCRP (eng. *breast cancer resistance protein*) (Gottesman i sar., 2002). Povišena ekspresija sva tri transportera detektovana je kod mnogobrojnih, različitih tipova tumora u kojima su demonstrirali sposobnost eksportovanja širokog spektra terapijskih agenasa van ćelije (**Tabela 1.1**) (Brangi i sar., 1999; Clarke i sar., 2005; Cole i sar., 1992; Hooijberg i sar., 1999; Leonard, 2003; Leonessa i Clarke, 2003; Ohsawa i sar., 2005; Sissung i sar., 2010; Versantvoort i sar., 1992; Zaman i sar., 1994).

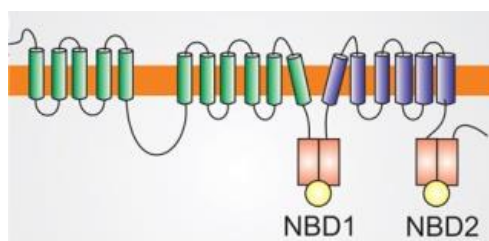
**Tabela 1.1.** Neki od antitumorskih agenasa koji su substrati MDR1, MRP1 i BCRP

	<b>Agensi</b>	<b>MDR1</b>	<b>MRP1</b>	<b>BCRP</b>
<b>Vinka alkaloidi</b>	Vinblastin	+	+	
	Vinkristin	+	+	
<b>Antraciklini</b>	Doksorubicin	+	+	x
	Epirubicin	+	+	x
	Daunorubicin	+	+	x
<b>Epidofili-toksini</b>	Etoposid	+	+	+
	Teniposid	+	+	+
<b>Takseni</b>	Docetaksel	+	+	
	Paklitaksel	+	+	
<b>Kinazni inhibitori</b>	Imatinib	+	+	+
	Gefitinib	+	+	+
	Flavopiridol			+
<b>Kamptotecini</b>	Irinotekan	+	+	+
	Topotekan	+	+	+
<b>Antifolati</b>	Metotreksat	+	+	+
<b>Inhibitori topoizomeraze 2</b>	Mitoksantron	+	+	+

*Legenda: + - Agens je substrat odgovarajućeg transportera, x - Agens je slab substrat odgovarajućeg transportera.*

### 1.6.1 MRP1

MRP1 je membranski protein koga kodira *ABCC1* gen lociran na hromozomu 16 - 16p13.11. Pripada MRP (C) familiji, ABC transportera i prvi je indentifikovan od 13 postojećih članova (Cole i sar., 1992; Yabuuchi i sar., 2002). Iako, većina pripadnika ove familije doprinosi rezistenciji na terapiju, do sada je najbolje okarakterisan upravo MRP1 čiji supstrat predstavljaju brojni anti-tumorski agensi (Filipits i sar., 2005; König i sar., 2005) (**Tabela 1.1**). Polimorfizmi detektovani u *ABCC1*, genu koji kodira transmembranski MRP1 protein po svemu sudeći ne utiču na funkciju ili ekspresiju ove proteinske pumpe (Létourneau i sar., 2005; Oselin i sar., 2003). Za razliku od MDR1, MRP1 poseduje i dodatni, treći TMD domen sačinjen od 5 transmembranskih heliksa (Rosenberg i sar., 2001) (**Slika 1.11**). Istovremeno, MRP1 kao i MDR1 poseduje dva NBD domena od kojih je prvi odgovoran za snažno privlačenje ATP-a, a drugi za njegovu hidrolizu.



**Slika 1.11.** Struktura MRP1 proteina. Preuzeto i modifikovano iz ([www.cellsignallingbiology.org](http://www.cellsignallingbiology.org), 2018).

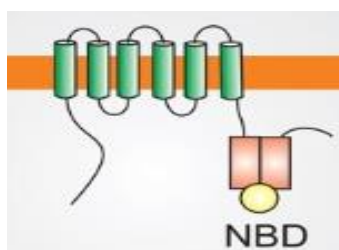
MRP1 normalno ekspimiraju gotova sva tkiva u organizmu uključujući i tkivo dojke. Ovaj transporter igra ulogu u rezistenciji na terapiju brojnih humanih maligniteta, a naročito sitnoćelijskog karcinoma pluća, neuroblastoma, karcinoma prostate, a po svemu sudeći i dojke. Ipak, u literaturi ne postoji saglasnost oko značaja ekspresije MRP1 i preživljavanja obolelih od karcinoma dojke.

Metastudija u kojoj su poređeni različiti parametri karcinoma dojke sa ekspresijom MRP1, dala je prilično kontradiktorne rezultate. Ipak, većina analiza u okviru ove metastudije ne ukazuje na povezanost veličine tumora, statusa limfnih čvorova, gradusa i starosti obolelih sa ekspresijom MRP1 (Leonessa i Clarke, 2003).



## 1.6.2 BCRP

BCRP je ABC transporter koji je prvi put izolovan iz ćelijske linije karcinoma dojke MCF-7/AdrVp rezistentene na doksorubicin po čemu je i dobio ime, **Breast Cancer Resistance Protein** (Austin Doyle i sar., 1998). Ovu transmembransku pumpu kodira *ABCG2* gen lociran na hromozomu 4 – 4q22.1 koji, sa više od 80 detektovanih polimorfizama pojedinačnih nukleotida, spada u visoko polimorfne gene (Tamura i sar., 2007). Inače, utvrđeno je da različite varijante ovog gena stoje u vezi sa razlikama u farmakokinetici i toksičnosti plasiranih lekova. Za razliku od MRP1, BCRP se sastoji od samo jednog TMD domena sa šest transmembranskih heliksa i jednog NBD domena što ga svrstava u kategoriju polu-transportera (Austin Doyle i sar., 1998) (**Slika 1.12**). To znači da funkcionalni BCRP postoji isključivo u obliku homodimera ili homomultimera (Bhatia i sar., 2005).



**Slika 1.12.** Struktura BCRP polu-transportera. Preuzeto i modifikovano iz ([www.cellsignalingbiology.org](http://www.cellsignalingbiology.org), 2018).

Osim u tkivu dojke, BCRP je visoko eksprimiran u organima važnim za absorpciju (tanko crevo), eliminaciju (bubrezi i jetra) i distribuciju (krvno-moždana i placentalna barijera) različitih ksenobiotika odnosno supstanci koje se, poput farmaceutika, normalno ne sintetišu u organizmu (Maliepaard i sar., 2001). Od momenta kada je otkriven, lista substrata BCRP-a neprestano raste i danas ukuljučuje mnogobrojne hemioterapeutske agense (**Tabel 1.1**). Ipak, doprinos ove pumpe pojavi rezistencije na hemioterapiju, a time i na prognozu karcinoma dojke i dalje nije jasan.

Polazeći od činjeice da je karcinom dojke vodeći uzrok smrti među malignitetima u populaciji žena, te da se odlikuje neverovatnom heterogenošću, jasno nam je da je izbor odgovarajuće terapije, baziran na što preciznijoj klasifikaciji, ključan za sudbinu pacijenta. Enormna raznolikost u karakteristikama i biološkom ponašanju malignih bolesti dojke posledica je, po svemu sudeći, razlika u genetičkom profilu određenih grupa gena kod obolelih. Uzimajući sve navedeno u obzir logično je prepostaviti da bi definisanje amplifikacionog profila odabrane grupe proto onkogeni, *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1*, i ekspresionog profila ključnih membranskih transportera, moglo objasniti razlike u biološkom ponašanju, toku i ishodu bolesti naizgled istih podtipova tumora dojke

## 2. Ciljevi

---

Dobro definisan i precizno klasifikovan maligni tumor dojke je osnovni preduslov za pravi izbor terapijskog protokola od koga zavisi dalji tok i ishod bolesti. Ovo naglašavamo zbog toga što pacijenti iste starosne dobi, životnih navika i kliničkih karakteristika sa tumorom koji je klinički i histopatološki okarakterisan kao isti, tj klasifikovan kao isti histološki podtip, na primenjenu terapiju jako često ne odgovaraju isto niti imaju isti tok i ishod bolesti. Ova konstatacija navodi nas na zaključak da razlike sigurno postoje te da se nalaze na nivou genoma. U skladu sa tim opšti cilj ovog rada bio je analiza amplifikacionog statusa odabrane grupe proto-onkogeni i analiza ekspresije odabranih membranskih transportera potencijalno odgovornih za pojavu rezistencije na terapiju kod pacijenata sa TNBC i ER+ karcinomima dojke. Na osnovu toga definisani su konkretni ciljevi rada:

1. analiza amplifikacionog statusa *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* proto-onkogeni kod pacijenata sa TNBC i ER+ karcinomima dojke RT-qPCRom i diferencijalnim PCRom;
2. utvrđivanje korelacije između onkogenog statusa odabrane grupe proto-onkogeni i kliničko-histopatoloških parametara kod ova dva tipa tumora dojke;
3. utvrđivanje povezanosti onkogenog statusa analiziranih proto-onkogeni i ishoda bolesti (analiza preživljavanja pacijenata u zavisnosti od onkogenog statusa ispitivanih gena);
4. analiza nivoa ekspresije MRP1 i BCRP membranskih transportera u tumorskom (TNBC i ER+ karcinomi) i nepromenjenom tkivu dojke imunohistohemijskom metodom;
5. utvrđivanje korelacije između ekspresionog statusa odabranih membranskih transportera i kliničko-histopatoloških parametara kod ova dva tipa tumora dojke
6. utvrđivanje povezanosti ekspresionog statusa analiziranih membranskih transportera i ishoda bolesti (analiza preživljavanja

pacijenata u zavisnosti od ekspresionog statusa ispitivanih membranskih transportera).

## 3. Materijali i metode

---

### 3.1 Materijal

Kao eksperimentalni materijal za izradu ove doktorske teze korišćeni su parafinski kalupi tumorskog i zdravog tkiva dojke dobijeni u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Analizom su obuhvaćena 124 primarna karcinoma dojke i tkivo uzeto sa udaljenosti od najmanje 3cm od ivice tumora koje je patohistološki okarakterisano kao zdravo. Nakon definisanja ekspresionog statusa ER, PR i HER2 receptora, analizirani tumorski uzorci su klasifikovani kao trostruko negativni – TNBC (78) i hormonski zavisni – ER+ (46). Svi analizirani uzorci detaljno su i klinički i patohistološki okarakterisani.

Za korišćenje humanog materijala u naučno-istraživačke svrhe dobijena je saglasnost Etičkog odbora Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije br. 4321-01 06.09.2017. godine. Uzorci su sakupljeni i analizirani u skladu sa etičkim standardima Helsinške deklaracije donete 1964. godine.

Eksperimentalni materijal, parafinski blokovi, korišćen je za analizu amplifikacionog statusa četiri onkogeni: *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1*, i za imunohistohemijsku analizu ekspresije dva ABC transportera: BCRP i MRP1 transmembranska proteina.

### 3.1.1 Kliničke i histopatološke karakteristike trostruko negativnih i hormonski zavisnih karcinoma dojke

Prosečna životna dob bolesnica u obe grupe analiziranih tumora dojke bila je slična, 57 godina za TNBC grupu odnosno 61 za grupu ER+. Među obolelima od TNBC, najmlađa osoba u trenutku postavljanja dijagnoze imala je 30, a najstarija 83 godine, dok se u ER+ grupi raspon starosti bolesnica kretao od 40 do 82 godine.

Velika većina analiziranih TNBC uzoraka, 72 (92%), pripadala je grupi invazivnih karcinoma sa izuzetkom 6 (8%) od kojih je 1 (2%) bio neinvazivan, a 5 (6%) mešovitog tipa. Istovremeno, svi ispitani ER+ uzorci pripadali su invazivnim karcinomima dojke.

Prema veličini tumora, T parametru iz TNM klasifikacije, profil tumorskog uzoraka unutar TNBC i ER+ grupe se prilično razlikovao. Naime, u grupi trostruko negativnih tumora dojke bili su zastupljeni svi T-stadijumi i to sa sledećom ušestalošću:

- 20 (26%) u stadijumu T1 – tumor  $\leq 2$ cm
- 48 (61%) u stadijumu T2 – tumor  $> 2$ cm i  $\leq 5$ cm
- 6 (8%) u stadijumu T3– tumori  $> 5$ cm
- 4 (5%) u stadijumu T4 – tumori bilo koje veličine sa ekstenzijom u okolno tkivo

Istovremeno, u grupi hormonski zavisnih tumora dojke – ER+, bili su prisutni samo uzorci T1 i T2 stadijuma: 18 (42%) u stadijumu T1 i 25 (58%) u stadijumu T2.

Negativni status limfnih čvorova, N0 parametar iz TNM klasifikacije, imalo je 40 (51%) bolesnica iz TNBC i 18 (43%) bolesnice iz ER+ grupe, dok su lokoregionalne metastaze, N1/N2/N3 parametar iz TNM klasifikacije, detektovane kod 38 (49%) bolesnica TNBC i 24 (57%) bolesnice ER+ grupe tumora dojke.

Prema ukupnom pTNM stadijumu u grupi trostruko negativnih tumora dojke bilo je 11 (14%) tumora stadijuma I, 36 (46%) stadijuma II, 11 (14%)

stadijuma III i 20 (26%) stadijuma IV, dok je grupa ER+ obuhvatala 11 (26%) tumora stadijuma I, 19 (45%) stadijuma II i 12 (29%) tumora stadijuma III.

U TNBC grupi, dominirao je duktalni histološki tip tumora sa 47 bolesnica (60%) dok je po 14 (18%) bolesnica imalo lobularne i medularne karcinome. Među ER+ karcinomima dojke, lobularni i duktalni tip tumora bili su gotovo podjednako zastupljeni: 22 (48%) bolesnice sa lobularnim i 21 (46%) sa duktalnim karcinomom. Za razliku od trostruko negativnih tumora, u grupi hormonski zavisnih, medularni karcinomi nisu bili prisutni. U obe grupe tumora, TNBC i ER+, detektovana su samo po 3 slučaja retkih histoloških tipova karcinoma dojke - mucinozni i tubularni tip.

U okviru TNBC grupe, 26 bolesnica (33%) je imalo tumore visokog histološkog gradusa (gradus III) dok su 52 (67%) imale tumore gradusa I ili II. Sa druge strane, u ER+ grupi, velika većina bolesnica, 43 (94%) je imala tumore niskog histološkog gradusa (gradus I i II), dok su kod samo 3 (6%) detektovani tumori visokog gradusa (gradus III).

Pregled i distribucija kliničkopatoloških parametara svih obolelih uključenih u ovu studiju dati su u **Tabeli 3.1**.

**Tabela 3.1.** Pregled trostruko negativnih i ER+ karcinoma dojke na osnovu kliničkih i histopatoloških parametara

Klinički i histopatološki parametri	TNBC br (%)	ER+ br (%)
<b>Ukupan br. uzoraka</b>	78 (63%)	46 (27%)
<b>Godine u trenutku dijagnoze</b>		
<50	21 (27)	13 (28)
≥50	57 (73)	33 (72)
<b>Tip tumora</b>		
Duktalni	47 (60)	22 (48)
Lobularni	14 (18)	21 (46)
Medularni	14 (18)	0 (0)
Drugi*	3 (4)	3 (6)
<b>pTNM stadijum**</b>		
I	11 (14)	11 (26)
II	36 (46)	19 (45)
III	11 (14)	12 (29)
IV	20 (26)	0 (0)
<b>pT stadijum***</b>		
T1	20 (26)	18 (42)
T2	48 (61)	25 (58)
T3 i T4	10 (13)	0 (0)
<b>pN stadijum**</b>		
Negative	40 (51)	18 (43)
Pozitive	38 (49)	24 (57)
<b>Histološki gradus</b>		
I i II	52 (67)	43 (94)
III	26 (33)	3 (6)

Legenda: br, broj bolesnica po grupi; \*-tubularni, mucinozni i drugi retki tipovi karcinoma dojke.  
\*\*- podaci nisu dostupni za četiri ER+ uzorka, \*\*\* - podaci nisu dostupni za tri ER+ uzorka



## 3.2 Metode

### 3.2.1 Izolacija genomske DNK iz parafinskih preseka tkiva dojke

Genomska DNK iz parafinskih kalupa hormonski zavisnih karcinoma dojke izolovana je standardnom procedurom **fenol-hloroformske ekstrajkcije** iz isečaka debljine 10  $\mu\text{m}$  koja obuhvata sledeće korake:

- **uklanjanje parafina** iz isečaka tkiva dodavanjem 1ml ksilola svakom uzorku. Da bi se iz isečka tkiva uklonio kompletan parafin, korak se ponavlja najmanje dva puta
- **uklanjanje zaostalog ksilola** dodavanjem 1ml apsolutnog etanola. Radi potpunog uklanjanja tragova ksilola, i ovaj korak se ponavlja najmanje dva puta
- **sušenje uzoraka** – korak koji omogućava da se nakon dekantovanja, tragovi etanola uklone dodatnom inkubacijom uzorka na 37°C/1h
- **digestija tkiva** u digestionom puferu (100 mM NaCl, 10 mM TRIS-Cl, 25 mM EDTA, pH 8) sa dodatkom SDS-a do finalne koncentracije 0.5% i proteinaze K do finalne koncentracije 0.1 mg/ml na 37°C preko noći. Svakom uzorku dodato je po 200  $\mu\text{l}$  digestionog pufera. Potpuna digestija postignuta je dodavanjem novog alikvota proteinaze K u istoj koncentraciji i dodatnom inkubacijom uzoraka najpre na 56°C/1h, a zatim i na 37°C /24h
- **fenolska ekstrakcija genomske DNK** dodavanjem smeše fenol-hloroform-izoamil alkohol (25:24:1) u uzorke u odnosu volumena 1:1. Nakon centrifugiranja uzoraka zadržava se gornja vodena faza koja sadrži rastvorenu DNK. U ovom postupku, uzorak se oslobađa proteina a genomska DNK prevodi u gornju vodenu fazu. Da bi se potpuno oslobodili proteinske frakcije, postupak je potrebno ponoviti bar dva puta
- **prečišćavanje – uklanjanje fenola** iz vodene faze dodavanjem smeše hloroform-izoamil alkohol (24:1) svakom uzorku u odnosu volumena 1:1
- **obaranje DNK** iz vodene faze postupkom etanolske precipitacije

**Etanolska precipitacija** je postupak koji podrazumeva obaranje DNK iz vodenog rastvora uz pomoć soli i absolutnog etanola. U ovoj proceduri, za precipitaciju DNK korišćeni su 7.5 M amonijum-acetat ( $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ ) u zapremini od 20% ukupnog volumena uzorka i 2.5 zapremina uzorka hladanog, absolutnog etanola. Prinos obarene DNK, poboljšan je dodatnim hlađenjem uzorka u etanolu na  $-20^\circ\text{C}$  preko noći. Nakon cetrifugiranja i ispiranja uzorka u 70% Et-OH, prosušena DNK je rastvorena u 1xTE puferu (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA).

Genomska DNK iz uzoraka trostruko negativnih tumora dojke i zdravog tkiva, izolovana je iz parafinskih isečaka tkiva debljine 10  $\mu\text{m}$ , komercijalnim kitom **Kapa Biosystems Express Extract Kit** (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, SAD) u 100  $\mu\text{l}$  reakcione smeše po uputstvu preporučenom od strane proizvođača. Upotrebljeni kit (10X KAPA Express Extract pufer i 1 U/ $\mu\text{l}$  KAPA Express Extract enzim) omogućava brzu i vrlo efikasnu izolaciju DNK u jednoj tubi i samo dva koraka:

- liza tkiva - inkubacija uzorka u 100  $\mu\text{l}$  reakcione smeše sa KAPA Express Extract puferom finalne koncentracije 1X i 2U KAPA Express Extract enzimom po reakciji i
- inaktivacija KAPA Express Extract enzima – inkubacija uzorka na  $95^\circ\text{C}/5$  minuta.

Izolovana DNK dodatno je prečišćena opisanim postupkom etanolske precipitacije.

### 3.2.2 Određivanje koncentracije i provera kvaliteta izolovane DNK

Koncentracija izolovane genomske DNK određena je spektrofotometrijski merenjem apsorbance na BioSpec-nano aparatu (Shimadzu corporation, Japan). Uzorci čiji se odnos A260/A280 kretao u opsegu 1.7 i 2.1 smatrani su čistim i pogodnim za dalju analizu. Izmerene koncentracije DNK kretale su se od 90 do 1840 ng/μl. Provera kvaliteta izolovane DNK urađena je na 0.8 % agaroznom gelu. Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri naponu od 10 V/cm u trajanju od 40 min. Gel je arhiviran pomoću sistema za snimanje gelova GS8000 (eng. *Gel Documentation System*, UVP inc, Upland SAD). Za sve dalje analize korišćena je samo DNK koja je nakon elektroforetskog pregleda na agarozu dala jasne i oštre trake.

### 3.2.3 Analiza amplifikacionog statusa gena kvantitativnim PCR-om u realnom vremenu

Amplifikacioni status *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* gena utvrđen je metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (eng. *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*, RT-qPCR) baziranom na TaqMan tehnologiji. Ova metoda zasniva se na uporednoj amplifikaciji gena od interesa i referentnog gena koji je u genomu zastupljen uvek u samo jednoj kopiji. Sekvence prajmera i proba za dva od četiri analizirana onkogeni, *c-MYC* i *CCND1*, date su u **Tabeli 3.2**. Broj kopija preostala dva onkogeni, *FGFR1* i *EGFR*, određen je korišćenjem komercijalnih eseja: Hs00237051\_cn za *FGFR1* i Hs04960197\_cn za *EGFR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Kao referentni gen koji se u genomu javlja u jednoj kopiji i kao takav koristi za relativnu kvantifikaciju broja kopija drugih, suspektnih gena, korišćen je gen *Rnase-P* (4403326, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Kao kontrola i kalibrator upotrebljena je DNK izolovana iz zdravog tkiva dojke.

**Tabela 3.2.** Sekvence prajmera i proba korišćenih za analizu broja kopija *c-MYC* i *CCND1* gena

Gen	Sekvenca prajmera	Sekvenca probe
<i>c-MYC</i>	F5'-GGACGACGAGACCTTCATCAA-3' R5'-CCAGCTTCTCTGAGACGAGCTT-3'	6-FAM-5'-AGAAGCCGCTCCACATACAGTCCTGG- 3'-TAMRA
<i>CCND1</i>	F5'-GGACAACGGGCGGATAGAG-3' R5'-CACAGTCATCCCAGGGTTAACA-3'	6-FAM-5'- CAGCCTTGTGTTTACGGCCTTTGAG- 3'-TAMRA

Svaka PCR reakcija, izvedena je sa najmanje dve kontrole pripremljene u triplikatu. Istovremeno, analizirani tumorski uzorci su za svaku PCR reakciju pripremani u duplikatu. Zapremina pojedinačne reakcione smeše za svaki uzorak iznosila je 15  $\mu$ l, a koncentracija DNK 40 ng po reakciji. Finalne koncentracije komponenti reakcione smeše i za komercijalne i za samostalno dizajnirane eseje, date su u **Tabelama 3.3** i **3.4**. Temperaturni profil reakcije dat je u **Tabeli 3.5**. RT-qPCR reakcija je izvedena u ABI Prism 7500 Sequence Detection System aparatu (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD).

Dobijeni rezultati analizirani su korišćenjem RQ Study Add ON softvera (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) sa nivoom pouzdanosti od 95% ( $p < 0.05$ ). Za izračunavanje broja kopija analizirane grupe onkogeni, korišćena je srednja Ct vrednos (duplikata/triplikata) metodom  $2^{-\Delta\Delta CT}$  po Livaku (Livak i Schmittgen, 2001).

**Tabela 3.3.** Komponente reakcije kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu za *FGFR1*, *EGFR* i *Rnase-P* gene

Komponenta	Koncentracija komponente po reakciji
TaqMan Copy Number Assay 20x	1x
TaqMan <sup>®</sup> 2xUniversal PCR Master Mix	1x
DEPC-H2O	Do 15 $\mu$ l
DNK 10 ng/ $\mu$ l	40 ng (4 $\mu$ l)

**Tabela 3.4.** Komponente reakcije RT-qPCR-a za *c-MYC* i *CCND1* gene

Komponenta	Koncentracija komponente po reakciji od 15 $\mu$ l
Prajmer <i>F</i>	0.3 mmol/L
Prajmer <i>R</i>	0.3 mmol/L
Proba	0.1 mmol/L
TaqMan®2xUniversal PCR Master Mix	1x
DEPC-H <sub>2</sub> O	Do 15 $\mu$ l
Uzorak 10 ng/ $\mu$ l	40 ng (4 $\mu$ l)

**Tabela 3.5.** Temperaturni profil reakcije RT-qPCR-a

Korak	Aktivacija enzima	PCR	
	Hold	Ciklus (40 ciklusa)	
		Denaturacija	Aniling/Ekstenzija
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Vreme	10 minuta	15 sekundi	60 sekundi

### 3.2.4 Određivanje broja kopija gena diferencijalnim PCR-om

Broj kopija *EGFR* onkogeno po haploidnom genomu, u grupi hormonski zavisnih tumora, određen je metodom diferencijalnog PCR-a. Diferencijalni PCR je semikvantitativna metoda za istovremenu amplifikaciju dve različite ciljne sekvence, analiziranog i referentnog gena, u istoj reakcionoj tubi sa dva različita seta prajmera. U ovoj studiji, kao referentni gen korišćen je  $\beta$ -aktin koji se u humanom genomu nalazi uvek u jednoj kopiji. Sekvence korišćenih prajmera za oba gena date su u **Tabeli 3.6.**

**Tabela 3.6.** Sekvence prajmera korišćenih u amplifikaciji fragmenata *EGFR* i *β-aktin* gena

Gen	Sekvenca <i>Forward</i> prajmera	Sekvenca <i>Reverse</i> prajmera	Dužina
<i>EGFR</i>	F 5'-AGCCATGCCCGCATTAGCTC-3'	R 5'-AACCCCTTCAACGTAAGGAAA-3'	110 bp
<i>β-aktin</i>	F 5'-CTCTTTTCTTTCCCGATAGGT-3'	R 5'-CTCCAGCTTCTCGTAGGGTC-3'	160 bp

Zapremina svake reakcione smeše iznosila je 25 µl, a koncentracija analizirane DNK 150 ng po reakciji. Komponente reakcione smeše sa početnim i finalnim koncentracijama date su u **Tabeli 3.7**, a temperaturni profil PCR reakcije u **Tabeli 3.8**. Broj ciklusa PCR reakcije bio je ograničen na 30 kako bi se potencijalne razlike u intenzitetu amplifikata uočile u eksponencijalnoj fazi.

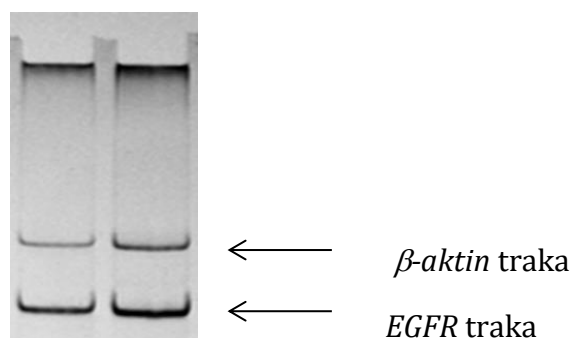
**Tabela 3.7.** Komponente reakcije diferencijalnog PCR-a za *EGFR* i *β-aktin* gene

Komponenta	Koncentracija komponente po reakciji
10 x PCR pufer	1 x PCR puffer
dNTP miks (po 2.5 mmol/L)	po 0.25 mmol/L
EGFR prajmer F (20 µmol/L)	1 µmol/L
EGFR prajmer R (20 µmol/L)	1 µmol/L
β-aktin prajmer F (20 µmol/L)	1 µmol/L
β-aktin prajmer R (20 µmol/L)	1 µmol/L
TaqKappa polimeraza (5 U/µl)	1 U
DEPC-H2O	Do 25 µl zapremine
Uzorak (25 ng/µl)	150 ng (6 µl)

**Tabela 3.8.** Temperaturni profil reakcije diferencijalnog PCR-a

Korak	Aktivacija enzima	PCR 30 ciklusa			Ekstenzija
Temperatura	95 °C	95°C	58 °C	72 °C	72 °C
Vreme	10 min	1 min	1 min	1 min	10 min

Dobijeni PCR produkti *EGFR* i *β-aktin* gena su razdvojeni elektroforezom na 9 % poliakrilamidnom gelu sa odnosom akrilamid/bis-akrilamid od 38:2 (5.3 % C). Elektroforetsko razdvajanje rađeno je pri naponu od 10V/cm u trajanju od 2h. Uzorci su vizualizovani bojenjem srebrom a gel je arhiviran pomoću sistema za snimanje gelova GS8000 (eng. *Gel Documentation System*, UVP inc, Upland SAD). Analiza rezultata za svaki pojedinačni uzorak, urađena je poređenjem intenziteta traka ispitivanog (suspektnog) i referentnog gena ImageQuant 5.2 softverom za kvantifikaciju (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, SAD). Amplifikacioni status *EGFR* onkogena definisan je kao pozitivan u slučajevima kada je srednji intenzitet piksela za *EGFR* traku bio najmanje za 25% intenzivniji od intenziteta piksela za traku *β-aktin-a* (**Slika 3.1**). Da bi izbegli lažno pozitivni rezultat, amplifikacioni status *EGFR*-a je za svaki testirani uzorak određen iz najmanje dve nezavisno izvedene PCR reakcije.



**Slika 3.1.** Elektroforetsko razdvajanje *EGFR* i *β-aktin* PCR produkata. *EGFR* trake su intenzivnije od *β-aktin* traka.

### 3.2.5 Imunohistohemijsko određivanje ekspresije proteina

Nivo ekspresije ER, PR, HER2, MRP1 i BCRP proteina određen je semikvantitativnom imunohistohemijskom metodom (eng. *immunohistochemistry*, IHC) na 5 µm isečcima formalinom fiksiranih, u parafin ukalupljenih tkiva, korišćenjem zečijih ili mišijih primarnih monoklonskih antitela:

- za ER , primarno zečije monoklonsko antitelo RM-9101-S1 (Thermo Fisher Scientific, Češir, Engleska),
- za PR, primarno mišije monoklonsko antitelo M3569 (Dako, Kopenhagen, Danska),
- za HER2, primarno zečije monoklonsko antitelo A0485 (Dako, Kopenhagen, Danska)
- za MRP1, primarno mišije monoklonsko antitelo ab24102 (Abcam, Kembridž, Engleska)
- za BCRP, primarno mišije monoklonsko antitelo ab3380 (Abcam, Kembridž, Engleska)

IHC je metoda koja se bazira na vezivanju specifičnih antitela za antigenske epitope eksprimirane u testiranom tkivnom isečku i obuhvata sledeće osnovne korake:

- **deparafinizacija i rehidratacija** isečaka tkiva upotrebom ksilola i serije opadajućih etanolskih razblaženja (100%, 96% i 75%)
- **demaskiranje – oslobađanje antigena** za koje će se vezati specifično primarno antitelo. U ovom koraku tkivni isecci se potapaju u ključajući citratni pufer (eng. *Epitop Retrieval Solution*, RE7113-CE, Novocastra, Leica Biosystems, Nusloh, Nemačka) ili u ključajući EDTA pufer (eng. *Epitop Retrieval Solution*, RE7116-CE, Novocastra, Leica Biosystems, Nusloh, Nemačka) i inkubiraju u pećnici na 100°C/20 minuta, a zatim postupno hlade do sobne temperature. Citratni pufer, pH=6, korišćen je za ER, PR, HER2 i MRP1 anitela, a EDTA pufer, pH=8, za BCRP antitelo



- **neutralizacija aktivnosti endogene peroksidaze** – korišćenjem takozvanog „peroksidaznog bloka“ (eng. *Peroxidase Block*, RE7101, Novocastra, Leica Biosystems, Nusloh, Nemačka)
- **inkubacija uzoraka sa primarnim antitelom** na sobnoj temperaturi 40 min. Za svako antitelo korišćena su različita razblaženja navedena u uputstu proizvođača: za ER 1: 200, za PR 1: 500, za HER2 1: 800, za MRP1 i BCRP 1:100.
- **bojenje tkivnog uzorka inkubacijom sa sekundarnim antitelom**

U ekspresionoj analizi ER i HER2 kao sekundarno antitelo korišćeno je obeleženo, polivalentno kozije, anti-zečije antitelo. Za ekspresionu analizu PR, BCRP i MRP1 kao sekundarno antitelo korišćeno je zečije, anti-mišije antitelo za koje se naknadno, vezuje obeleženo polivalentno kozije, anti-zečije antitelo. U ovom koraku korišćen je polimerizacioni sistem, odnosno kit koji sadrži sekundarno, zečije anti-mišije antitelo i obeleženo anti-zečije, polivalentno kozije antitelo RE7140-K, (Novocastra, Leica Biosystems, Nusloh, Nemačka).

**vizualizacija proteinske ekspresije** - bazirana na aktivaciji hromogena – diaminobenzidina peroksidazom

- **kontrastno, hematoksilinsko bojenje**

IHC nivo ekspresije proteina određen je korišćenjem Olympus BX50 svetlosnog mikroskopa i Olympus DP70 kamere (Olympus, Tokijo, Japan).

Procena nivoa ekspresije, imunoreaktivnosti tri receptora – ER, PR, HER2 i dva transportera – MRP1, BCRP, dobijena je na osnovu ukupnog skora odnosno, sabiranjem vrednosti procenta obojenih ćelija i intenziteta njihovog bojenja. Procenat bojenja ćelija procenjuje se i klasifikuje na sledeći način:

- 0 – bez imunoreaktivnosti
- 1 – manje od 1% obojenih ćelija
- 2 – od 1 do 10% obojenih ćelija
- 3 – od 11 do 33% obojenih ćelija
- 4 – od 34 do 66% obojenih ćelija

- 5 – od 67 do 100% obojenih ćelija.

Intenzitet obojenosti ćelija procenjuje se i klasifikuje na sledeći način:

- 0 – bez imunoreaktivnosti
- 1 – slabo bojenje (vidljivo samo na najvećem uveličanju)
- 2 – umereno bojenje (vidljivo na malom uveličanju)
- 3 – jako bojenje (intenzivno vidljivo na malom uveličanju).

Sabiranjem vrednosti za procenat obojenih ćelija i intenziteta bojenja dobija se ukupni skor.

Rezultat ovakvog skorovanja je klasifikovanje analiziranih uzoraka za ispitivane proteine, sa izuzetkom HER2, u tri kategorije (Leake, 2000):

- ukupni skor 0-3 – odsustvo ekspresije
- ukupni skor 4-6 – niska ekspresija
- ukupni skor 7 ili 8 – visoka ekspresija.

Ekspresija HER2 smatra se negativnom za vrednosti manje od 2, a pozitivnom za vrednosti veće od 3. U slučaju vrednosti 2, ekspresioni status je dodatno proveravan, hromogenom *in-situ* hibridizacijom (eng. *chromogenic in-situ hybridization*, CISH) (Wolff i sar., 2007).

Kao pozitivne kontrole korišćeni su uzorci za koje prethodno utvrđeno da ekspimiraju analizirani protein. Pozitivne kontrole bojene su paralelno sa ispitivanim uzorcima.

Kompletna patohistološka analiza IHC preparata nezavisno je urađena od strane dva patologa.

### 3.2.6 Statistička analiza

Asocijacije kliničko-patoloških parametara tumora i alteracija u broju kopija *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* gena analizirane su korišćenjem Fišerovog (eng. *Fisher's exact test*) ili Hi-kvadrat testa (eng. *Chi-square test*), u zavisnosti od prirode ispitivanih parametara.

Kada su uzorci na osnovu ekspresije proteinskih transportera, MRP1 i BCRP, bili stratifikovani u dve grupe, asocijacije sa kliničko-patološkim parametrima tumora analizirane su Fisher-ovim testom. Kada stratifikacija uzoraka nije bila moguća, korelacije sa ordinalnim kliničko-patoloških parametarima tumora analizirane su Spirmanov-im testom (eng. *Spearman's tests*).

Asocijacije između ekspresije BCRP i MRP1 i alteracija u broju kopija *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* gena analizirane su Fišer-ovim testom.

Za prikaz ukupnog preživljavanja korišćena je *Kaplan-Meier* product-limit metoda, a za njihov opis, medijane *Survival Analysis* i odgovarajući 95% intervali poverenja (95% CI). Za testiranje razlika u ukupnom preživljavanju korišćen je Log-rank test. Ukupno preživljavanje je definisano kao vreme od dana nakon operacije do poslednjeg pregleda ili smrti (exitus) pacijenta. Za nivo statističke značajnosti usvojena je vrednost  $p \leq 0.05$ .

Analiza podataka je rađena u statističkim programima R version 3.2.3 (2015-12-10) – "Wooden Christmas-Tree"; (The R Foundation for Statistical Computing) i GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. CA, SAD). Za grafički prikaz podataka korišćen je Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corporation, One Microsoft Way, Redmond, WA 98052-7329, SAD) i GraphPad Prism 5.

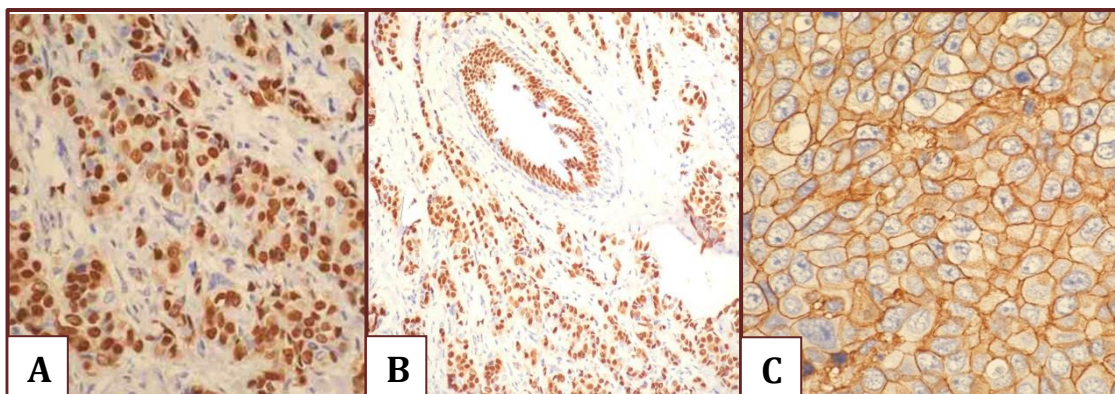
## 4. Rezultati

---

### 4.1 Imunohistohemijska detekcija ekspresije proteina ER, PR i HER2

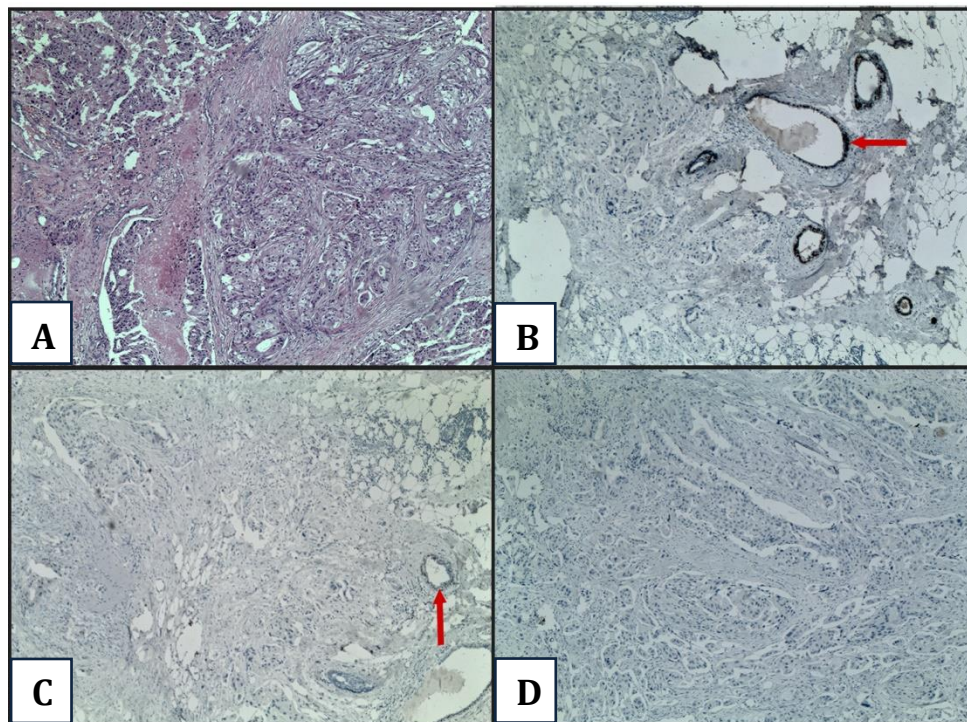
Ova studija urađena je na malignim tumorima dojke koji su klasifikovani u dve kategorije, hormonski zavisne (ER+) i trostruko negativne tumore dojke (TNBC). Klasifikacija tumora dojke na ER+ i TNBC urađena je standardnom imunohistohemijskom, ekspresionom analizom tri proteinska receptora, ER, PR i HER2.

Od ukupno 124 analizirana uzorka u 46 (37%) detektovan je imunohistohemijski detektabilan nivo ekspresije ER proteina. Takvi uzorci tumorskog tkiva definisani su kao hormonski zavisni (ER+). Istovremena ekspresija ER i PR detektovana je kod 39 (31%) uzoraka tumorskog tkiva (**Slika 4.1**).



**Slika 4.1. Imunohistohemijska analiza karcinoma dojke.** Reprezentativni primeri: **A** Visoka nuklearna imunoreaktivnost ER proteina u tumorskom tkivu (200X), **B** Visoka nuklearna imunoreaktivnost PR proteina u tumorskom tkivu (100X), **C** Visoka membranska imunoreaktivnosti HER2 proteina u tumorskom tkivu (400X).

Kod 78 (63%) uzoraka, imuhistohemijska analiza nije dala detektabilan nivo ekspresije testiranih ER, PR i HER2 receptora. Ovi uzorci klasifikovani su kao trostruko negativni (**Slika 4.2**).

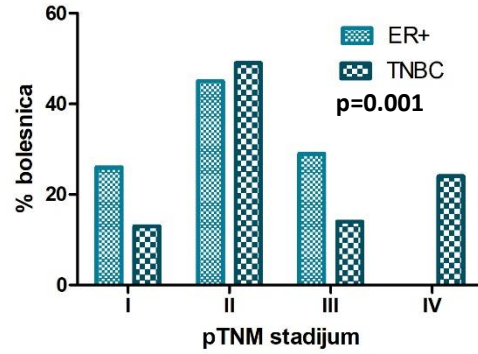
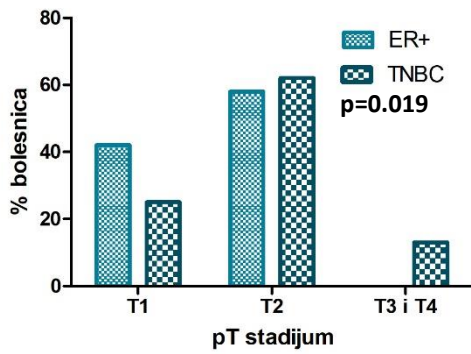


**Slika 4.2. Imunohistohemijska analiza TNBC.** Reprezentativni primeri: **A** Invazivni duktalni karcinom dojke (100X), **B** Nema imunoreaktivnosti za ER protein u tumorskom tkivu, strelica označava pozitivnu unutrašnju kontrolu (100X), **C** Nema imunoreaktivnosti za PR protein u tumorskom tkivu, strelica označava pozitivnu unutrašnju kontrolu (100X), **D** Nema imunoreaktivnosti za HER2 protein u tumorskom tkivu (100X).

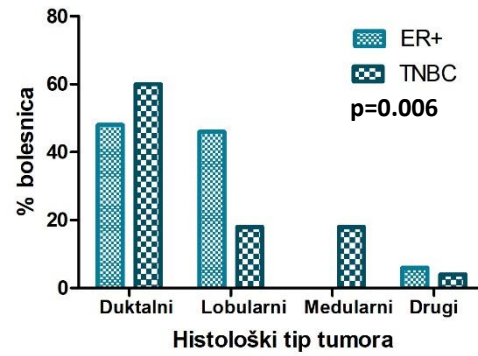
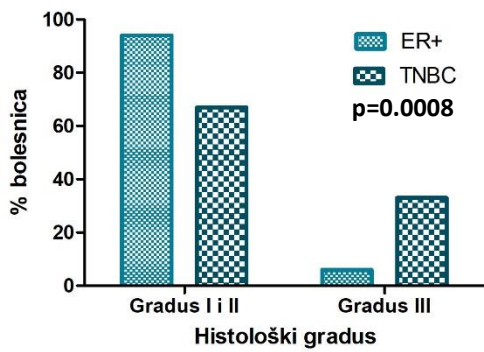
## 4.2. Uporedna analiza kliničkih i histopatoloških parametara kod trostruko negativnih i hormonski zavisnih karcinoma dojke

Uporednom analizom kliničkih i histopatoloških parametara dve grupe ispitivanih malignih tumora dojke, utvrdili smo da su TNBC karcinomi veći i agresivniji, jer imaju značajno viši pT i pTNM stadijum kao i značajno viši histološki gradus u odnosu na ER+ karcinome. Naime, TNBC tumori bili su značajno češće veći od 2 cm (*Hi-kvadrat test,  $p=0.019$* ). U grupi trostruko negativnih tumora, bilo je i statistički značajno više uzoraka visokog pTNM stadijuma u poređenju sa grupom hormonski zavisnih (*Hi-kvadrat test,  $p=0.001$* ) **(Slika 4.3)**. U grupi trostruko negativnih karcinoma dojke detektovano je čak 26% uzoraka sa najvišim, pTNM stadijumom IV. Istovremeno, u grupi hormonski zavisnih karcinoma dojke, nije detektovan nijedan uzorak sa ovim stadijumom (pTNM IV). I incidenca najvišeg histološkog gradusa, gradusa III, u grupi trostruko negativnih tumora, bila je statistički značajno viša nego kod hormonski zavisnih (*Fisher-ov test,  $p=0.0008$* ) **(Slika 4.4)**.

Uporednom analizom histoloških podtipova, utvrdili smo da su u TNBC grupi, duktalni i medularni karcinomi dojke bili statistički značajno zastupljeniji, dok je lobularni tip bio statistički značajno češći u grupi ER+ (*Hi-kvadrat test,  $p=0.006$* ) **(Slika 4.4)**. Za sve ostale kliničke i histo-patološke parametre u ispitivanim grupama karcinoma dojke, statistički značajne razlike nisu detektovane. Pregled parametara za trostruko negativne (TNBC) i hormonski zavisne (ER+) karcinome dojke dat je u odeljku 3, **Tabela 3.1**.

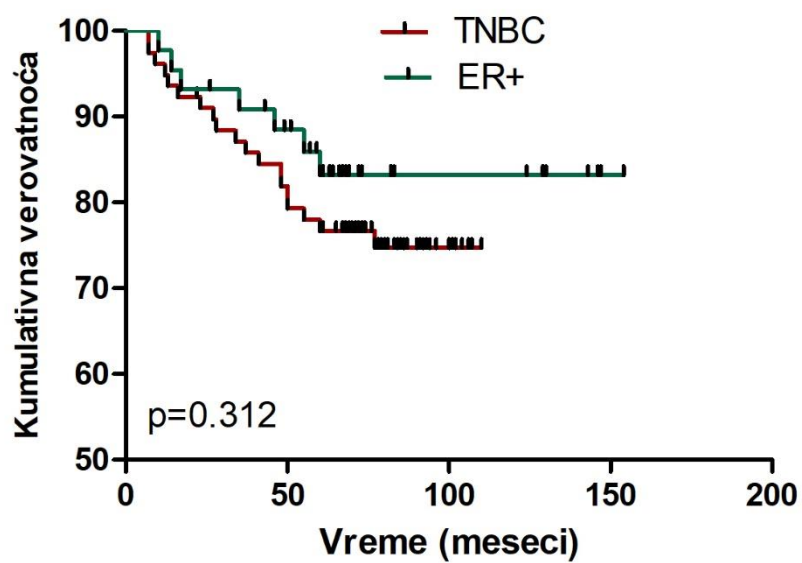


**Slika 4.3** Uporedni prikaz pT i pTNM stadijuma kod TNBC i ER+ karcinoma dojke.



**Slika 4.4** Uporedni prikaz histološkog gradusa i histoloških podtipova karcinoma dojke kod TNBC i ER+ karcinoma dojke.

Na kraju, ukupno preživljavanje bolesnica iz TNBC grupe, bilo je nešto lošije u poređenju sa bolesnicama iz ER+ grupe, mada uočena razlika nije dostigla statističku značajnost (**Slika 4.5**).



**Slika 4.5. Kaplan–Meier kriva preživljavanja.** Analiza ukupnog preživljavanja bolesnica u TNBC i ER+ grupama.



### 4.3 Usporedna analiza amplifikacionog statusa *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* onkogeni u TNBC i ER+ karcinomima dojke

Amplifikacioni status odabrane grupe onkogeni, *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1*, utvrđen je najosjetljivijim PCR metodama, a dobijeni rezultati za dve grupe malignih tumora dojke, trostruko negativne i hormonski zavisne, statistički obrađeni i međusobno upoređeni.

Analiza amplifikacionog statusa *FGFR1* onkogeni u grupi trostruko negativnih tumora dojke je pokazala da je broj kopija ovog gena po genomu, uvećan kod 34 od 78 ispitanih (43%) uzoraka. Uvećanje broja kopija u odnosu na referentni *Rnase P* gen, kretalo se u opsegu od 2 do 10. Istovremeno, amplifikacija *c-MYC*-a detektovana je kod 39 od 78 (50%) uzoraka. Broj kopija ovog gena kretao se u opsegu od 2 do 9. Povećanje broja kopija *CCND1* onkogeni, detektovan je kod vrlo malog broja analiziranih uzoraka trostruko negativnih karcinoma, samo 4 od 78 (5%). Broj kopija kod uzoraka kod kojih je detektovana amplifikacija *CCND1* gena, kretao se u opsegu od 3 do 5. Na kraju, amplifikovani *EGFR* detektovan je kod 16 od 78 (21%) TNBC uzoraka pri čemu se broj kopija kretao u opsegu od 2 do 5, sa samo jednim uzorkom kod koga je detektovan izrazito visok broj kopija – 60 **(Tabela 4.1)**.

Analizom amplifikacionog statusa iste grupe onkogeni, *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1*, u kategoriji hormonski zavisnih tumora dojke, amplifikovani *FGFR1* detektovan je kod 12 od 46 (26%) uzoraka pri čemu se broj kopija kretao u opsegu od 3 do 11. Amplifikovani *c-MYC* čiji se broj kopija kretao u opsegu od 3 do 10, detektovan je kod 13 od 46 (28%) uzoraka. Uvećan broj kopija po genomu detektovan je i kod preostala dva onkogeni. Amplifikacija *CCND1* gena registrovana je kod 9 od 46 (19%) uzoraka sa brojem kopija u opsegu od 3 do 14, a amplifikacija *EGFR*-a kod 12 od 46 (26%) uzoraka **(Tabela 4.1)**.

Usporedna analiza statistički obrađenih rezultata u dve grupe malignih tumora dojke jasno je pokazala da je *c-MYC* onkogeni statistički značajno češće

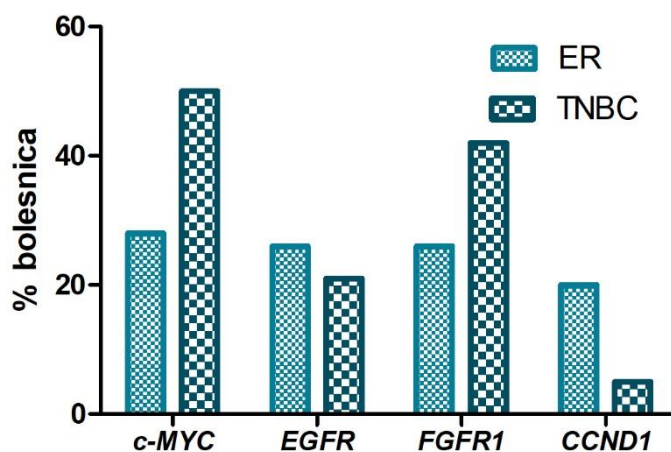
amplifikovan u grupi trostruko negativnih (*Fisher-ov test, p=0.005*), a *CCND1* u grupi hormonski zavisnih tumora dojke (*Fisher-ov test, p=0.017*) (**Tabela 4.1**).

**Tabela 4.1.** Amplifikacioni status *c-MYC*, *EGFR*, *FGFR1* i *CCND1* gena u TNBC i ER+ karcinoma dojke

Ispitivani gen	ER+ tumori br (%)	TNBC br (%)	p vrednost
<b><i>FGFR1</i> amplifikacija</b>			
<i>Da</i>	12 (26)	34 (44)	0.06
<i>Ne</i>	34 (74)	44 (56)	
<b><i>c-MYC</i> amplifikacija</b>			
<i>Da</i>	13 (28)	39 (50)	<b>0.0005</b>
<i>Ne</i>	33 (72)	39 (50)	
<b><i>CCND1</i> amplifikacija</b>			
<i>Da</i>	9 (20)	4 (5)	<b>0.017</b>
<i>Ne</i>	37 (80)	74 (95)	
<b><i>EGFR</i> amplifikacija</b>			
<i>Da</i>	12 (26)	16 (21)	0.516
<i>Ne</i>	34 (74)	62 (79)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi;

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .



**Slika 4.6.** Incidenca amplifikacije ispitanih onkogeni u TNBC i ER+ tumorima.

### 4.3.1 Povezanost amplifikacionog statusa *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* gena sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC tumora

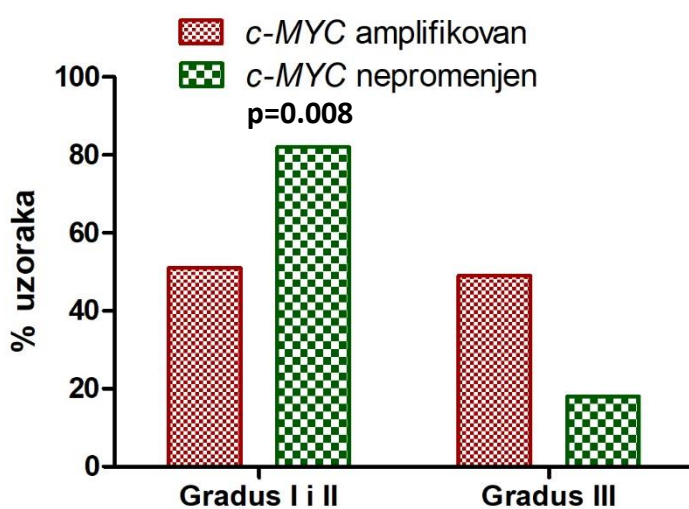
Analiza amplifikacionog statusa odabrane grupe onkogeni u grupi trostruko negativnih tumora dojke omogućila je njihovu stratifikaciju na tumore sa normalnim i tumore sa povećanim brojem kopija datog onkogeni po genomu i dalje analize povezanosti amplifikacionog statusa sa kliničkim i histopatološkim parametarima ovih tumora.

Dobijeni rezultati pokazali su da je povećan broj kopija *c-MYC* onkogeni u asocijaciji sa najvišim histološkim gradusom tumora, gradusom III (*Fisher-ov test*,  $p=0.008$ ) (**Slika 4.7**). Takođe, amplifikovani *c-MYC* je u asocijaciji i sa visokim pTNM stadijumima, stadijumom III i stadijumom IV (*Fisher-ov test*,  $p=0.011$ ) dok među trostruko negativnim tumorima stadijuma I, amplifikacije *c-MYC*-a gotovo da i nema (**Tabela 4.2**)

Kada se amplifikacija navedenih onkogeni posmatra u odnosu na histološki podtip karcinoma dojke, unutar TNBC grupe uočava se da se povećan broj kopija *c-MYC* onkogeni, statistički značajno češće javlja kod bolesnica sa lobularnim karcinomom dojke (*Fisher-ov test*,  $p=0.014$ ). Isti fenomen zapažen je i u grupi medularnih karcinoma, amplifikovani *c-MYC* je statistički značajno češći (*Fisher-ov test*,  $p=0.036$ ). U grupi tubularnih, mucinoznih i drugih retkih podtipova karcinoma dojke, unutar TNBC grupe, nije detektovana amplifikacija *c-MYC* onkogeni (**Tabela 4.2**). Povećani broj kopija *c-MYC* onkogeni nije u asocijaciji sa ostalim kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC tumora (veličina tumora, godine u trenutku dijagnoze, status limfnih čvorova) (**Tabela 4.2**).

Statistički značajne asocijacije amplifikovanog *FGFR1* onkogeni u grupi TNBC tumora i tabelarno prikazanih kliničko-histopatoloških parametara (veličina tumora, status limfnih čvorova, pTNM stadijum, godine u trenutku dijagnoze, histološki gradus, histološki podtipovi tumora) nisu detektovane (**Tabela 4.2**).

Takođe, nije detektovana ni statistički značajna povezanost između broja kopija *CCND1* i *EGFR* onkogena sa kliničko-histopatološkim parametrima TNBC tumora (veličina tumora, status limfnih čvorova, starost bolesnica, histološki gradus, pTNM stadijum, histološki podtipovi tumora) (**Tabela 4.3**).



**Slika 4.7.** Povezanost amplifikacionog statusa *c-MYC* onkogena i histološkog gradusa TNBC tumora.

**Tabela 4.2:** Povezanost kliničkih i histopatoloških parametara TNBC tumora sa amplifikacionim statusom *c-MYC* i *FGFR1* onkogeno

Klinički i histopatološki parametri	<i>c-MYC</i> amplifikacija br (%)			<i>FGFR1</i> amplifikacija br (%)		
	<i>Ne</i> 39 (50)	<i>Da</i> 39 (50)	<i>p</i> <i>vrednost</i>	<i>Ne</i> 44 (56)	<i>Da</i> 34 (44)	<i>p</i> <i>vrednost</i>
<b>Godine u trenutku dijagnoze</b>						
<50	8 (20)	13 (33)	0.307	11 (25)	10 (29)	0.798
≥50	31 (80)	26 (67)		33 (75)	24 (71)	
<b>Tip tumora</b>						
Duktalni	29 (74)	18 (46)	$p^A$ 0.544	29 (66)	18 (53)	$p^A$ 1.000
Lobularni	3 (8)	11 (28)	$p^B$ <b>0.013</b>	8 (18)	6 (18)	$p^B$ 0.765
Medularni	4 (10)	10 (26)	$p^C$ <b>0.036</b>	5 (12)	9 (26)	$p^C$ 0.126
Drugi*	3 (8)	0 (0)	$p^D$ 1.000	2 (4)	1 (3)	$p^D$ 0.449
			$p^E$ <b>0.029</b>			$p^E$ 1.000
			$p^F$ 0.052			$p^F$ 0.536
<b><i>p</i>TNM stadijum</b>						
I	9 (23)	2 (5)	$p^1$ 0.164	8 (18)	3 (9)	$p^1$ 0.300
II	20 (51)	16 (41)	$p^2$ 0.084	18 (41)	18 (53)	$p^2$ 0.485
III i IV	10 (26)	21 (54)	$p^3$ <b>0.011</b>	18 (9)	13 (21)	$p^3$ 0.625
<b><i>p</i>T stadijum***</b>						
T1 i T2	34 (87)	34 (87)	1.000	40 (91)	28 (82)	0.317
T3 i T4	5 (13)	5 (13)		4 (9)	6 (18)	
<b><i>p</i>N stadijum**</b>						
Negative	21 (54)	19 (49)	1.000	19 (43)	21 (64)	0.116
Pozitive	18 (46)	20 (51)		25 (57)	13 (36)	
<b>Histološki gradus</b>						
I i II	32 (82)	20 (51)		32 (73)	20 (59)	0.237
III	7 (18)	19 (49)	<b>0.008</b>	12 (27)	14 (41)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi; \*-tubularni, mucinozni i drugi retki tipovi karcinoma dojke;  $p^A$  – statistička značajnost između duktalnih i drugih tumora;  $p^B$  – statistička značajnost između duktalnih i lobularnih tumora,  $p^C$  – statistička značajnost između duktalnih i medularnih tumora,  $p^D$  – statistička značajnost između lobularnih i medularnih tumora;  $p^E$  – statistička značajnost između lobularnih i drugih tumora;  $p^F$  – statistička značajnost između medularnih i drugih tumora;  $p^1$  – statistička značajnost između stadijuma I i II;  $p^2$  – statistička značajnost između stadijuma II i III/IV;  $p^3$  – statistička značajnost između stadijuma I i III/IV  
Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

**Tabela 4.3:** Povezanost kliničkih i histopatoloških parametara TNBC tumora sa amplifikacionim statusom *CCND1* i *EGFR* onkogeno

Klinički i histopatološki parametri	<i>CCND1</i> amplifikacija br (%)			<i>EGFR</i> amplifikacija br (%)		
	<i>Ne</i> 74 (95)	<i>Da</i> 4 (5)	<i>p</i> <i>vrednost</i>	<i>Ne</i> 62 (79)	<i>Da</i> 16 (21)	<i>p</i> <i>vrednost</i>
<b>Godine u trenutku dijagnoze</b>						
<50	19 (26)	2 (50)	0.292	19 (31)	2 (13)	0.210
≥50	55 (74)	2 (50)		43 (69)	14 (87)	
<b>Tip tumora</b>						
Duktalni	45 (61)	2 (50)	<i>p</i> <sup>A</sup> 1.000	38 (61)	9 (56)	<i>p</i> <sup>A</sup> 0.118
Lobularni	14 (19)	0 (0)	<i>p</i> <sup>B</sup> 1.000	12 (19)	2 (13)	<i>p</i> <sup>B</sup> 1.000
Medularni	12 (16)	2 (50)	<i>p</i> <sup>C</sup> 0.223	11 (18)	3 (19)	<i>p</i> <sup>C</sup> 1.000
Drugi*	3 (4)	0 (0)	<i>p</i> <sup>D</sup> 0.481 <i>p</i> <sup>E</sup> NA <i>p</i> <sup>F</sup> 1.000	1 (2)	2 (12)	<i>p</i> <sup>D</sup> 1.000 <i>p</i> <sup>E</sup> 0.121 <i>p</i> <sup>F</sup> 0.191
<b><i>p</i>TNM stadijum</b>						
I	11 (15)	0 (0)	<i>p</i> <sup>1</sup> 1.000	10 (16)	1 (6)	<i>p</i> <sup>1</sup> 0.413
II	33 (44)	3 (75)	<i>p</i> <sup>2</sup> 0.618	27 (44)	9 (56)	<i>p</i> <sup>2</sup> 0.769
III i IV	30 (41)	1 (25)	<i>p</i> <sup>3</sup> 1.000	25 (40)	6 (38)	<i>p</i> <sup>3</sup> 0.654
<b><i>p</i>T stadijum***</b>						
T1 i T2	64 (86)	4 (100)	1.000	56 (90)	12 (75)	0.581
T3 i T4	10 (14)	0 (0)		6 (10)	4 (25)	
<b><i>p</i>N stadijum**</b>						
Negative	37 (50)	3 (75)	0.616	33 (53)	7 (44)	0.581
Pozitive	37 (50)	1 (25)		29 (47)	9 (56)	
<b>Histološki gradus</b>						
I i II	50 (68)	2 (50)	0.597	43 (69)	9 (56)	0.378
III	24 (32)	2 (50)		19 (31)	7 (44)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi; \*-tubularni, mucinozni i drugi retki tipovi karcinoma dojke; *p*<sup>A</sup> – statistička značajnost između duktalnih i drugih tumora; *p*<sup>B</sup> – statistička značajnost između duktalnih i lobularnih tumora, *p*<sup>C</sup> – statistička značajnost između duktalnih i medularnih tumora, *p*<sup>D</sup> – statistička značajnost između lobularnih i medularnih tumora; *p*<sup>E</sup> – statistička značajnost između lobularnih i drugih tumora; *p*<sup>F</sup> – statistička značajnost između medularnih i drugih tumora; *p*<sup>1</sup> – statistička značajnost između stadijuma I i II; *p*<sup>2</sup> – statistička značajnost između stadijuma II i III/IV; *p*<sup>3</sup> – statistička značajnost između stadijuma I i III/IV  
Bold označava statistički značajne vrednosti, *p* < 0.05.

#### 4.3.1.1 Međuzavisnost amplifikacija analiziranih onkogeni u TNBC tumorima

Učestalost amplifikacije tri od četiri analizirana onkogeni, *c-MYC*, *FGFR1* i *EGFR*, u grupi trostruko negativnih tumora dojke bila je izrazito visoka, odnosno kretala se od 50% kod *c-MYC*-a do 21% kod *EGFR*-a. Zato je sledeći korak u ovoj studiji bila analiza mogućih ko-amplifikacija *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* onkogeni kako bi se utvrdilo da li postoji povezanost između njihove amplifikacije (asocijacija) kod trostruko negativnih tumora. Statističkom analizom distribucije amplifikacija ovih onkogeni unutar ispitavane grupe TNBC-a, statistički značajna povezanost istovremene amplifikacije, detektovana je između sledećih parova: *c-MYC* i *FGFR1* onkogeni (*Fisher-ov test*,  $p=0.003$ ) i *FGFR1* i *EGFR* onkogeni (*Fisher-ov test*,  $p=0.045$ ).

Naime, kod 24 bolesnice detektovana je ko-amplifikacija *c-MYC* i *FGFR1* onkogene, a kod 25 amplifikacija samo jednog od ova dva onkogeni – kod 15 uzorka amplifikacija *c-MYC*-a i kod 10 uzoraka *FGFR1*-a. Istovremeno, 29 bolesnica nije imalo amplifikovan nijedan od ovih onkogeni (**Tabela 4.4**).

**Tabela 4.4:** Međuzavisnost amplifikacije *c-MYC* i *FGFR1* onkogeni u TNBC tumorima

<i>c-MYC amplifikacija</i>			
<i>FGFR1 amplifikacija</i>	Da br (%)	NE br (%)	<i>p vrednost</i>
Da	24 (62)	10 (26)	<b>0.003</b>
Ne	15 (38)	29 (74)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

Analiza međuzavisnosti amplifikacije druga dva, *EGFR* i *FGFR1* onkogeni pokazala je takođe, da je njihova istovremena amplifikacija (ko-amplifikacija) u TNBC grupi, statistički značajno češća. Povećan broj kopija u oba onkogeni

detektovan je kod 11, dok je amplifikacija samo jednog detektovana kod ukupno 28 – kod 5 uzorka amplifikacija *EGFR*-a i kod 23 uzorka *FGFR1*-a. Kod čak 39 bolesnica registrovan je normalan broj kopija oba onkogeni (**Tabela 4.5**).

**Tabela 4.5:** Međuzavisnost amplifikacije *EGFR* i *FGFR1* onkogeni u TNBC tumorima

<i>EGFR amplifikacija</i>			
<i>FGFR1 amplifikacija</i>	Da br (%)	NE br (%)	<i>p vrednost</i>
Da	11 (69)	23 (37)	<b>0.045</b>
Ne	5 (31)	39 (63)	

*Legenda: br, broj bolesnica po grupi.*

*Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .*

Ispitivanjem međuzavisnosti amplifikacije *c-MYC* i *EGFR* onkogeni nije detektovan statistički značajan stepen ko-amplifikacije (**Tabela 4.6**).

**Tabela 4.6:** Međuzavisnost amplifikacije *c-MYC* i *EGFR* onkogeni u TNBC tumorima

<i>c-MYC amplifikacija</i>			
<i>EGFR amplifikacija</i>	Da br (%)	NE br (%)	<i>p vrednost</i>
Da	8 (21)	8 (21)	1.000
Ne	31 (79)	31 (79)	

*Legenda: br, broj bolesnica po grupi.*

*Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .*

Bez obzira na nisku učestalost amplifikacije, ko-amplifikacione analize urađene su i za *CCND1* onkogen. Ove analize pokazale su da amplifikacija *CCND1* nije povezana sa amplifikacijom ostalih ispitanih onkogeni (**Tabela 4.7 – 4.9**).



**Tabela 4.7:** Međuzavisnost amplifikacije *c-MYC* i *CCND1* onkogeni u TNBC tumorima

<b><i>c-MYC</i> amplifikacija</b>			
<b><i>CCND1</i> amplifikacija</b>	<b>Da br (%)</b>	<b>NE br (%)</b>	<b><i>p</i> vrednost</b>
<b>Da</b>	3 (8)	1 (3)	0.615
<b>Ne</b>	36 (92)	38 (97)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

**Tabela 4.8:** Međuzavisnost amplifikacije *FGFR1* i *CCND1* onkogeni u TNBC tumorima

<b><i>FGFR1</i> amplifikacija</b>			
<b><i>CCND1</i> amplifikacija</b>	<b>Da br (%)</b>	<b>NE br (%)</b>	<b><i>p</i> vrednost</b>
<b>Da</b>	3 (9)	1 (2)	0.312
<b>Ne</b>	31 (91)	43 (98)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

**Tabela 4.9:** Međuzavisnost amplifikacije *EGFR* i *CCND1* onkogeni u TNBC tumorima

<b><i>EGFR</i> amplifikacija</b>			
<b><i>CCND1</i> amplifikacija</b>	<b>Da br (%)</b>	<b>NE br (%)</b>	<b><i>p</i> vrednost</b>
<b>Da</b>	0 (0)	4 (6)	0.576
<b>Ne</b>	16 (100)	58 (94)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

Istovremeno povećanje broja kopija u tri, od četiri analizirana onkogeni, registrovano je kod 11 (14%) ispitanih uzoraka. Simultana amplifikacija *c-MYC/EGFR/FGFR1* onkogeni detektovana je kod 8 (10%), a *c-MYC/CCND1/FGFR1* onkogeni kod samo 3 (4%) uzorka. Genotipovi sa istovremeno amplifikovanim *FGFR1/EGFR/CCND1* i *EGFR/CCND1/c-MYC* nisu registrovani u našem uzorku. Istovremena amplifikacija sva četiri ispitana onkogeni nije detektovana ni u jednom slučaju. Suprotno tome, 23 od 78 (29%) analiziranih uzorka imala su normalan broj kopija sva četiri onkogeni po genomu.

Parovi onkogeni za koje je utvrđeno da statistički značajno češće koalteriraju, podvrgnuti su daljoj statističkoj analizi, odnosno ispitivanju asocijacija sa relevantnim kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC tumora. Ove analize pokazale su da je istovremeno povećanje broja kopija *c-MYC* i *FGFR1* onkogeni u asocijaciji sa pTNM stadijumom III i IV TNBC tumora (*Fisher-ov test, p=0.043*) **(Tabela 4.10)** kao i sa njihovim najvišim histološkim gradusom – gradusom III (*Fisher-ov test, p=0.018*) **(Tabela 4.10)**. Pored toga, utvrđeno je i da je amplifikacija ovih onkogeni statistički značajno češća u medularnim tumorima (*Fisher-ov test, p=0.023*) **(Tabela 4.10)**. Istovremeno, utvrđeno je da simultana amplifikacija *FGFR1* i *EGFR* onkogeni nije u asocijaciji ni sa jednim relevantnim kliničkim i histopatološkim parametrom **(Tabela 4.10)**.

**Tabela 4.10:** Povezanost kliničkih i histopatoloških parametara TNBC tumora sa ko-amplifikacijom *c-MYC/FGFR1* i *c-MYC/EGFR* onkogeni

Klinički i histopatološki parametri	<i>c-MYC / FGFR1</i> amplifikacija br (%)			<i>FGFR1 / EGFR</i> amplifikacija br (%)		
	Ne 29 (37)	Da 24 (31)	<i>p</i> <i>vrednost</i>	Ne 39 (50)	Da 11 (14)	<i>P</i> <i>vrednost</i>
<b>Godine u trenutku dijagnoze</b>						
<50	6 (21)	8 (33)	0.358	10 (26)	1 (9)	0.416
≥50	23 (79)	16 (67)		29 (74)	10 (91)	
<b>Tip tumora</b>						
Duktalni	22 (37)	11 (46)	<i>p</i> <sup>A</sup> 1.000	26 (67)	6 (55)	<i>p</i> <sup>A</sup> 0.374
Lobularni	3 (10)	6 (28)	<i>p</i> <sup>B</sup> 0.124	7 (18)	1 (9)	<i>p</i> <sup>B</sup> 1.000
Medularni	2 (7)	7 (26)	<i>p</i> <sup>C</sup> <b>0.025</b>	5 (13)	3 (27)	<i>p</i> <sup>C</sup> 0.348
Drugi*	2 (7)	0 (0)	<i>p</i> <sup>D</sup> 1.000	1 (2)	1 (9)	<i>p</i> <sup>D</sup> 0.569
			<i>p</i> <sup>E</sup> 0.182			<i>p</i> <sup>E</sup> 0.378
			<i>p</i> <sup>F</sup> 0.109			<i>p</i> <sup>F</sup> 1.000
<b><i>p</i>TNM stadijum</b>						
I	7 (24)	1 (4)	<i>p</i> <sup>1</sup> 0.116	8 (21)	1 (10)	<i>p</i> <sup>1</sup> 0.629
II	14 (48)	12 (50)	<i>p</i> <sup>2</sup> 0.549	14 (36)	5 (45)	<i>p</i> <sup>2</sup> 1.000
III i IV	8 (28)	11 (46)	<i>p</i> <sup>3</sup> <b>0.043</b>	17 (43)	5 (45)	<i>p</i> <sup>3</sup> 0.642
<b><i>p</i>T stadijum***</b>						
T1 i T2	27 (93)	21 (87)	0.649	36 (92)	8 (73)	0.068
T3 i T4	2 (7)	3 (13)		3 (8)	3 (27)	
<b><i>p</i>N stadijum**</b>						
Negative	14 (48)	14 (59)	0.583	19 (49)	7 (64)	0.501
Pozitive	15 (10)	10 (41)		20 (51)	4 (36)	
<b>Histološki gradus</b>						
I i II	24 (83)	12 (50)		28 (72)	5 (45)	0.151
III	5 (17)	12 (50)	<b>0.018</b>	11 (28)	6 (55)	

Legenda: br, broj bolesnika po grupi; \*-tubularni, mucinozni i drugi retki tipovi karcinoma dojke; *p*<sup>A</sup> – statistička značajnost između duktalnih i drugih tumora; *p*<sup>B</sup> – statistička značajnost između duktalnih i lobularnih tumora, *p*<sup>C</sup> – statistička značajnost između duktalnih i medularnih tumora, *p*<sup>D</sup> – statistička značajnost između lobularnih i medularnih tumora; *p*<sup>E</sup> – statistička značajnost između lobularnih i drugih tumora; *p*<sup>F</sup> – statistička značajnost između medularnih i drugih tumora; *p*<sup>1</sup> – statistička značajnost između stadijuma I i II; *p*<sup>2</sup> – statistička značajnost između stadijuma II i III/IV; *p*<sup>3</sup> – statistička značajnost između stadijuma I i III/IV  
Bold označava statistički značajne vrednosti, *p* < 0.05.

### 4.3.2 Povezanost amplifikacionog statusa *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* gena sa kliničkim i histopatološkim parametrima ER+ tumora

Analizom amplifikacionog statusa *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* onkogeni, grupa hormonski zavisnih tumora dojke podeljena je na tumore sa normalnim i tumore sa povećanim brojem kopija datog onkogeni po genomu i podvrgnuta je daljoj analizi vezanosti (asocijacija) amplifikacionog statusa sa relevantnim kliničkim i histopatološkim parametrima ovih tumora.

Dobjeni rezultati pokazali su da amplifikacija *c-MYC* i amplifikacija *FGFR1* onkogeni nisu u asocijaciji ni sa jednim navedenim kliničko-histopatološkim parametrom ER+ tumora (veličina tumora, status limfnih čvorova, godine u trenutku dijagnoze, pTNM stadijum, histološki gradus, histološki podtipovi tumora, HER2 status) (**Tabela 4.11**).

Međutim, dobijeni rezultati su pokazali da je amplifikacija *EGFR* onkogeni u asocijaciji sa visokim histološkim gradusom, gradusom III, ER+ tumora (*Fisher-ov test*,  $p=0.014$ ). Istovremeno, povećanje broja kopija *EGFR* onkogeni po genomu ne pokazuje postojanje asocijacija sa ostalim kliničkim i histopatološkim parametrima ovih tumora (veličina tumora, status limfnih čvorova, godine u trenutku dijagnoze, pTNM stadijum, histološki podtipovi tumora, HER2 status) (**Tabela 4.12**). Kao i u slučaju *c-MYC* i *FGFR1* onkogeni, ni amplifikacija *CCND1* onkogeni ne pokazuje statistički značajnu povezanost sa navedenim kliničkim i histopatološkim parametrima ER+ tumora (**Tabela 4.12**).

**Table 4.11:** Povezanost kliničkih i histopatoloških parametara ER+ tumora sa amplifikacionim statusom *c-MYC* i *FGFR1* onkogeno

Klinički i histopatološki parametri	<i>c-MYC</i> broj amplifikacija br (%)			<i>FGFR1</i> amplifikacija br (%)		
	<i>Ne</i> 33 (72)	<i>Da</i> 13 (28)	<i>p</i> <i>vrednost</i>	<i>Ne</i> 34 (74)	<i>Da</i> 12 (26)	<i>p</i> <i>vrednost</i>
<b>Godine u trenutku dijagnoze</b>						
<50	7 (21)	6 (46)	0.145	9 (26)	4 (33)	0.716
≥50	26 (79)	7 (54)		25 (74)	8 (67)	
<b>Tip tumora</b>						
Duktalni	17 (52)	5 (38)	<i>p</i> <sup>A</sup> 0.509	14 (41)	8 (67)	<i>p</i> <sup>A</sup> 0.162
Lobularni	14 (42)	7 (54)	<i>p</i> <sup>B</sup> 1.000	18 (53)	3 (25)	<i>p</i> <sup>B</sup> 1.000
Drugi*	2 (6)	1 (8)	<i>p</i> <sup>C</sup> 1.000	2 (6)	1 (8)	<i>p</i> <sup>C</sup> 0.437
<b><i>p</i>TNM stadijum**</b>						
I	7 (24)	4 (31)	<i>p</i> <sup>1</sup> 1.000	8 (27)	3 (25)	<i>p</i> <sup>1</sup> 0.702
II	13 (45)	6 (46)	<i>p</i> <sup>2</sup> 1.000	12 (40)	7 (58)	<i>p</i> <sup>2</sup> 0.418
III	9 (31)	3 (23)	<i>p</i> <sup>3</sup> 0.667	10 (33)	2 (17)	<i>p</i> <sup>3</sup> 0.640
<b><i>p</i>T stadijum***</b>						
T1	14 (47)	5 (38)	0.743	14 (45)	5 (42)	1.000
T2	16 (53)	8 (62)		17 (55)	7 (58)	
<b><i>p</i>N stadijum**</b>						
Negative	12 (41)	6 (46)	1.000	12 (40)	6 (50)	0.738
Pozitive	17 (59)	7 (54)		18 (60)	6 (50)	
<b>Histološki gradus</b>						
I i II	30 (91)	13 (100)	0.548	32 (94)	11 (92)	1.000
III	3 (9)	0 (0)		2 (6)	1 (8)	
<b>HER2 status</b>						
Pozitivan	14 (42)	4 (31)	0.522	13 (38)	5 (42)	1.000
Negativan	19 (58)	9 (69)		21 (62)	7 (58)	

*Legenda: br, broj bolesnica po grupi; \*-tubularni, mucinozni i drugi retki tipovi karcinoma dojke; \*\*- podaci nisu dostupni za četiri uzorka; \*\*\*- podaci nisu dostupni za tri uzorka* ***p*<sup>A</sup>** – statistička značajnost između duktalnih i lobularnih tumora; ***p*<sup>B</sup>** – statistička značajnost između duktalnih i retkih tumora, ***p*<sup>C</sup>** – statistička značajnost između lobularnih i retkih tumora, ***p*<sup>1</sup>** – statistička značajnost između stadijuma I i II; ***p*<sup>2</sup>** – statistička značajnost između stadijuma II i III; ***p*<sup>3</sup>** – statistička značajnost između stadijuma I i III

*Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .*

**Table 4.12:** Povezanost kliničkih i histopatoloških parametara ER+ tumora sa amplifikacionim statusom *EGFR* i *CCND1* onkogeno

Klinički i histopatološki parametri	<i>EGFR</i> amplifikacija br (%)			<i>CCND1</i> amplifikacija br (%)		
	<i>Ne</i> 34 (74)	<i>Da</i> 12 (26)	<i>p</i> vrednost	<i>Ne</i> 37 (80)	<i>Da</i> 9 (20)	<i>p</i> vrednost
<b>Godine u trenutku dijagnoze</b>						
<50	10 (29)	3 (25)	1.000	11 (30)	2 (22)	1.000
≥50	24 (71)	9 (75)		26 (70)	7 (78)	
<b>Tip tumora</b>						
Duktalni	15 (44)	7 (58)	$p^A$ 0.736	17 (46)	5 (55)	$p^A$ 1.000
Lobularni	16 (47)	5 (42)	$p^B$ 0.534	17 (46)	4 (45)	$p^B$ 1.000
Drugi*	3 (8)	0 (0)	$p^C$ 1.000	3 (8)	0 (0)	$p^D$ 1.000
<b><i>p</i>TNM stadijum**</b>						
I	9 (30)	2 (17)	$p^1$ 0.419	10 (30)	1 (11)	$p^1$ 0.372
II	12 (40)	7 (58)	$p^2$ 0.697	14 (42)	5 (55)	$p^2$ 1.000
III	9 (30)	3 (25)	$p^3$ 1.000	9 (28)	3 (34)	$p^3$ 0.590
<b><i>p</i>T stadijum***</b>						
T1	15 (48)	4 (33)	0.499	17 (50)	2 (22)	0.257
T2	16 (52)	8 (67)		17 (50)	7 (78)	
<b><i>p</i>N stadijum**</b>						
Negative	13(43)	5 (42)	1.000	15 (45)	3 (34)	0.708
Pozitive	17 (57)	7 (58)		18 (55)	6 (66)	
<b>Histološki gradus</b>						
I i II	34 (100)	9 (75)	<b>0.014</b>	35 (95)	8 (89)	0.488
III	0 (0)	3 (25)		2 (5)	1 (11)	
<b>HER2 status</b>						
Pozitivan	11 (32)	7 (58)	0.170	12 (32)	6 (66)	0.124
Negativan	23 (68)	5 (42)		25 (68)	3 (34)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi; \*-tubularni, mucinozni i drugi retki tipovi karcinoma dojke; \*\*- podaci nisu dostupni za četiri uzorka; \*\*\*- podaci nisu dostupni za tri uzorka  $p^A$  – statistička značajnost između duktalnih i lobularnih tumora;  $p^B$  – statistička značajnost između duktalnih i retkih tumora,  $p^C$  – statistička značajnost između lobularnih i retkih tumora,  $p^1$  – statistička značajnost između stadijuma I i II;  $p^2$  – statistička značajnost između stadijuma II i III;  $p^3$  – statistička značajnost između stadijuma I i III

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

### 4.3.2.1 Međuzavisnost promena analiziranih onkogenima u ER+ tumorima

U ovoj studiji analizirana je i simultana ko-alteracija *c-MYC*, *EGFR*, *CCND1* i *FGFR1* onkogeni u grupi ER+ tumora, odnosno (po)vezanosti njihove istovremene amplifikacije. Analize distribucije amplifikacija su pokazale da u grupi ER+ tumora, statistički značajna povezanost postoji kod istovremene amplifikacije *CCND1* i *FGFR1* onkogeni (*Fisher-ov test*,  $p=0.005$ ) kao i kod *CCND1* i *EGFR* onkogeni (*Fisher-ov test*,  $p=0.039$ ).

Istovremena promena u amplifikacionom statusu *CCND1/FGFR1* onkogenog para detektovana je kod 6 bolesnika. Amplifikacija samo *FGFR1*-a detektovana je kod 6 uzoraka, a *CCND1* onkogeni kod 3 uzorka. Kod 32 uzorka nisu detektovane promene u broju kopija kod ovih onkogeni (**Tabela 4.13**).

**Tabela 4.13:** Međuzavisnost amplifikacije *CCND1* i *FGFR1* onkogeni u ER+ tumorima

<i>CCND1</i> amplifikacija			
<i>FGFR1</i> amplifikacija	Da br (%)	NE br (%)	<i>p</i> vrednost
Da	6 (67)	6 (16)	<b>0.005</b>
Ne	3 (33)	32 (84)	

*Legenda:* br, broj bolesnika po grupi.

*Bold* označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

Istovremena amplifikacija *CCND1* i *EGFR* onkogeni registrovana je kod 5 bolesnika, dok je kod 7 detektovana amplifikacija samo *EGFR*-a. Amplifikacija *CCND1* onkogeni detektovana je kod 4 uzorka dok je kod 30 registrovan normalan broj kopija oba onkogeni po genomu (**Tabela 4.14**).

**Tabela 4.14:** Međuzavisnost amplifikacije *CCND1* i *EGFR* onkogena u ER+ tumorima

<i>CCND1</i> amplifikacija			
<i>EGFR</i> amplifikacija	Da br (%)	NE br (%)	<i>p</i> vrednost
Da	5 (56)	7 (19)	<b>0.039</b>
Ne	4 (44)	30 (81)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

Značajan nivo ko-amplifikacije ostalih analiziranih onkogena kod obolelih od hormonski zavisnih karcinoma dojke nije registrovan (**Tabela 4.15 - 4.18**)

**Tabela 4.15:** Međuzavisnost amplifikacije *c-MYC* i *EGFR* onkogena u ER+ tumorima

<i>c-MYC</i> amplifikacija			
<i>EGFR</i> amplifikacija	Da br (%)	NE br (%)	<i>p</i> vrednost
Da	2 (15)	10 (30)	0.461
Ne	11 (85)	23 (70)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

**Tabela 4.16:** Međuzavisnost amplifikacije *c-MYC* i *FGFR1* onkogena u ER+ tumorima

<i>c-MYC</i> amplifikacija			
<i>FGFR1</i> amplifikacija	Da br (%)	NE br (%)	<i>p</i> vrednost
Da	3 (23)	9 (27)	1.000
Ne	10 (77)	24 (73)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .



**Tabela 4.17:** Međuzavisnost amplifikacije *c-MYC* i *CCND1* onkogeni u ER+ tumorima

<b><i>c-MYC</i> amplifikacija</b>			
<b><i>CCND1</i> amplifikacija</b>	<b>Da br (%)</b>	<b>NE br (%)</b>	<b><i>p</i> vrednost</b>
<b>Da</b>	4 (31)	5 (15)	0.246
<b>Ne</b>	9 (69)	28 (85)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

**Tabela 4.18:** Međuzavisnost amplifikacije *EGFR* i *FGFR1* onkogeni u ER+ tumorima

<b><i>EGFR</i> amplifikacija</b>			
<b><i>FGFR1</i> amplifikacija</b>	<b>Da br (%)</b>	<b>NE br (%)</b>	<b><i>p</i> vrednost</b>
<b>Da</b>	6 (50)	6 (18)	0.052
<b>Ne</b>	6 (50)	28 (82)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

U grupi hormonski zavisnih tumora, istovremena amplifikacija sva četiri onkogeni detektovana je u samo 2 (4%) uzorka, dok je kod 16 (35%) uzoraka broj kopija svih ispitanih onkogeni po genomu, bio normalan.

Genotipovi sa istovremenom amplifikacijom tri onkogeni detektovani su kod 11 (24%) uzoraka. Naime, genotip sa amplifikovanim *FGFR1/EGFR/CCND1* detektovan je kod 3 (6%), a svaki od preostala četiri genotipa, *FGFR1/EGFR/CCND1*, *FGFR1/CCND1/c-MYC*, *EGFR/CCND1/c-MYC* i *FGFR1/EGFR/c-MYC* kod po 2 (4%) uzoraka ER+ tumora.

Kao i kod trostruko negativnih, i u ovoj grupi tumora dojke, parovi onkogeni za koje je utvrđeno da statistički značajno češće ko-alteriraju, podvrgnuti su ispitivanju asocijacija sa relevantnim kliničkim i histopatološkim

parametrima. Analize su pokazale da detektovane ko-amplifikacije nisu u asocijaciji ni sa jednim od ispitanih parametara za ER+ tumore (Tabela 4.19).

**Tabela 4.19:** Povezanost kliničkih i histopatoloških parametara ER+ tumora sa ko-amplifikacijom *CCND1/FGFR1* i *CCND1/EGFR* onkogeni

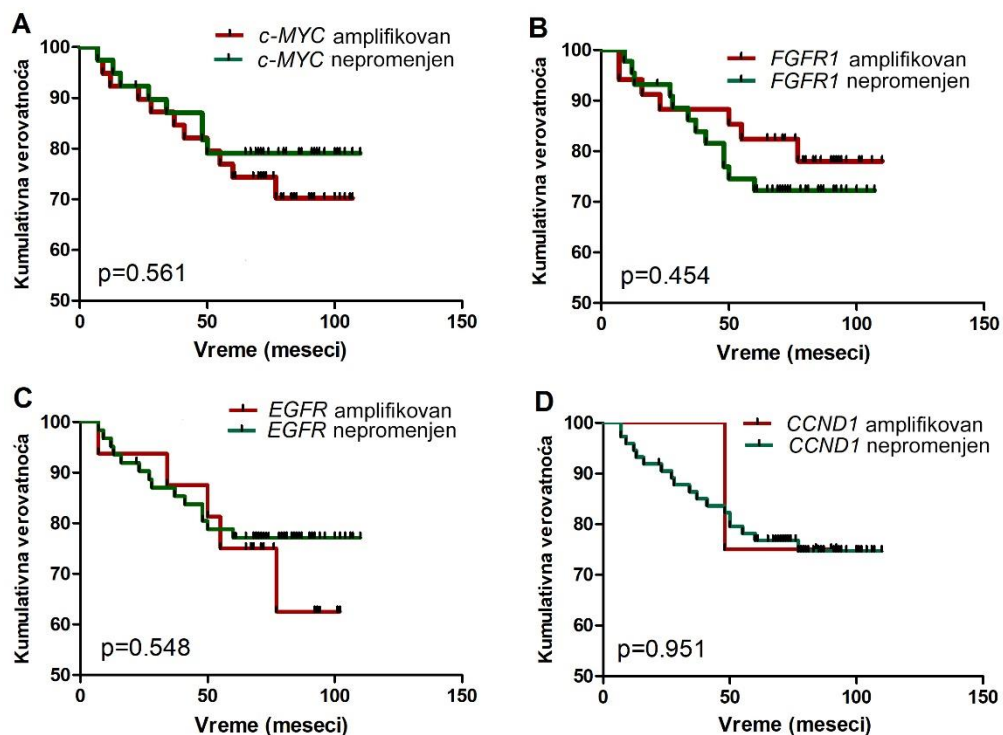
Klinički i histopatološki parametri	<i>CCND1/FGFR1</i> amplifikacija br (%)			<i>CCND1/EGFR</i> amplifikacija br (%)		
	<i>Ne</i> 30 (65)	<i>Da</i> 6 (13)	<i>p</i> <i>vrednost</i>	<i>Ne</i> 30 (65)	<i>Da</i> 5 (11)	<i>p</i> <i>vrednost</i>
<b>Godine u trenutku dijagnoze</b>						
<50	9 (30)	2 (34)	1.000	9 (30)	1 (20)	1.000
≥50	21 (70)	4 (66)		21 (70)	4 (80)	
<b>Tip tumora</b>						
Duktalni	12 (40)	3 (50)	<i>p</i> <sup>A</sup> 1.000	12 (40)	2 (40)	<i>p</i> <sup>A</sup> 1.000
Lobularni	16 (53)	3 (50)	<i>p</i> <sup>B</sup> 1.000	15 (50)	3 (60)	<i>p</i> <sup>B</sup> 1.000
Drugi*	2 (7)	0 (0)	<i>p</i> <sup>C</sup> 1.000	3 (10)	0 (0)	<i>p</i> <sup>D</sup> 1.000
<b><i>p</i>TNM stadijum**</b>						
I	7 (26)	0 (0)	<i>p</i> <sup>1</sup> 0.272	8 (31)	0 (0)	<i>p</i> <sup>1</sup> 0.257
II	12 (44)	5 (83)	<i>p</i> <sup>2</sup> 0.379	11 (42)	4 (80)	<i>p</i> <sup>2</sup> 0.621
III	8 (3)	1 (17)	<i>p</i> <sup>3</sup> 1.000	7 (27)	1 (20)	<i>p</i> <sup>3</sup> 1.000
<b><i>p</i>T stadijum***</b>						
T1	13 (46)	1 (17)	0.364	14 (52)	1 (20)	0.338
T2	15 (54)	5 (83)		13 (48)	4 (80)	
<b><i>p</i>N stadijum**</b>						
Negative	11 (41)	2 (34)	1.000	12 (46)	2 (40)	1.000
Pozitive	16 (59)	4 (66)		14 (54)	3 (60)	
<b>Histološki gradus</b>						
I i II	28 (93)	5 (83)	0.431	30 (100)	4 (80)	0.143
III	2 (7)	1 (17)		0 (0)	1 (10)	
<b><i>HER2</i> status</b>						
Pozitivan	11 (37)	4 (66)	0.210	8 (27)	3 (60)	0.297
Negativan	19 (63)	2 (34)		22 (73)	2 (40)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi; \*-tubularni, mucinozni i drugi retki tipovi karcinoma dojke; \*\*- podaci nisu dostupni za četiri uzorka; \*\*\*- podaci nisu dostupni za tri uzorka *p*<sup>A</sup> – statistička značajnost između duktalnih i lobularnih tumora, *p*<sup>B</sup> – statistička značajnost između duktalnih i retkih tumora, *p*<sup>C</sup> – statistička značajnost između lobularnih i retkih tumora, *p*<sup>1</sup> – statistička značajnost između stadijuma I i II; *p*<sup>2</sup> – statistička značajnost između stadijuma II i III; *p*<sup>3</sup> – statistička značajnost između stadijuma I i III  
Bold označava statistički značajne vrednosti, *p* < 0.05.

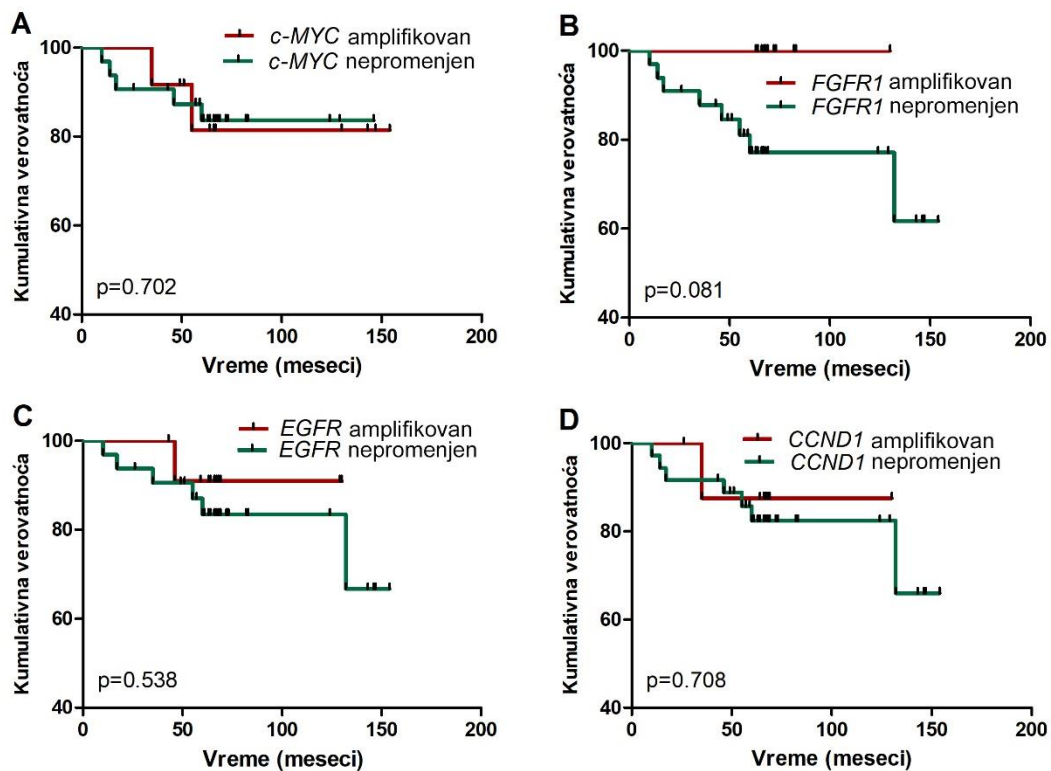
### 4.3.3 Uticaj amplifikacionog statusa *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* gena na ukupno preživljavanje obolelih od karcinoma dojke

U ovoj studiji analiziran je i uticaj alteracija u broju kopija ispitanih onkogeni na ukupno preživljavanje bolesnica u obe grupe malignih tumora dojke, TNBC i ER+ grupi. Utvrđeno je da amplifikacije *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* onkogeni ne utiču na stopu ukupnog preživljavanja obolelih od trostruko negativnih i hormonski zavisnih tumora dojke. Naime, ni jedan od zasebno ispitanih onkogeni, u TNBC grupi, nije imao uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica (**Slika 4.9**). Isti nalaz, odsustvo uticaja zasebno amplifikovanih onkogeni na ukupno preživljavanje bolesnica, detektovan je i u grupi ER+ tumora (**Slika 4.10**).

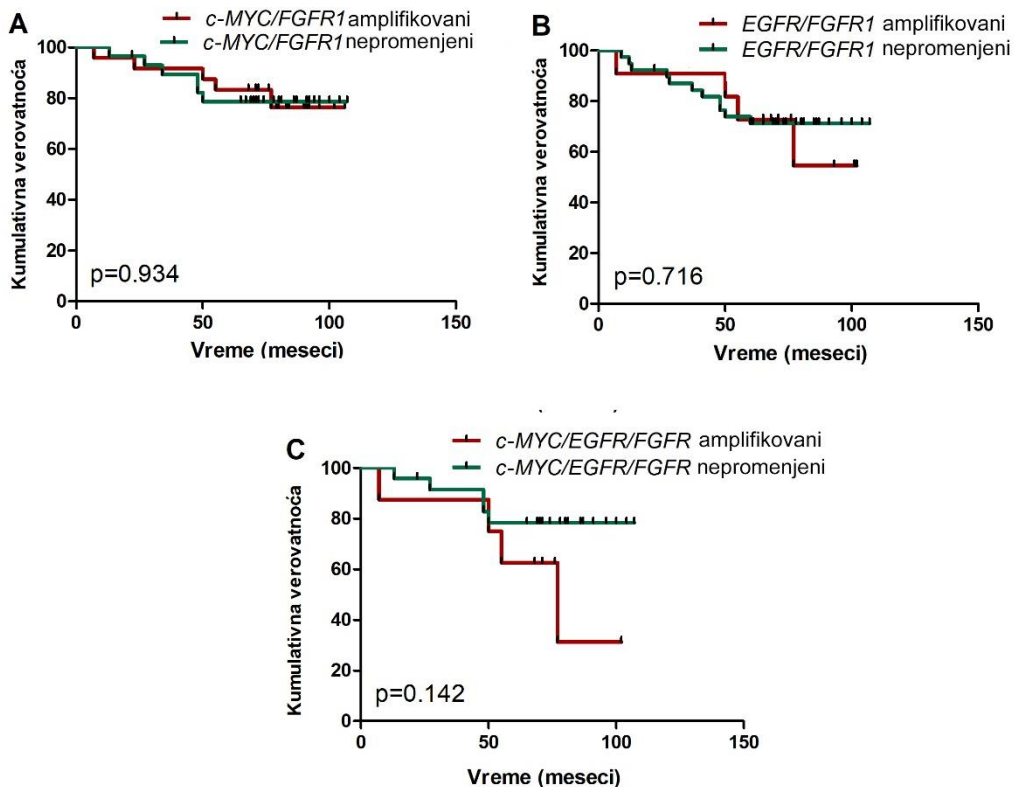
Ko-alteracije onkogeni u TNBC grupi nisu pokazale statistički značajan efekat na ukupno preživljavanje bolesnica. Bolesnice sa istovremenom amplifikacijom *FGFR1*, *c-MYC* i *EGFR* onkogeni u TNBC grupi, imale su najlošije ukupno preživljavanje, mada registrovana razlika nije dostigla statističku značajnost (**Slika 4.11**). Slično ovom, ko-alteracije u broju kopija analiziranih onkogeni nisu imale uticaja ni na ukupno preživljavanje bolesnica u grupi ER+ karcinoma dojke (**Slika 4.12**).



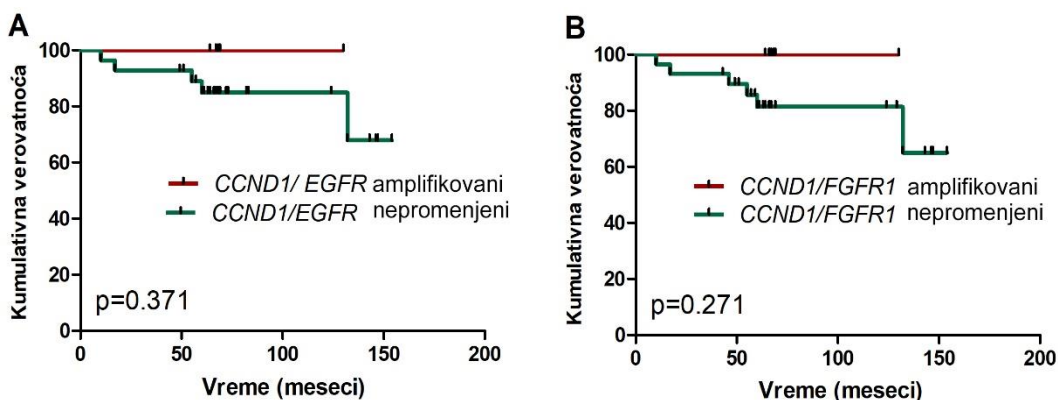
**Slika 4.9.** Kaplan–Meier krive preživljavanja. **Uticaj alternacija u broju kopija *c-MYC*, *FGFR1* i *EGFR* onkogenena na ukupno preživljavanje bolesnica u TNBC grupi:** **A** Amplifikacija *c-MYC* onkogenena nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica, **B** Amplifikacija *FGFR1* onkogenena nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica, **C** Amplifikacija *EGFR* onkogenena nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica, **D** Amplifikacija *CCND1* onkogenena nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica.



**Slika 4.10.** Kaplan–Meier krive preživljavanja. **Uticaj alternacija u broju kopija *c-MYC*, *FGFR1*, *EGFR* i *CCND1* onkogeni na ukupno preživljavanje bolesnica u ER+ grupi:** **A** Amplifikacija *c-MYC* onkogeni nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica, **B** Bolesnice sa amplifikacijom *FGFR1* onkogeni imaju tendenciju ka boljem ukupnom preživljavanju, **C** Amplifikacija *EGFR* onkogeni nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica, **D** Amplifikacija *CCND1* onkogeni nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica.



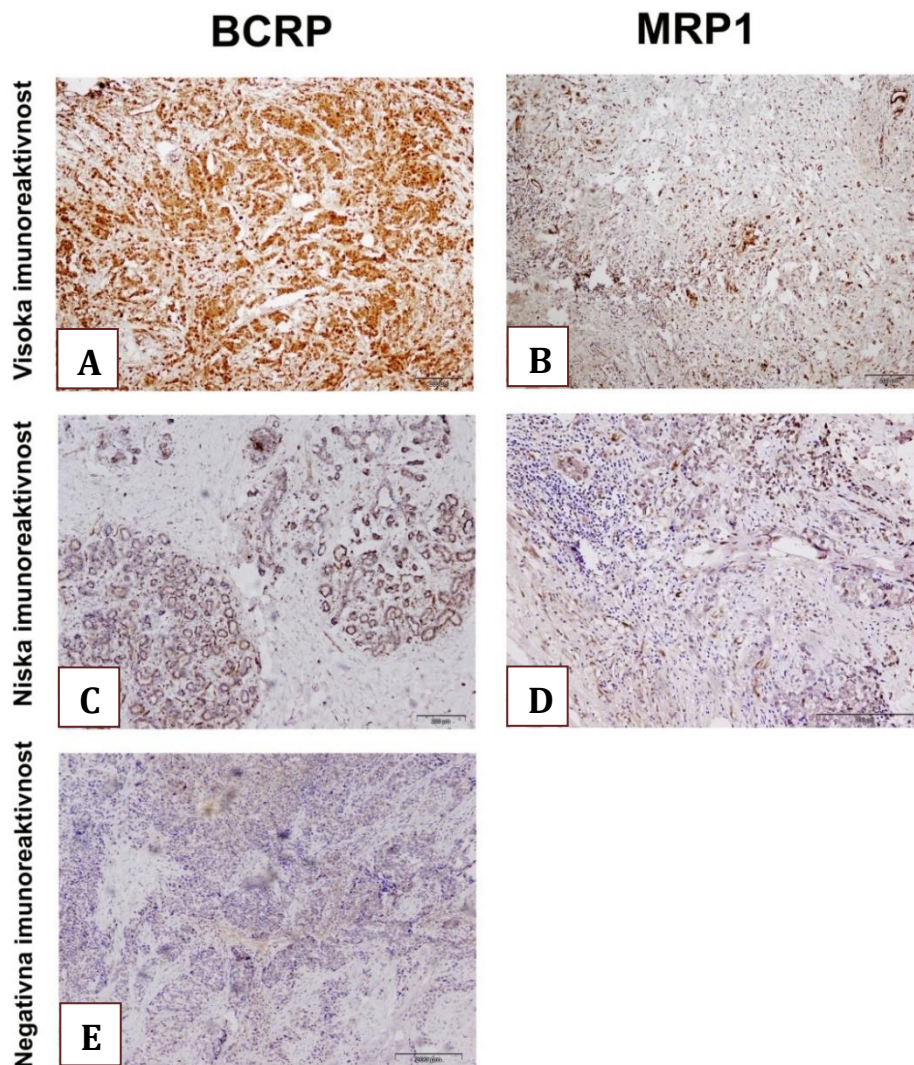
**Slika 4.11.** Kaplan–Meier krive preživljavanja. **Uticaj ko-alteracija u broju kopija *c-MYC*, *FGFR1* i *EGFR* onkogen na ukupno preživljavanje bolesnica u TNBC grupi:** **A** Ko-amplifikacija *c-MYC/FGFR1* onkogen nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica, **B** Ko-amplifikacija *EGFR/FGFR1* onkogen nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica, **C** Bolesnice sa istovremenom amplifikacijom sva tri onkogen imaju tendenciju ka lošijem ukupnom preživljavanju.



**Slika 4.12.** Kaplan–Meier krive preživljavanja. **Uticaj ko-alteracija u broju kopija *CCND1*, *c-MYC*, *FGFR1* i *EGFR* onkogen na ukupno preživljavanje bolesnica u ER+ grupi.** **A** Ko-amplifikacija *CCND1/EGFR* onkogen nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica, **B** Ko-amplifikacija *CCND1/FGFR1* onkogen nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica.

## 4.4 Analiza ekspresije BCRP i MRP1 proteina u karcinomima dojke i zdravom tkivu dojke

U ovom doktorskom radu ispitana je i analizirana ekspresija dva membranska transportera – BCRP i MRP1, u maligno transformisanom i u zdravom tkivu dojke sa posebnim fokusom na grupu trostruko negativnih tumora. Ekspresija ovih proteina utvrđena je semikvantitativnom imunohistohemijском metodom, IHC (Slika 4.13).



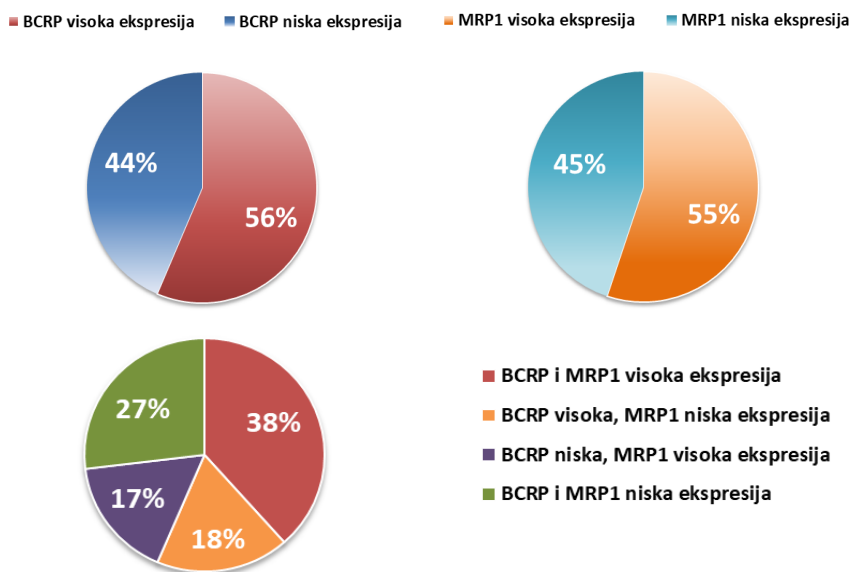
**Slika 4.13. Imunohistochemijska analiza ekspresije BCRP i MRP1 proteina.**

Reprezentativni primeri: **A** Visoka imunoreaktivnost BCRP u TNBC tkivu (100X), **B** Visoka imunoreaktivnost MRP1 u TNBC tkivu (100X), **C** Niska imunoreaktivnost BCRP u zdravom tkivu dojke (100X), **D** Niska imunoreaktivnost MRP1 u ER+ tkivu (200X), **E** Negativna imunoreaktivnost BCRP u ER+ tkivu (100X).

Ekspressionom analizom je utvrđeno da su oba membranska transportera, BCRP i MRP1 eksprimirana kod svih 78 analiziranih uzoraka TNBC-a. Nivoi ekspresije BCRP-a i MRP1 kod različitih uzoraka u okviru pomenute tumorske grupe razlikovali su se. Tako je, niska ekspresija BCRP-a sa ukupnim skorom 6, detektovana kod 34 (44%) uzoraka, a niska ekspresija MRP1 istog skora kod 35 (45%) uzoraka (**Slika 4.14**). Ekspresija visokog skora, skor 7 i 8, za protein BCRP je detektovana kod 44 (56%), a za protein MRP1 kod 43 (55%) uzoraka TNBC tumora (**Slika 4.14**).

Analizom ko-ekspresije, odnosno simultane ekspresije oba transportera, u ukupnom uzorku trostruko negativnih tumora:

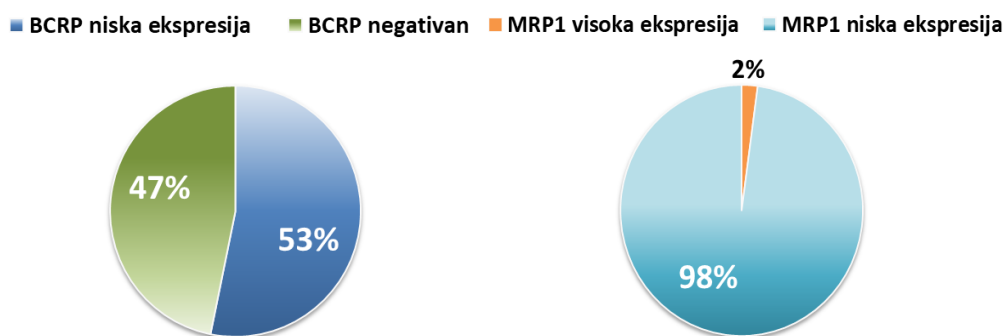
- visok ekspresioni skor (7 i 8) oba transportera detektovan je kod ukupno 30 (38%) uzoraka,
- visok skor za BCRP uz istovremeno nizak za MRP1 detektovan je kod 14 (18%) uzoraka,
- visok skor za MRP1 uz istovremeno nizak za BCRP detektovan je kod 13 (17%) uzoraka i
- nizak skor (6) oba transportera detektovan je kod 21 (27%) uzoraka (**Slika 4.14**).



**Slika 4.14.** Ekspresija BCRP i MRP1 proteina u TNBC tumorima.

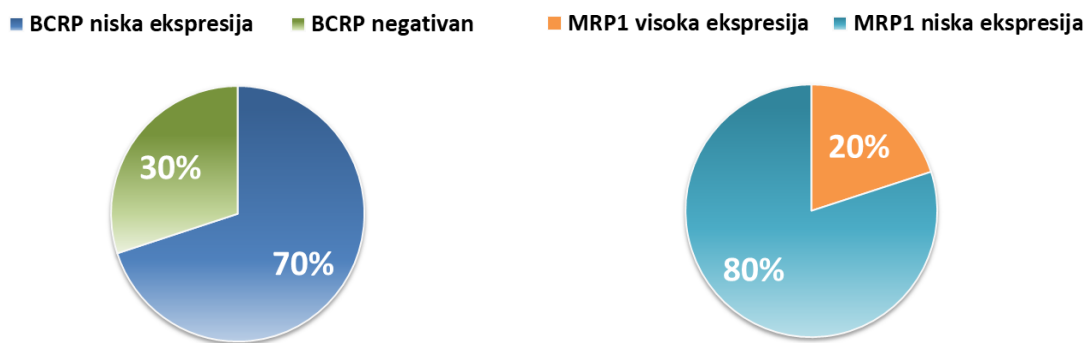


Analiza ekspresije dva membranska transportera – BCRP i MRP1, urađena je i za drugu grupu malignih tumora dojke – za 46 uzoraka hormonski zavisnih tumora. Dobijeni rezultati pokazuju da ekspresija BCRP transportera odsustvuje ili je izrazito niska, skor 2 i 3, kod 21 (47%) uzoraka. Istovremeno, niska ekspresija BCRP-a ukupne vrednosti skora 4 i 5 detektovana je kod 25 (53%) uzoraka. U ER+ grupi tumora dojke nijedan uzorak nije pokazao visoku ekspresiju BCRP transportera. Ekspresija drugog, MRP1 transportera u grupi ER+ tumora bila je uniformno niska, sa vrednošću ukupnog skora od 4 do 6 i detektovana je kod ukupno 45 (98%) uzoraka. Kod samo jednog uzorka iz ove grupe detektovana je visoka ekspresija MRP1 proteina – ukupni skor 7 (**Slika 4.15**).



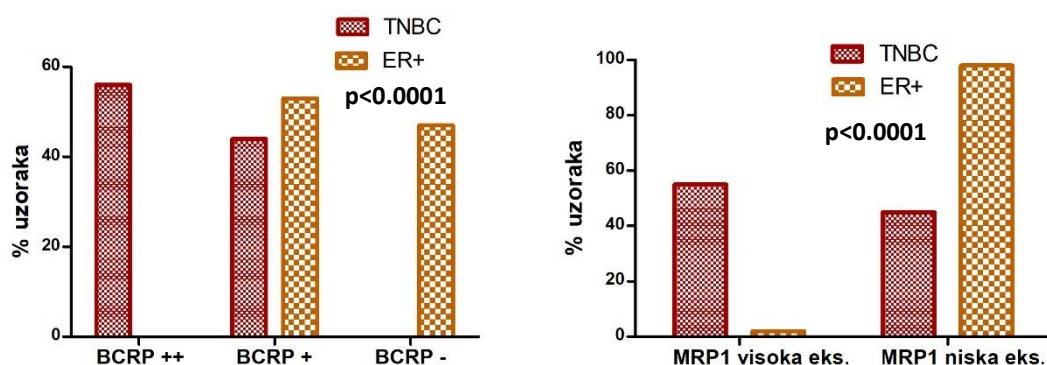
**Slika 4.15.** Ekspresija BCRP i MRP1 proteina u ER+ tumorima.

Ekspresionom analizom transportera u 10 kontrolnih uzoraka zdravog tkiva dojke utvrđeno je da vrednost ukupnog skora za BCRP kod većine uzoraka, 7 (70%), iznosi 4 ili 5 dok je skor kod preostalih uzoraka, 3 (30%), bio 2 ili 3. Dakle, BCRP je u kontrolnom uzorku bio nisko eksprimiran ili neeksprimiran. Ekspresiona analiza MRP1 transportera za iste kontrolne uzorke pokazuje da većina, 8 (80%), ima nisku ekspresiju, odnosno vrednost ukupnog skora 5 ili 6. Kod 2 (20%) uzoraka detektovana je visoka ekspresija MRP1 proteina u kontrolnom uzorku, vrednost skora 7 i 8 (**Skila 4.16**).

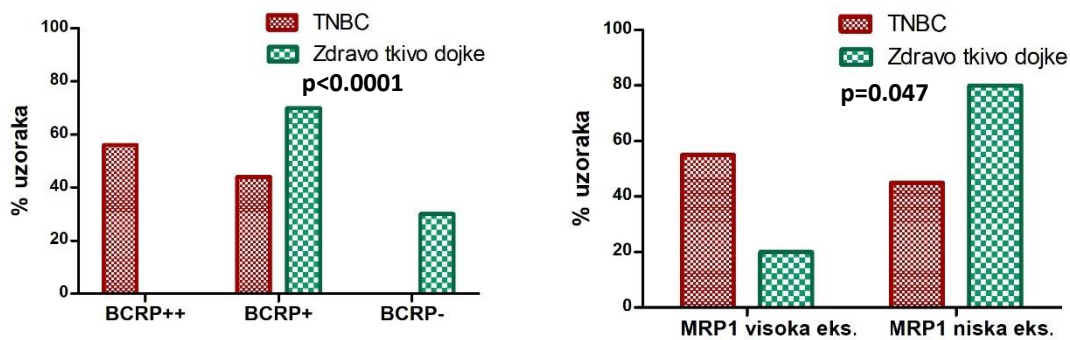


**Slika 4.16.** Ekspresija BCRP i MRP1 proteina u zdravom tkivu dojke.

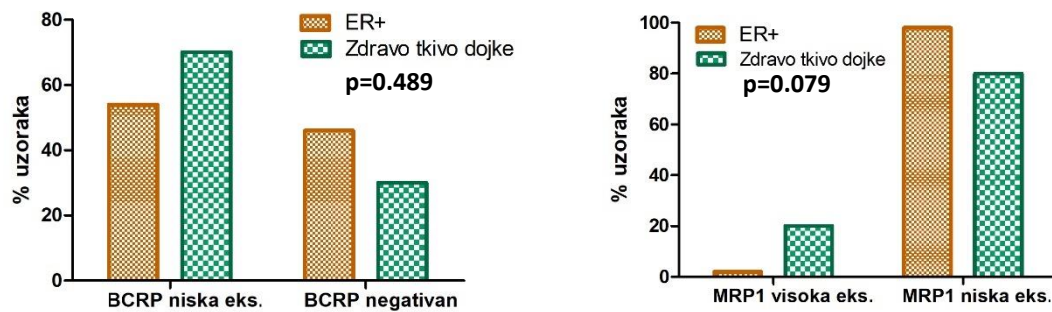
Obradom dobijenih rezultata, pokazamo je da je nivo ekspresije BCRP transportera kod trostruko negativnih tumora, statistički značajno viši nego kod hormonski zavisnih tumora (*Fisher-ov test sa Freeman-Halton ekstenzijom*,  $p < 0.0001$ ) (**Slika 4.17**) i kontrolnih uzoraka iz zdravog tkiva dojke (*Fisher-ov test sa Freeman-Halton ekstenzijom*,  $p < 0.0001$ ) (**Slika 4.18**). Isti nalaz, statistički značajno viša ekspresija, dobijen je i za MRP1 protein kod TNBC u odnosu na ER+ (*Fisher-ov test*,  $p < 0.0001$ ) (**Slika 4.17**) i kontrolnu grupu (*Fisher-ov test*  $p < 0.047$ ) (**Slika 4.18**). Suprotno ovom, rezlike u ekspresiji oba transportera, BCRP i MRP1, između ER+ karcinoma dojke i zdravog tkiva dojke, nisu uočene (**Slika 4.19**).



**Slika 4.17.** Povezanost između nivoa ekspresije BCRP i MRP1 proteina i tipa karcinoma dojke, ++ visoka ekspresija, + niska ekspresija, - nepostojeća ekspresija.

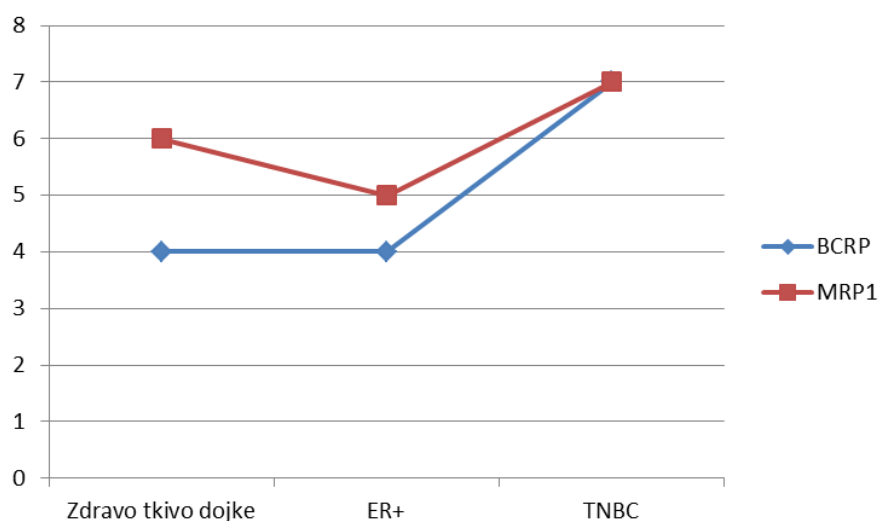


**Slika 4.18.** Povezanost između nivoa ekspresije BCRP i MRP1 proteina i tipa tkiva dojke, ++ visoka ekspresija, + niska ekspresija, - nepostojeća ekspresija.



**Slika 4.19.** Povezanost između nivoa ekspresije BCRP i MRP1 proteina i tipa tkiva dojke.

Poređenjem medijana ekspresije BCRP i MRP1 proteina kod tri grupe uzoraka, TNBC, ER+ i zdravog tkiva dojke, jasno se uočava da je nivo ekspresije oba analizirana proteina najviši u TNBC grupi karcinoma kao i da je nivo ekspresije BCRP proteina u grupi ER+karcinoma identičan nivou ekspresije u kontrolnoj grupi. Poređenjem medijana zapaža se i da je nivo ekspresije MRP1 proteina najniži u grupi ER+ karcinomima. Takođe, pada u oči da je u dve grupe, grupi ER+ tumora i kontrolnih uzoraka, nivo ekspresije BCRP-a niži od nivoa ekspresije MRP1. Suprotno tome, nivoi ekspresije ova dva transportera kod trostruko negativnih tumora dojke su, iz prikazanih medijana, evidentno isti (**Slika 4.20**).



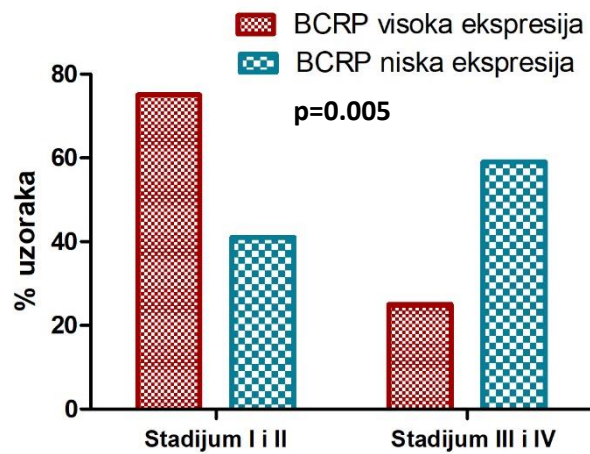
**Slika 4.20.** Medijana ekspresije BCRP i MRP1 proteina u zdravom tkivu dojke, ER+ i TNBC karcinomima dojke.

#### 4.4.1 Povezanost ekspresije BCRP i MRP1 proteina sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC i ER+ karcinoma dojke

Ekspresione analize membranskih transportera, omogućile su stratifikaciju tumora dojke prema nivou njihove ekspresije i dalju analizu povezanosti ekspresionog profila BCRP i MRP1 proteina sa relevantnim kliničkim i histopatološkim parametrima u obe grupe malignih tumora dojke.

Poređenjem ekspresionog profila transportera i kliničko-histopatoloških parametara u TNBC grupi, zapažena je statistički značajna povezanost između visoke ekspresije BCRP-a i niskog stadijuma, pTNM I i II, trostruko negativnih tumora (*Fisher-ov test, p=0.005*) (**Slika 4.21**). Istovremeno, kod obolelih sa visokom ekspresijom BCRP proteina, uočena je smanjena invazivnost TNBC tumora u lokalne limfne čvorove – statistički trend (*Fisher-ov test, p=0.06*) (**Tabela 4.20**). Asocijacije između nivoa ekspresije BCRP proteina i drugih kliničko-histopatoloških parametara TNBC tumora (veličina tumora, starost bolesnika, histološki podtip i histološki gradus tumora) nisu detektovane (**Tabela 4.20**). Takođe, nije detektovana ni statistički značajna povezanost između nivoa

ekspresije MRP1 proteina i relevantnih kliničkih i histopatoloških parametara TNBC tumora (**Tabela 4.20**).



**Slika 4.21.** Povezanost između nivoa ekspresije BCRP proteina i pTNM stadijuma tumora u TNBC grupi.

**Tabela 4.20:** Povezanost kliničkih i histopatoloških parametara TNBC tumora sa profilom ekspresije BCRP i MRP1 proteina

Klinički i histopatološki parametri	BCRP ekspresija br (%)			MRP1 ekspresija br (%)		
	Niska 34 (44)	Visoka 44 (56)	<i>p</i> vrednost	Niska 35 (45)	Visoka 43 (55)	<i>p</i> vrednost
<b>Godine u trenutku dijagnoze</b>						
<50	10 (29)	11 (25)	0.798	11 (31)	10 (23)	0.452
≥50	24 (71)	33 (75)		24 (69)	33 (77)	
<b>Tip tumora</b>						
Duktalni	24 (70)	23 (53)	<i>p</i> <sup>A</sup> 1.000	23 (66)	24 (56)	<i>p</i> <sup>A</sup> 0.236
Lobularni	5 (15)	9 (20)	<i>p</i> <sup>B</sup> 0.372	4 (11)	10 (23)	<i>p</i> <sup>B</sup> 0.228
Medularni	3 (9)	11 (25)	<i>P</i> <sup>C</sup> 0.068	5 (14)	9 (21)	<i>P</i> <sup>C</sup> 0.543
Drugi*	2 (6)	1 (2)	<i>p</i> <sup>D</sup> 0.678	3 (9)	0 (0)	<i>p</i> <sup>D</sup> 1.000
			<i>p</i> <sup>E</sup> 0.537			<i>p</i> <sup>E</sup> 0.052
			<i>p</i> <sup>F</sup> 0.191			<i>p</i> <sup>F</sup> 0.082
<b><i>p</i>TNM stadijum</b>						
I i II	14 (41)	33 (75)	<b>0.005</b>	18 (52)	29 (67)	0.169
III i IV	20 (59)	11 (25)		17 (48)	14 (33)	
<b><i>p</i>T stadijum</b>						
T1 i T2	28 (82)	40 (91)	0.317	31 (88)	37 (86)	1.000
T3 i T4	6 (28)	4 (8)		4 (12)	6 (14)	
<b><i>p</i>N stadijum</b>						
Negative	13 (38)	27 (61)	0.06	17 (49)	23 (53)	0.82
Pozitive	21 (62)	17 (39)		18 (51)	20 (47)	
<b>Histološki gradus</b>						
I i II	24 (71)	28 (64)	0.63	24 (69)	28 (65)	0.812
III	10 (29)	16 (36)		11 (31)	15 (35)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi; \*-tubularni, mucinozni i drugi retki tipovi karcinoma dojke;

*p*<sup>A</sup> – statistička značajnost između duktalnih i retkih tumora; *p*<sup>B</sup> – statistička značajnost između duktalnih i lobularnih tumora; *p*<sup>C</sup> – statistička značajnost između duktalnih i medularnih tumora; *p*<sup>D</sup> – statistička značajnost između lobularnih i medularnih tumora; *p*<sup>E</sup> – statistička značajnost između lobularnih i retkih tumora; *p*<sup>F</sup> – statistička značajnost između medularnih i retkih tumora

Bold označava statistički značajne vrednosti, *p* < 0.05.

Poređenjem ekspresionog profila membranskih transportera, BCRP i MRP1, sa amplifikacionim statusom odabrane grupe onkogeno, *c-MYC*, *EGFR*, *CCND1* i *FGFR1*, u TNBC grupi, nije uočeno postojanje asocijacija (**Tabela 4.21**).

**Tabela 4.21:** Povezanost profila ekspresije BCRP i MRP1 proteina i amplifikacionog statusa *c-MYC*, *FGFR1*, *EGFR* i *CCND1* onkogeno u TNBC

Ispitivani geni	BCRP ekspresija			MRP1 ekspresija		
	br (%)		<i>p</i> vrednost	br (%)		<i>p</i> vrednost
	Niska	Visoka		Niska	Visoka	
	34 (44)	44 (56)		35 (45)	43 (55)	
<b><i>c-MYC</i></b> <b>amplifikacija</b>						
Da	17 (50)	22 (50)	1.000	17 (49)	22 (51)	1.000
Ne	17 (50)	22 (50)		18 (51)	21 (49)	
<b><i>FGFR1</i></b> <b>amplifikacija</b>						
Da	13 (38)	21 (48)	0.492	14 (40)	20 (47)	0.649
Ne	21 (72)	23 (52)		21 (60)	23 (53)	
<b><i>EGFR</i></b> <b>amplifikacija</b>						
Da	8 (24)	8 (18)	0.584	8 (23)	8 (19)	0.779
Ne	26 (76)	36 (82)		27 (77)	35 (81)	
<b><i>CCND1</i></b> <b>amplifikacija</b>						
Da	1 (3)	3 (7)	0.628	1 (3)	3 (7)	0.623
Ne	33 (97)	41 (93)		34 (97)	40 (93)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

U grupi hormonski zavisnih (ER+) tumora dojke nije detektovana nikakva povezanost između ekspresionog profila (nivoa ekspresije) BCRP transportera i kliničkih i histopatoloških parametara ovih tumora (**Tabela 4.22**).

**Tabela 4.22:** Povezanost kliničkih i histopatoloških parametara ER+ tumora sa profilom ekspresije BCRP proteina

Klinički i histopatološki Parametri	BCRP ekspresija br (%)		
	Negativna 21 (44)	Niska 25 (56)	<i>p</i> vrednost
<b>Godine u trenutku dijagnoze</b>			
<50	6 (29)	7 (28)	1.000
≥50	15 (71)	18 (72)	
<b>Tip tumora</b>			
Duktalni	11 (52)	11 (44)	<i>p</i> <sup>A</sup> 1.000
Lobularni	8 (38)	13 (52)	<i>p</i> <sup>B</sup> 0.543
Drugi*	2 (10)	1 (4)	<i>p</i> <sup>C</sup> 0.247
<b><i>p</i>TNM stadijum**</b>			
I i II	12 (67)	18 (75)	0.732
III	6 (33)	6 (25)	
<b><i>p</i>T stadijum***</b>			
T1	7 (37)	12 (50)	0.538
T2	12 (63)	12 (50)	
<b><i>p</i>N stadijum**</b>			
Negative	6 (33)	12 (50)	0.353
Pozitive	12 (67)	12 (50)	
<b>Histološki gradus</b>			
I i II	20 (95)	23 (92)	1.000
III	1 (5)	2 (7)	
<b>HER2 status</b>			
Pozitivan	7 (33)	11 (44)	0.551
Negativan	14 (67)	14 (56)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi; \*-tubularni, mucinozni i drugi retki tipovi karcinoma dojke; \*\*- podaci nisu dostupni za četiri uzorka; \*\*\*- podaci nisu dostupni za tri uzorka *p*<sup>A</sup> – statistička značajnost između duktalnih i lobularnih tumora; *p*<sup>B</sup> – statistička značajnost između duktalnih i retkih tumora, *p*<sup>C</sup> – statistička značajnost između lobularnih i retkih tumora,

**Bold** označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .



Istovremeno, izrazito niska vrednost koeficijenta korelacije ekspresije MRP1 transportera sa ordinalnim kliničkim i histopatološkim parametrima ER+ tumora (godine u trenutku dijagnoze, pTNM stadijum, veličina tumora, status limfnih čvorova, histološki gradus), pokazuje da statistički značajnih korelacija nema (**Tabela 4.23**).

**Tabela 4.23:** Korelacija kliničkih i histopatoloških parametara ER+ tumora sa ekspresijom MRP1 proteina

Klinički i histopatološki parametri	Broj uzoraka	Koeficijent korelacije, Ro	p vrednost
<i>Godine u trenutku dijagnoze</i>	46	0.083	0.585
<i>pTNM stadijum</i>	42	0.072	0.648
<i>pT stadijum</i>	43	0.237	0.125
<i>pN stadijum</i>	42	-0.067	0.671
<i>Histološki gradus</i>	46	-0.152	0.312

*Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .*

Takođe, poređenjem ekspresionog profila BCRP i MRP1 proteina sa amplifikacionim statusom četiri onkogeni, *c-MYC*, *FGFR1*, *EGFR* i *CCND1* u grupi ER+ tumora, statistički značajne asocijacije nisu detektovane (**Tabela 4.24**).

**Tabela 4.24:** Povezanost profila ekspresije BCRP i MRP1 proteina i amplifikacionog statusa *c-MYC*, *FGFR1*, *EGFR* i *CCND1* onkogeni u ER+ tumorima

Ispitivani geni	BCRP ekspresija			MRP1 ekspresija		
	br (%)		<i>p</i> vrednost	br (%)		<i>p</i> vrednost
	<i>Negativna</i> 21 (44)	<i>Niska</i> 25 (56)		<i>Niska</i> 45 (98)	<i>Visoka</i> 1 (2)	
<b><i>c-MYC</i></b>						
<b><i>amplifikacija</i></b>						
Da	6 (29)	7 (28)	1.000	13 (29)	0 (0)	1.000
Ne	15 (71)	18 (72)		32 (71)	1 (100)	
<b><i>FGFR1</i></b>						
<b><i>amplifikacija</i></b>						
Da	4 (19)	8 (32)	0.502	12 (27)	0 (0)	1.000
Ne	17 (81)	17 (68)		33 (73)	1 (100)	
<b><i>EGFR</i></b>						
<b><i>amplifikacija</i></b>						
Da	5 (24)	7 (28)	1.000	12 (27)	0 (0)	1.000
Ne	16 (76)	18 (82)		33 (73)	1 (100)	
<b><i>CCND1</i></b>						
<b><i>amplifikacija</i></b>						
Da	3 (14)	6 (24)	0.478	9 (20)	0 (0)	1.000
Ne	18 (86)	19 (76)		36 (80)	1 (100)	

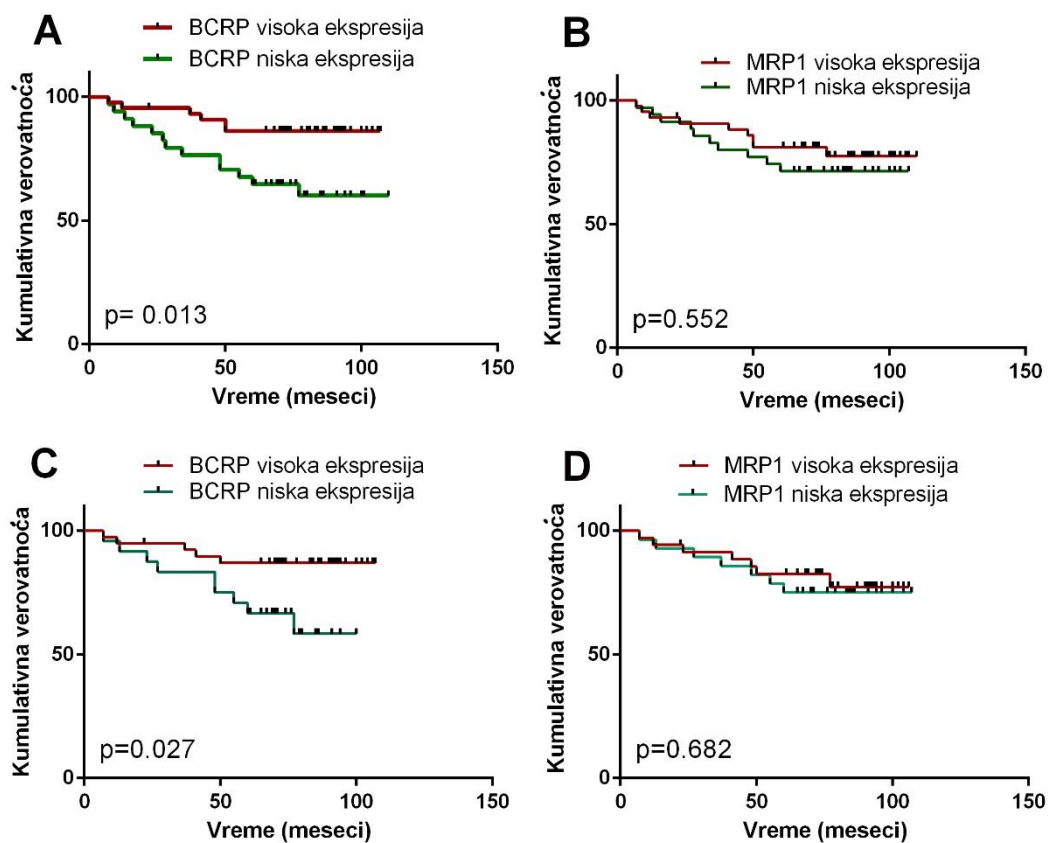
Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Bold označava statistički značajne vrednosti,  $p < 0.05$ .

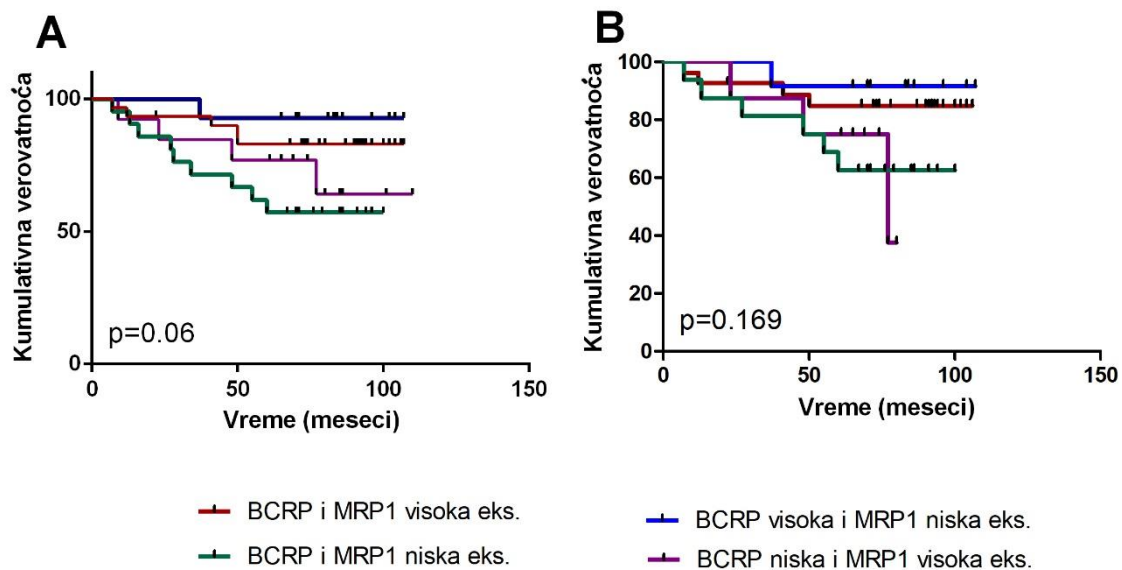
#### 4.4.2 Uticaj ekspresije BCRP i MRP1 proteina na ukupno preživljavanje obolelih od karcinoma dojke

U ovoj studiji ispitan je i efekat ekspresije BCRP i MRP1 proteina na ukupno preživljavanje obolelih u dve grupe malignih tumora dojke.

U TNBC grupi, detektovana je statistički značajna povezanost između nivoa ekspresije BCRP-a i ukupnog preživljavanja bolesnica, odnosno utvrđeno je da bolesnice sa visokom ekspresijom BCRP proteina imaju bolju prognozu (*Log-rank test,  $p=0.013$* ) (**Slika 4.22**). Nalazi su takođe, pokazali da ekspresija MRP1 proteina ne utiče na stopu preživljavanja obolelih u TNBC grupi (**Slika 4.22**). Isti trend ukupnog preživljavanja u odnosu na ekspresioni profil BCRP i MRP1, pokazuje i podgrupa bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke koja je bila podvrgnuta hemioterapiji (81%) (**Slika 4.22**). Naime, bolesnica iz ove podgrupe, sa visoko eksprimiranim BCRP proteinom, imale su statistički značajno bolju prognozu (*Log-rank test,  $p=0.027$* ), dok ekspresioni profil MRP1 proteina nije imao nikakav efekat na ukupno preživljavanje. Na kraju, utvrđeno je da u TNBC grupi najbolje, ukupno preživljavanje imaju bolesnice kod kojih je detektovana, istovremeno, visoka ekspresija BCRP i niska ekspresija MRP1 (**Slika 4.23**).

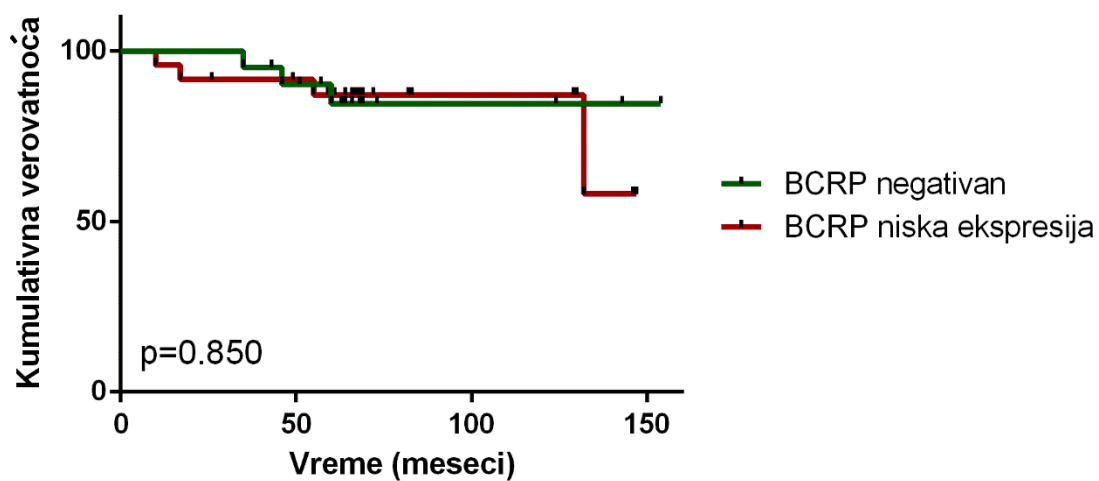


**Slika 4.22.** Kaplan–Meier krive preživljavanja. **Uticaj nivoa ekspresije BCRP i MRP1 na ukupno preživljavanje bolesnica u TNBC grupi.** **A** Bolesnice sa visokom ekspresijom BCRP proteina imaju značajno bolje ukupno preživljavanje. **B** Nivo ekspresije MRP1 proteina nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica. **C** Bolesnice sa visokom ekspresijom BCRP proteina koje su bile podvrgnute hemioterapiji imaju značajno bolje ukupno preživljavanje. **D** Nivo ekspresije MRP1 proteina nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica podvrgnutih hemioterapiji.



**Slika 4.23.** Kaplan–Meier krive preživljavanja. **Uticaj profila ko-ekspresije BCRP i MRP1 na ukupno preživljavanje bolesnica u TNBC grupi.** **A** Bolesnice sa visokom ekspresijom BCRP i niskom ekspresijom MRP1 proteina imaju najbolje ukupno preživljavanje. **B** Bolesnice sa visokom ekspresijom BCRP i niskom ekspresijom MRP1 proteina imaju najbolje ukupno preživljavanje i u podgrupi podvrgnutoj hemioterapiji.

U grupi ER+ tumora, nivo ekspresija BCRP proteina nije imao uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica (**Slika 4.24**). Budući da je samo jedan uzorak iz ove grupe tumora imao visoku ekspresiju MRP1 proteina, dok su svi ostali pokazivali uniformno nisku, pouzdanu analizu preživljavanja za ovaj transporter, u ER+ grupi, nije bilo moguće izvršiti.



**Slika 4.24.** Kaplan–Meier krive preživljavanja. **Uticaoj nivoa ekspresije BCRP na ukupno preživljavanje bolesnica u ER+ grupi.** Nivo ekspresije BCRP nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnica.

## 5. Diskusija

---

Epidemiološke studije pokazuju da je karcinom dojke najčešće maligno oboljenje kod žena i vodeći uzročnik smrti od maligniteta u populaciji žena na globalnom nivou (Jemal i sar., 1999; Parkin, 2004). Karcinom dojke je kompleksna i izuzetno heterogena bolest čija je geneza vezana za brojne genetičke i sredinske faktore. Izrazita heterogenost glavni je razlog što se maligni tumori dojke, danas klasifikuju u više od petnaest histoloških podtipova (Malhotra i sar., 2014). Jasno definisanje histološkog podtipa daje mogućnost izbora pravog terapijskog protokola i predikcije toka i/ili ishoda bolesti. Ishod bolesti, je i pored toga, u mnogim slučajevima, nepredvidljiv što ukazuje na individualnost tumora kao i potrebu da se dodatno rasvetle biološke/genetičke osnove karcinoma dojke.

Kako bi se terapijski pristupi personalizovali, u klasifikaciju karcinoma dojke uvedeni su i dodatni, molekularni kriterijumi, bazirani na praćenju ekspresije odabranog seta većeg broja gena. Pošto analiza ekspresije pomenutog seta gena u većini slučajeva nije moguća, u međunarodnoj kliničkoj praksi se kao surogat za molekularnu klasifikaciju, odnosno definisanje tačnog tipa karcinoma dojke, koristi imunohistohemijska analiza ER, PR i HER2 receptora (Goldhirsch i sar., 2011). Dakle, ovo su najvažniji biološki markeri za izbor terapije i predikciju prognoze karcinoma dojke u klinici danas. Na osnovu ekspresije ovih markera, maligne tumore dojke delimo u dve grupe: trostruko negativne (ER-, PR-, HER2-) i hormonski zavisne (ER+) karcinome dojke koji se značajno razlikuju po faktorima rizika, kliničko-patološkim karakteristikama i odgovoru na sistemsku terapiju.

Rezultati naše studije potvrdili su da se TNBC i ER+ tumori dojke jasno razlikuju i po kliničkom ponašanju i po patohistološkim karakteristikama. Naime, utvrđeno je da su TNBC karcinomi u poređenju sa ER+ i veći i agresivniji, odnosno da imaju viši pT i pTNM stadijum, kao i viši histološki gradus.

Istovremeno, iz uporedne analize histoloških podtipova, zaključili smo da se duktalni i medularni karcinomi značajno češće javljaju kod trostruko negativnih, dok je lobularni tip, u našem uzorku, bio češći kod hormonski zavisnih karcinoma

dojke. Ovakav nalaz mogao bi značiti da se određeni histološki podtipovi preferencijalno javljaju u grupi TNBC kao i da se identični histološki podtipovi karcinoma dojke, na genetičkom nivou, ipak razlikuju. Takođe, utvrdili smo da se ukupno preživljavanje bolesnica iz TNBC i ER+ grupe razlikuje, odnosno da obolele od TNBC žive nešto kraće, mada razlika u preživljavanju nije dostigla statističku značajnost.

Naša je prepostavka da osnovu svih detektovanih razlika u karakteristikama, kliničkom ponašanju i ishodu bolesti u dve analizirane grupe malignih tumora dojke, TNBC i ER+, treba tražiti u razlikama koje postoje u njihovom genetičkom materijalu.

Po mišljenju mnogih istraživača, geneza karcinoma dojke je višefazni proces koji podrazumeva postepeni prelaz od zdravog tkiva, preko benigne proliferativne lezije – hiperplazije, karcinoma *in situ* do invazivnog i na kraju metastatskog karcinoma (Shackney i Silverman, 2003). Istraživanja u oblasti molekularne genetike su takođe, pokazala da razvoj i progresija karcinoma dojke može biti posledica brojnih stohastičkih genetičkih i epigenetičkih promena (Simpson i sar., 2005). Ova dva, naizgled različita modela nastaka karcinoma dojke nisu međusobno isključiva, već se, po svemu sudeći, dopunjuju i ukazuju na postojanje različitih mehanizama u njihovoj genezi.

Proces kancerogeneze obuhvata tri osnovne faze: inicijaciju, promociju i progresiju (Pitot, 1993). Smatra se da do inicijacije tumora dolazi usled genetičkih i epigenetičkih lezija u somatskoj ćeliji koja nakupljanjem mutacija postaje genomski nestabilna i priemčljiva za nove mutacije. Genomska nestabilnost je, po svemu sudeći, ključni događaj u kancerogenezi koji omogućava akumulaciju genetičkih promena pre svega u genima koji kontrolišu signalne puteve, proliferaciju i diferencijaciju ćelija. Akumulacija genetičkih i epigenetičkih promena vodi u ekspanziju i selekciju ćelijskog kлона što rezultuje progresijom tumora ka sve agresivnijem fenotipu (Vineis i sar., 2010).

Najčešći tip genetičkih promena u neoplastičnoj transformaciji predstavljaju inaktivacije tumor supresorskih gena i aktivacije onkogeni. Ko-



aktivacija većeg broja onkogeni česta je pojava u karcinomima uključujući i karcinome dojke (Arnold i Papanikolaou, 2005). Jedan od najčešćih mehanizama aktivacije onkogeni jeste njihova amplifikacija. Tako je i amplifikacija četiri onkogeni odabrana za analizu u našoj studiji, *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1*, zapažena kod različitih tumora uključujući i neke karcinome dojke (Kalkat i sar., 2017; Normanno i sar., 2006; Porta i sar., 2017; Qie i Diehl, 2016). Amplifikacija je, ujedno i preferencijalni mehanizam aktivacije navedene grupe onkogeni. Ipak, značaj amplifikacije pomenutih onkogeni u genezi karcinoma dojke i njen efekat na tok i ishod bolesti su i dalje nedovoljno poznati. Ovo se pre svega, odnosi na TNBC. Naime, do danas se veoma mali broj studija bavio analizom amplifikacionog statusa ovih onkogeni u populaciji obolelih od TNBC. I pored toga, genetičke lezije koje uslovljavaju specifične karakteristike TNBC i ER+ karcinoma dojke još uvek nisu jasne. Polazeći od toga, u okviru ove doktorske studije, urađena je uporedna analiza amplifikacionog statusa četiri onkogeni, *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1*, u grupi trostruko negativnih i hormonski zavisnih karcinoma dojke i ispitana je njihova asocijaciju sa svim relevantnim kliničko-histopatološkim parametrima. Dakle, jedan od osnovnih ciljeva ove studije bio je da se utvrdi da li amplifikacija navedenih onkogeni može da se dovede u vezu sa progresijom i ishodom bolesti.

## **5.1 Analiza amplifikacionog statusa *FGFR1*, *c-MYC*, *EGFR* i *CCND1* gena u TNBC i ER+ karcinomima dojke**

Rezultati naših istraživanja pokazuju da je povećan broj kopija *FGFR1* onkogeni po genomu prisutan kod 26% ispitanih ER+ uzoraka. Detektovana učestalost amplifikacije *FGFR1*-a nešto je viša u odnosu na učestalost amplifikacije prijavljene u literaturi (Moelans i sar., 2010; Turner i sar., 2010). Naime, prema podacima iz literature, učestalost amplifikacije ovog onkogeni kreće se između 9% i 23% u ER+ tumorima dojke (Criscitiello i sar., 2017).

Podataka o amplifikaciji *FGFR1* onkogeni kod TNBC-a, u literaturi gotovo da i nema. Autori jedine studija koja se odnosila na amplifikacioni status *FGFR1*

onkogeni u TNBC, navode da učestalost njegove amplifikacije iznosi 4% što je daleko niže od incidence detektovane u našoj studiji (Lee i sar., 2014). Naime, rezultati naših analiza su pokazali da je broj kopija *FGFR1* onkogeni uvećan kod čak 44% uzoraka u TNBC grupi. Jedno od mogućih objašnjenja neslaganja u incidenci detektovane amplifikacije *FGFR1* onkogeni, u našoj i studiji Lee i saradnika, je različit metodološki pristup. Lee i saradnici su analizirali amplifikacioni status *FGFR1* onkogeni FISH-om, dok je amplifikacioni status u našoj studiji određen, daleko osjetljivijim, RT-qPCR-om. Superiornost RT-qPCR metode u odnosu na FISH, potvrdili su svojom studijom Park i saradnici (Park i sar., 2015). Komparativnim ispitivanjem osjetljivosti ovih metoda, Park je uočio da RT-qPCR pokazuje potpunu korelaciju sa FISH-om u slučajevima kada se broj kopija gena po genomu kretao od 8 naviše. Međutim, u slučajevima kada se broj kopija amplifikovanog gena po genomu kretao u opsegu od dva do osam, RT-qPCR je detektovao povećanje dok FISH-om, u istim uzorcima, amplifikacija nije detektovana (Park i sar., 2015). Iz ovog nalaza moglo bi se zaključiti da je RT-qPCR kompetentnija metoda za detekciju broja kopija gena po genomu jer je jednako efikasan u detekciji svih nivoa amplifikacije gena. U grupi TNBC-a koja je RT-qPCR metodom ispitana u našoj studiji, većina uzoraka imala je nizak stepen amplifikacije što predstavlja logično objašnjenje neslaganja između naših i rezultata Lee i saradnika (Lee i sar., 2014).

U našoj studiji nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti amplifikacije *FGFR1* onkogeni u TNBC u odnosu na ER+ grupu karcinoma što sugerira da alteracije u broju kopija *FGFR1* nisu specifične za ove podtipove karcinoma dojke i da najverovatnije, ne doprinose detektovanim razlikama u njihovim karakteristikama.

Podaci iz literature pokazuju da *FGFR1* ima uticaja na tok bolesti obolelih od hormonski zavisnog karcinoma dojke, iako je njegova tačna uloga i dalje kontroverzna. Tako su, Elsheikh i sar. pokazali da je amplifikacija *FGFR1* kod ER+ karcinoma dojke, u asocijaciji sa ranim relapsom i lošijim preživljavanjem. Slično tome, i rezultati Turner i saradnika, dobijeni u *in-vitro* studijama, pokazuju da je amplifikacija *FGFR1* onkogeni povezana sa pojavom rezistencije na hormonsku

terapiju (Elbauomy Elsheikh i sar., 2007; Turner i sar., 2010). Suprotno tome, Tomiguchi i saradnici, amplifikaciju *FGFR1* onkogen ne dovode u vezu sa preživljavanjem bolesnica od ER+ karcinoma dojke (Tomiguchi i sar., 2016). Na isti zaključak, da amplifikovani *FGFR1* onkogen nije u asocijaciji sa preživljavanjem obolelih od hormonski zavisnog tipa karcinoma dojke, navode i rezultati naših analiza.

Iako interesovanje za *FGFR1* onkogen, njegovu ekspresiju i ulogu u trostruko negativnim tumorima dojke, poslednjih nekoliko godina raste, rezultati su još uvek vrlo oskudni i kontradiktorni (Cheng i sar., 2015; Lee i sar., 2014). Tako su Cheng i saradnici pokazali da je povećana ekspresija FGFR1 proteina, kod obolelih od TNBC, pokazatelj lošeg, ukupnog preživljavanja jer su oboleli kod kojih je detektovana vrlo visoka ekspresija FGFR1 proteina imali mnogo goru prognozu od onih kod kojih nije detektovana ekspresija ovog proteina. Sa druge strane, u svojoj studiji Lee i saradnici ne nalaze nikakvu vezu između preživljavanja bolesnica iz grupe TNBC i nivoa ekspresije FGFR1 proteina i/ili amplifikacije *FGFR1* onkogen. Asocijacija amplifikacionog statusa *FGFR1* onkogen sa prognozom TNBC-a nije detektovana ni u našoj studiji. Takođe, statistički značajnu povezanost nismo detektovali ni između amplifikacije *FGFR1* onkogen i relevantnih kliničkih i histopatoloških parametara TNBC-a.

Dakle, rezultati naše studije pokazuju da, samostalno posmatrana, amplifikacija *FGFR1* onkogen, ne može biti smatrana za informativan prognostički marker ni kod TNBC ni kod ER+ karcinoma dojke.

Tačni mehanizmi koji dovode do prekomerne ekspresije FGFR1 proteina u karcinomima dojke, nisu razjašnjeni. Tako, sa jedne strane, neke studije pokazuju da postoji direktna, statistički značajna korelacija između amplifikacije *FGFR1* onkogen i njegove iRNK i/ili ekspresije FGFR1 proteina (Reis-Filho i sar., 2006a; Tomiguchi i sar., 2016; Turner i sar., 2010). Sa druge strane, neki autori su detektovali upravo suprotno, potpuno odsustvo korelacije između amplifikacije *FGFR1* onkogen i nivoa ekspresije njegovog proteinskog produkta (Seo i sar., 2014; Sousa i sar., 2016). Razlike u ekspresiji FGFR1 proteina i broja kopija

njegovog gena po genomu mogu se objasniti aktivnošću miRNK koje predstavljaju dodatni regulacioni nivo u ekspresiji gena potencijalno odgovornih za transformaciju ćelija (Chen i sar., 2014; Yang i sar., 2014). Ovi nalazi dodatno usložnjavaju razmatranje amplifikacionog statusa *FGFR1* onkogeno kao prognostičkog indikatora u karcinomu dojke.

Amplifikacija je ključni mehanizam deregulacije *c-MYC* onkogeno u karcinomima dojke. Prema podacima iz literature, do sada detektovana učestalost amplifikacije *c-MYC*-a u karcinomima dojke varira u opsegu od 1 do 94% (Liao i Dickson, 2000). Bez obzira na značajne razlike u studijama amplifikacionog statusa *c-MYC*-a, većina autora ipak smatra da aktivacija ovog onkogeno značajno doprinosi progresiji i lošoj pronosi karcinoma dojke (Deming i sar., 2000; Xu i sar., 2010).

Rezultati naše studije pokazuju da je amplifikacija *c-MYC*-a prisutna u obe grupe karcinoma dojke sa statistički značajno višom zastupljenošću u grupi trostruko negativnih. Naime, amplifikovani *c-MYC* onkogen detektovali smo kod 28% hormonskih zavisnih i kod 50% trostruko negativnih tumorskih uzoraka. Naš rezultat je, na izvestan način, u skladu sa nalazom Dillon i sar. koji su amplifikovani *c-MYC* detektovali, takođe, kod velikog broja analiziranih tumorskih uzoraka, 75% TNBC-a i čak 89% BL tumora (Dillon i sar., 2016).

Po svemu sudeći *c-MYC* onkogen igra važnu ulogu u genezi TNBC fenotipa. Rezultati naše studije potvrđuju ovu hipotezu, jer smo visok stepen povezanosti detektovali kako između amplifikovanog *c-MYC* onkogeno i najvišeg histološkog gradusa, tako i između amplifikovanog *c-MYC*-a i visokog pTNM stadijuma TNBC tumora. Dobijeni rezultat pokazuje da amplifikacija *c-MYC* onkogeno povećava rizik od razvoja karcinoma visokog gradusa i da bi zato određivanje amplifikacionog statusa ovog onkogeno moglo pomoći identifikovanju onih bolesnica koje se nalaze u zoni rizika. Kao što je pomenuto, amplifikacija *c-MYC* onkogeno u našoj studiji, asocirana je i sa visokim pTNM stadijumom TNBC. Naš nalaz u skladu je i sa ranije publikovanim rezultatima Corzo-a koji tvrdi da je amplifikacija *c-MYC* u asocijaciji sa invazivnim zonama karcinoma dojke (Corzo i

sar., 2006). Dobijeni rezultati sugerišu da amplifikacija *c-MYC-a* utiče na progresiju TNBC. Dakle, amplifikacija *c-MYC* onkogenog mogla bi se smatrati markerom loše prognoze za TNBC populaciju. Drugim rečima, određivanje amplifikacionog statusa *c-MYC-a* moglo bi doprineti odabiru boljeg terapijskog protokola. Na kraju, dobijeni rezultati jasno sugerišu da je aktivacija *c-MYC* onkogenog najverovatnije, jedan od ključnih događaja u razviću agresivnijeg fenotipa TNBC-a kao i da je *c-MYC* onkogen možda, dobar potencijalni kandidat za ciljanu terapiju ove grupe karcinoma. Međutim, zbog njegove strukture i lokacije u ćeliji, do sada nisu sintetisane supstance sposobne da blokiraju aktivnost *c-MYC*. Trenutno se istražuju pristupi da se indirektno spreče njegove onkogene funkcije (Chen i sar., 2018).

Stratifikacijom TNBC uzoraka na osnovu histoloških karakteristika uočili smo da je amplifikacija *c-MYC* onkogenog bila značajno češća među lobularnim i medularnim karcinomima u odnosu na ostale podtipove karcinoma dojke iz ove grupe. Dobijeni rezultat, amplifikacija *c-MYC* onkogenog asociirana sa medularnim tumorima, u skladu je sa nalazima studije Al-Kuraya i saradnika, što bi moglo da znači da medularni tumori imaju specifičnu biologiju koju karakteriše amplifikacija *c-MYC-a* (Al-Kuraya i sar., 2004). Sa druge strane, detektovana asocijacija amplifikacije *c-MYC* onkogenog sa lobularnim karcinomima u suprotnosti je sa nalazima Green i saradnika koji povećanu ekspresiju *c-MYC-a* registruju u ne-lobularnim tumorima dojke (Green i sar., 2016). Međutim, analiza Green i saradika obuhvatala je samo 15% uzoraka iz TNBC grupe. Dobijeni rezultati navode nas na zaključak da su trostruko negativni lobularni karcinomi genetički različiti od drugih, ER+, lobularnih karcinoma. I studije drugih autora pokazuju da se ova dva tipa lobularnih karcinoma razlikuju po kliničkim, histopatološkim i IHC karakteristikama (Koo i Jung, 2011). Suprotno TNBC grupi karcinoma, rezultati naše studije ne ukazuju na značajnu povezanost između amplifikacije *c-MYC* onkogenog i kliničkih i histopatoloških parametra ER+ karcinoma.

Većina podataka iz literature ukazuje da amplifikacija *c-MYC* onkogenog negativno utiče na preživljavanje obolelih od karcinoma dojke (Deming i sar., 2000). Ovaj trend zapažan je i u našim, TNBC i ER+ uzorcima, iako bez statističke značajnosti.

U TNBC grupi detektovali smo značajno visok nivo ko-amplifikacije *c-MYC* i *FGFR1* onkogeni. Tačnije, kod 31% uzoraka registrovano je istovremeno povećanje broja kopija u oba gena. Ko-amplifikacija *c-MYC* i *FGFR1* onkogeni bila je asocirana sa najvišim histološkim gradusom i visokim pTNM stadijumom u ispitanoj TNBC grupi. Istovremena amplifikaciju oba onkogeni detektovana je kod samo jednog TNBC uzorka stadijuma I, što je dodatna potvrda hipoteze da alteracije u broju kopija *c-MYC*-a predstavljaju rizik za progresiju tumora do visoko agresivnog fenotipa. Česta ko-amplifikacija *c-MYC* i 8p11-p12 hromozomskog regiona u invazivnim tumorima dojke detektovana je i u studijama drugih istraživača (Parris i sar., 2014). Inače, u pomenutom 8p11-p12 hromozomskom region lociran je upravo *FGFR1* onkogen kao i nekoliko drugih gena sa mogućim onkogenim potencijalom. Pored navedenog, postoje dokazi koji povećanu ekspresiju *c-MYC* proteina povezuju sa boljim odgovorom obolelih od karcinoma pluća na tretman FGFR inhibitorima (Malchers i sar., 2014). Međutim, dosadašnja klinička istraživanja FGFR inhibitora u tretmanu karcinoma dojke nisu dala zadovoljavajuće rezultate što bi moglo biti posledica lošeg odabira kandidata za kliničke studije (De Luca i sar., 2017). Naime, polazeći od navedenih studija i naših rezultata smatramo da bi preliminarna analiza ko-amplifikacije i ko-ekspresije *FGFR1* i *c-MYC*-a mogla biti ključna za selektovanje obolelih kod kojih će terapija FGFR inhibitorima možda dati željene rezultate.

Uloga EGFR-a u karcinomu dojke i dalje je kontroverzna. Naime, određene studije pokazuju da je prekomerna ekspresija EGFR proteina indikator loše prognoze, dok druge nisu uočile takvu vezu (Pawlowski i sar., 2000; Tsutsui i sar., 2002). U grupi TNBC tumora, uvećana ekspresija EGFR proteina detektovana je kod čak 64% testiranih uzoraka (Park i sar., 2014; Zhang i sar., 2014).

Jedan od osnovnih mehanizama koji uzrokuje prekomernu ekspresiju EGFR proteina jeste amplifikacija njegovog gena koja je u različitim studijama na obe grupe karcinomima dojke, detektovana sa različitom učestalošću, od 8% do 32% (Lv i sar., 2011; Park i sar., 2007). Samo u grupi trostruko negativnih karcinoma dojke, Park i saradnici povećan broj kopija *EGFR* onkogeni, detektuju kod 33% obolelih (Park i sar., 2014). Podaci o korelaciji između ekspresije EGFR proteina i

amplifikacije njegovog gena u dostupnoj literaturi, krajnje su nedosledni. Tako, više istraživačkih grupa navodi značajno poklapanje između broja kopija *EGFR* onkogeno i njegove ekspresije, dok suprotno tome, Park i Toyama ovu korelaciju ne detektuju (Gumuskaya i sar., 2010; Nakajima i sar., 2012; Park i sar., 2007; Shao i sar., 2011; Toyama i sar., 2008).

U našoj studiji povećan broj kopija *EGFR*-a detektovan je kod 26% ER+ i kod 21% TNBC uzoraka. Statistička značajnost, u učestalosti amplifikacije *EGFR* onkogeno između ove dve grupe karcinoma dojke, nismo detektovali što sugeriše da promene u broju kopija *EGFR*-a, najverovatnije, nisu uzrok specifičnih karakteristika TNBC i ER+ karcinoma dojke. Međutim, u našoj studiji, detektovana je asocijacija amplifikacije *EGFR* onkogeno i najvišeg histološkog gradusa u okviru ER+ grupe karcinoma dojke. Dakle, amplifikacija *EGFR*-a u grupi ER+, mogla bi da znači povišen rizik od razvoja karcinoma visokog gradusa što sugeriše da određivanje amplifikacionog statusa ovog onkogeno ima potencijalni značaj u indentifikaciji bolesnica koje se (po pitanju histološkog gradusa), nalaze u zoni rizika. Iz ovoga dalje proizilazi da bi se amplifikacija *EGFR* onkogeno mogla smatrati i markerom loše prognoze kod ER+ karcinoma dojke.

Statistički značajna povezanost između amplifikacije *EGFR*-a i ostalih ispitanih kliničkih i histopatoloških parametra ER+ karcinoma dojke nije uočena. Takođe, nismo detektovali ni asocijacije između povećanog broja kopija *EGFR* onkogeno i bilo kog relevantnog kliničkog ili histopatološkog parametra u grupi TNBC tumora. Dobijeni rezultati za TNBC grupu, slažu se sa podacima do kojih su u svojim istraživanjima došli Park i saradnici (Park i sar., 2014).

Prognostički značaj amplifikacije *EGFR*-a u TNBC tumorima, definisali su do sada, samo Park i saradnici koji su povećanje broja kopija *EGFR* onkogeno povezali sa lošijim preživljavanjem bez progresije bolesti (eng. *disease free survival*, DFS) (Park i sar., 2014). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da amplifikacija *EGFR*-a ne utiče na ukupno preživljavanje obolelih od TNBC-a. Moguće objašnjenje za ovo neslaganje treba tražiti u činjenici da, za razliku od nas, Park i saradnici nisu analizirali ukupno, već tkzv. preživljavanje bez progresije bolesti - DFS. Analizama

ko-amplifikacionog statusa *EGFR*-a, utvrdili smo da je u grupi TNBC, statistički značajna međupovezanost prisutna jedino kod istovremene amplifikacije *EGFR* i *FGFR1* onkogeni. Dobijeni rezultat ukazuje na čestu ko-amplifikaciju ova dva onkogeni što bi moglo biti od značaja u takozvanoj ciljanoj terapiji TNBC-a, jer studije drugih autora pokazuju da terapija EGFR inhibitorima još uvek nije efikasna. Jedan od razloga neuspeha terapije EGFR inhibitorima, na koji svojim rezultatima ukazuje Azuma, jeste upravo povećana ekspresija, aktivnost FGFR1. Naime, po mišljenju Azume i saradnika, tumorske ćelije na koje se deluje EGFR inhibitorima najverovatnije, zahvaljujući prekomernoj ekspresiji FGFR1, aktiviraju alternativni signalni put koji se realizuje preko ovog receptora (Azuma i sar., 2014; Nakai i sar., 2016).

Na kraju, zapazili smo, takođe, da najlošije, ali ne i statistički značajno ukupno preživljavanje imaju bolesnice sa istovremeno amplifikovanim *c-MYC*, *FGFR1* i *EGFR* onkogenima. Ovaj nalaz ukazuje na postojanje izvesnog nivoa kooperacije između *c-MYC*, *FGFR1* i *EGFR* u grupi TNBC. Što se populacije ER+ tumor tiče, pouzdane statističke analize preživljavanja nisu bile moguće, jer smo istovremenu amplifikaciju pomenuta tri onkogeni detektovali kod samo dva uzorka.

Rezultati ove doktorske studije pokazali su da je uvećan broj kopija *CCND1* onkogeni po genomu prisutan kod samo 5% uzoraka iz grupe trostruko negativnih karcinoma dojke. Dobijeni rezultat u potpunosti je saglasnosti sa podacima iz literature po kojima je amplifikacija ovog onkogeni u TNBC populaciji, redak događaj (Reis-Filho i sar., 2006b; Vaziri i sar., 2001). Dobijeni rezultati su takođe, pokazali da je *CCND1* onkogen amplifikovan kod 20% analiziranih uzoraka iz grupe hormonski zavisnih tumora dojke što je opet, u skladu sa podacima iz literature (Arnold i Papanikolaou, 2005; Reis-Filho i sar., 2006b). Na osnovu dobijenih rezultata utvrdili smo da amplifikacija *CCND1* onkogeni statistički značajno asocira sa ER+ tipom karcinoma dojke. Ovaj nalaz, zajedno sa rezultatima drugih studija, upućuje na zaključak da proteinski produkt *CCND1* onkogeni – ciklin D1, najverovatnije, nema bitnu ulogu u biologiji TNBC-a.



Međutim, ciklin D1 po svemu sudeći, igra ključnu ulogu u razviću ER+ karcinoma dojke od preneoplastičnih lezije do visoko malignih stadijuma bolesti. Ovo su detekcijom visoke ekspresije ciklina D1 u hiperplazijama koja raste sa progresijom ER+ tumora, potvrdile i IHC studije (Alle i sar., 1998). Takođe, pokazano je i da je ekspresija ciklina D1 povezana sa ER i PR statusom, odnosno da estrogen i progesteron preko svojih receptora indukuju ekspresiju ciklina D1 (Eeckhoutte i sar., 2006). Dobro poznata sposobnost estrogena da stimuliše rast hormonski zavisnih tumora ostvaruje se stimulacijom ekspresije ciklina D1 koji je snažan promoter ćelijskog ciklusa.

Treba naglasiti da je, za razliku od ostala tri analizirana onkogeni u ovom radu, a prema podacima iz literature, jedino amplifikacija *CCND1* onkogeni uvek praćena povećanom ekspresijom njegovog proteinskog produkta – ciklina D1 (Bie i sar., 2002; Gillett i sar., 1994).

Rezultati do kojih smo došli pokazuju takođe, da uvećan broj kopija *CCND1* onkogeni po genomu ne utiče na preživljavanje obolelih od ER+ karcinoma dojke. Pored toga, asocijacije amplifikacionog statusa *CCND1* onkogeni sa relevantnim kliničkim i histo-patološkim parametrima, nismo detektovali ni kod TNBC ni kod ER+ tumora. Rezultati do kojih smo došli razlikuju se od podataka iz literature iako stvarnog konsenzusa o efektu amplifikovanog *CCND1* onkogeni i/ili povećane ekspresije njegovog proteinskog produkta (ciklina D1) na preživljavanje bolesnica sa ER+ tumorima, uopšte nema. Naime, neki autori nalaze da amplifikacija *CCND1* korelira sa lošom prognozom, dok drugi visoku ekspresiju ciklina D1 povezuju sa boljim preživljavanjem (Bie i sar., 2002; Hwang i sar., 2003; Roy i Thompson, 2006; Roy i sar., 2010).

Na kraju, u ovoj studiji utvrđeno je da kod ER+ tumora postoji statistički značajna povezanost istovremene amplifikacije *EGFR* i *CCND1*, kao i *FGFR1* i *CCND1* onkogenog para. Dobijeni rezultati upućuju na mogući, sinergistički efekat ova tri onkogeni kod hormonski zavisnih karcinomima dojke, jer su i *EGFR* i *FGFR1* dobro poznati receptori faktora rasta koji stimulaciju ćelijske proliferacije, odnosno

realizaciju mitogenog signala, ostvaruju aktivacijom ekspresije ciklina D1 (Koziczak i sar., 2004; Wee i Wang, 2017).

## **5.2 Analiza ekspresije BCRP i MRP1 proteina u TNBC i ER+ karcinomima dojke**

Osim hirurške intervencije koja u većini slučajeva predstavlja primarni tretman, u lečenju karcinoma dojke koriste se i hormonska, ciljana i hemioterapija. Obzirom da se trostruko negativni i hormonski zavisni karcinomi dojke odlikuju različitim biološkim i kliničkim ponašanjem, u tretmanu ove dve grupe tumora koriste se različite sistemske terapije. Naime, hormonski zavisni karcinomi dojke, ER+, kao što im samo ime kaže, dobro odgovaraju na endokrinu terapiju, mada se u njihovom lečenju dodatno koriste i ciljana i hemioterapija. Međutim, u lečenju trostruko negativnih karcinoma dojke, zbog odsustva ekspresije ER, PR i HER2 receptora, hemioterapija predstavlja jedinu moguću sistemsku terapiju.

Jedan od osnovnih problema koji se javlja u lečenju obe grupe karcinoma dojke, jeste rezistencija na terapiju. Ovaj problem posebno je izražen u populaciji obolelih od TNBC-a. Naime, za TNBC rezistentne na hemioterapiju ne postoje efikasni alternativni vidovi lečenja zbog čega je razumevanje mehanizama koji čine osnovu ove rezistencije posebno bitno.

Brojna istraživanja pokazala su da kod različitih tipova tumora postoji direktna veza između ekspresije ABC transportera i pojave rezistencije na sistemsku terapiju. Upravo zato, jedan on najbolje proučenih, MDR1, bio je meta velikog broja kliničkih studija sa inhibitorima ABC transportera (Leonessa i Clarke, 2003; Shukla i sar., 2011). Na žalost, do sada ispitivani inhibitori MDR1 proteina nisu doveli do željenih rezultata u terapiji, odnosno do stabilne remisije kod obolelih. Ovakvi nalazi sugerišu da drugi ABC transporteri, prvenstveno BCRP i MRP1, možda imaju značajniju ulogu u uspostavljanju rezistencije na hemioterapiju. Međutim, o ulozi BCRP i MRP1 transportera u karcinomima dojke

relativno se malo zna, a osim toga, podaci o njihovoj ekspresiji u grupi TNBC karcinoma su prilično oskudni.

Polazeći od navedenog, u ovoj studiji urađena je uporedna analiza ekspresije oba membranska transportera – BCRP i MRP1, u maligno transformisanom i u zdravom tkivu dojke sa posebnim osvrtom na grupu trostruko negativnih tumora. Dobijeni rezultati su pokazali da svi TNBC uzorci ekspimiraju i BCRP i MRP1 proteine pri čemu je kod više od 50% uzoraka detektovana visoka ekspresija oba transportera. Za ER+ grupu, rezultati su pokazali da skoro polovina uzoraka ne ekspimiraju BCRP protein dok preostali pokazuju nizak nivo njegove ekspresije. Sa izuzetkom jednog, u ER+ grupi tumora, kod svih uzoraka detektovana je niska ekspresija MRP1 transportera. Ekspresija oba transportera, BCRP i MRP1, u kontrolnim uzorcima zdravog tkiva dojke bila je, slično populaciji ER+ karcinoma, niska. Rezultati do kojih smo došli u ovoj studiji, u skladu su sa nalazima većine autora koji navode da je MRP1 ekspimiran kod relativno visokog broja testiranih uzoraka. Tako pregled većeg broja studija ekspresije MRP1 transportera koji u svom revijskom radu daju Leonessa i Clarke, pokazuje da se ekspimirani MRP1 kreće u opsegu od 20% do 100% (Leonessa i Clarke, 2003). Što se ekspresije BCRP proteina tiče, podataka u literaturi, posebno za populaciju TNBC-a, gotovo da i nema. Studije Yamade i Xiang-a pokazuju da se ekspresija ovog transportera kreće u opsegu od 24% do 87% (Yamada i sar., 2013; Xiang i sar., 2011), što može biti posledica različitih metoda i pristupa u evaulaciji IHC bojenja, što inače dodatno otežava interpretaciju nalaza između različitih studija.

Naši rezultati su pokazali da je ekspresija oba transportera, BCRP i MRP1, kod TNBC-a značajno viša u poređenju i sa ER+ tumorima, i sa zdravim tkivom dojke. Istovremeno, nikakvu značajnu razliku u ekspresiji ovih transportera između ER+ tumora i zdravog tkiva dojke, nismo detektovali. Dobijeni rezultati potpuno su u skladu sa nalazima Yamada i saradnika koji su ekspresiju BCRP i MRP1 proteina analizirali na nešto manjoj grupi TNBC tumora (Yamada i sar., 2013). Polazeći od dobijenih rezultata i činjenice da su gotovo svi hemioterapeutici koji se koriste u tretmanu karcinoma dojke istovremeno i supstrati analiziranih transportera (**Tabela 1.2**), možemo zaključiti da njihova snažna ekspresija utiče

na uspešnost hemioterapije, odnosno da je mogući uzrok pojave rezistencije na hemioterapeutike u populaciji obolelih od TNBC-a.

Budući, da su uzorci trostruko negativnih tumora analizirani u našoj studiji dobijeni pre primene hemioterapije moglo bi se reći da svi oboleli kod kojih je detektovana visoka ekspresija transportera pripadaju populaciji visokog rizika za pojavu rezistencije na citostatsku terapiju. Ovo bi takođe moglo da znači, da se tokom geneze TNBC-a, a zbog specifičnih promena u genomu, ekspresija membranskih transportera, MRP1 i BCRP, intenzivira. Svi kasniji tretmani hemioterapeutcima najverovatnije, indukuju dodatnu ekspresiju ovih transportera na šta ukazuju i podaci iz literature (Atalay i sar., 2008; Balaji i sar., 2016).

Jedna od osnovnih uloga ABC transportera je zaštita zdrave ćelije od toksičnih produkata ćelijskog metabolizma. TNBC tumore karakteriše vrlo visok mitotski indeks, odnosno značajno viša metabolička aktivnost, što visokoj, urođenoj ekspresiji ABC transportera u populaciji obolelih od TNBC-a daje zaštitnu ulogu u odnosu na dati tumorski fenotip. U skladu sa ovom pretpostavkom je i podatak da inhibicija MRP1 transportera dovodi do smanjenja mitotskog indeksa u ksenograftima neuroblastoma kao i do intenziviranja spontane ćelijske smrti u ćelijskim linijama i ksenograftima neuroblastoma (Kuss i sar., 2002; Peaston i sar., 2001). Niži nivo proteinske ekspresije BCRP u poređenju sa MRP1 u zdravom tkivu dojke i ER+ karcinomima, kao i izrazito visok nivo ekspresije u TNBC populaciji, mogli bi biti i posledica uticaja estrogena. Naime, dokazano je da je estrogen negativni regulator ekspresije BCRP transportera u ćelijskim linijama karcinoma dojke (Imai i sar., 2005). Drugim rečima, odsustvo receptora za estrogen kod TNBC-a onemogućava negativnu regulaciju ekspresije BCRP proteina čiji je nivo evidentno viši u ovoj grupi tumora dojke.

U literaturi ne postoji potpuna saglasnost oko uticaja ekspresije MRP1 i BCRP transportera na preživljavanje obolelih od karcinoma dojke. Tako su Yamada i saradnici pokazali da je ekspresija MRP1 transportera asocirana sa lošijim preživljavanjem obolelih od karcinoma dojke dok nekoliko drugih studija vezu

između ekspresije MRP1, kliničkih parametara tumora dojke i preživljavanja obolelih, ne detektuju (Kanzaki i sar., 2001; Moureau-Zabotto i sar., 2006; Yamada i sar., 2013). Po Omran-u, ekspresija BCRP proteina korelira sa kliničkim stadijumom, gradusom i statusom limfnih čvorova invazivnih karcinoma dojke (Omran, 2012). Suprotno tome, Kanzaki i Kim u svojim studijama ne nalaze nikakve korelacije između urođene ekspresije BCRP i MRP1 transportera, kliničkih parametara tumora dojke i preživljavanja obolelih (Kanzaki i sar., 2001; Kim i sar., 2013).

Naši rezultati su pokazali da je ekspresije BCRP proteina u asocijaciji sa niskim pTNM stadijumom TNBC tumora. Naime, TNBC tumori sa visokom ekspresijom BCRP transportera su značajno češće pripadali TNBC tumorima niskog pTNM stadijuma, I ili II, što sugeriše da su tumori sa visokom ekspresijom BCRP transportera manje agresivni. Drugim rečima, čini se da tumore sa nižom ekspresijom BCRP proteina karakteriše agresivniji fenotip. Osim toga, utvrdili smo da ekspresija BCRP transportera utiče na ukupno preživljavanje bolesnica u TNBC grupi, ali na prilično neočekivan način. Naime, bolesnice sa visokom ekspresijom BCRP proteina su imale značajno bolje ukupno preživljavanje u poređenju sa onim kod kojih je ekspresija bila niska. Isti fenomen, ali kod hepatocelularnog karcinomima, zapazio je i Namisaki sa saradnicima (Namisaki i sar., 2014). Na prvi pogled ovaj rezultat deluje paradoksalno ako pođemo od pretpostavke da ABC transporteri, uključujući i BCRP, doprinose rezistenciji na hemioterapiju. Međutim, treba naglasiti da BCRP, osim uloge transportera, obavlja i neke druge funkcije u ćeliji. Tako je, relativno skoro otkriveno, da je BCRP protein u stanju da se translocira u nukleus gde stimuliše transkripciju E-kadherina koji su, kao što je poznato, ključni za ćelijsku adheziju, što znači da negativno utiču na ćelijsku pokretljivost (Liang i sar., 2015). Dakle, transaktivacijom E-kadherina BCRP protein indirektno kontroliše migraciju ćelija, odnosno invazivnost, agresivnost i metastatski potencijal tumora. U prilog ovome govori i trend zapažen u našem istraživanju – slabije širenje TNBC-a u lokalne limfne čvorove kod obolelih sa visokom ekspresijom BCRP proteina. Naši rezultati, zajedno sa podacima Liang i sardnika ukazuju na moguću dualnu ulogu BCRP proteina u populaciji TNBC-a. Sa

jedne strane visoka ekspresija BCRP proteina doprinosi rezistenciji na hemioterapiju, dok sa druge, smanjuje invazivni i metastatski potencijal tumora i tako doprinosi boljem preživljavanju. Sudeći po podacima iz literature, ekspresija MRP1 transportera u poređenju sa BCRP-om, ima potpuno suprotan efekat, odnosno stimuliše migraciju ćelija čime podstiče agresivnost tumora (Henderson i sar., 2011). U skladu sa tim je i naš rezultat, da najbolje ukupno preživljavanje pokazuju bolesnice sa visokom ekspresijom BCRP i niskom ekspresijom MRP1 transportera. Samostalno, ekspresija MRP1 nije pokazala asocijaciju sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC kao ni sa ukupnim preživljavanjem obolelih, što odgovara literaturnim podacima (Leonessa i Clarke, 2003).

Iako su svi hemioterapeutici korišćeni u tretmanu obolelih od TNBC-a u našoj studiji bili supstrati za oba, BCRP i MRP1, transportera, ukupno preživljavanje bolesnica koje su primile hemioterapiju (81%) bilo je značajno bolje kod onih koje su imale visoku ekspresiju BCRP transportera. Istovremeno, ni visoka ni niska ekspresija MRP1 proteina kod istih bolesnica nije imala nikakav uticaj na ukupno preživljavanje. Ovi podaci navode na zaključak da pomenuta, „alternativna“ funkcija BCRP proteina kao transaktivatora ima mnogo veći uticaj na preživljavanje od njegove sposobnosti da doprinese rezistenciji na hemioterapiju kao membranska „pumpa“.

U našoj studiji nije detektovana statistički značajna povezanost između ekspresije BCRP i MRP1 proteina i kliničko-histopatoloških parametra ER+ karcinoma dojke. Ekspresija BCRP transportera ne utiče ni na ukupno preživljavanje bolesnica iz ove grupe malignih tumora dojke.

Iz svega do sada navedenog očigledno je da je izuzetno visoka ekspresija BCRP i MRP1 u trostruko negativnim tumorima dojke posledica specifične biologije ovih tumora kao i da doprinosi rezistenciji na hemioterapiju. Ipak, ne sme se prevideti dodatna funkcija BCRP transportera koja očigledno utiče na ponašanje TNBC tumora. Naime, i pored doprinosa rezistenciji na hemiotrapiju, visoka ekspresija BCRP proteina ima protektivno dejstvo u TNBC tumorima. Na kraju, naši

rezultati sugerišu da bi najbolja strategija u terapiji TNBC tumora mogla biti istovremena primena citostatika i inhibitora MRP1, ali ne i BCRP transportera.

## 6. Zaključci

---

Prikazani rezultati, zajedno sa njihovim tumačenjem na osnovu postojeće literature, navode na sledeće zaključke:

- Trostruko negativni karcinomi dojke su značajno agresivniji od hormonski zavisnih karcinoma dojke.
- Analizom amplifikacionog statusa *FGFR1* i *EGFR* onkogeni, statistički značajna razlika u dve grupe tumora dojke, nije detektovana što ukazuje da promene u broju kopija ovih onkogeni nisu odgovorne za razlike u histopatološkim karakteristikama i kliničkom ponašanju TNBC i ER+ karcinoma dojke.
- Amplifikacioni status *EGFR* onkogeni je u asocijaciji sa najvišim histološkim gradusom ER+ karcinoma dojke što ga čini potencijalnim prognostičkim markerom.
- Uvećanje broja kopija *FGFR1* onkogeni nije u asocijaciji sa relevantnim kliničko-histopatološkim parametrima ni TNBC ni ER+ karcinoma što znači da amplifikacioni status *FGFR1* ne može biti uzet kao prognostički marker za analizirane tumore dojke.
- Amplifikacija *c-MYC* onkogeni je značajno češća kod TNBC nego kod ER+ tumora i najverovatnije doprinosi razlikama u njihovim histopatološkim karakteristikama i kliničkom ponašanju. Unutar TNBC grupe, amplifikacija *c-MYC* onkogeni češća je kod određenih histoloških podtipova – medularnih i lobularnih karcinoma koji pokazuju specifične biološke karakteristike.
- Amplifikacija *c-MYC* onkogeni ključni je događaj u razviću agresivnijih formi tumora, jer je u grupi TNBC-a u asocijaciji sa visokim stadijumima i najvišim histološkim gradusom tumora.



- Amplifikacioni status *c-MYC* onkogeni bi mogao biti dobar prognostički marker i parametar za odabir odgovarajuće terapije kod obolelih od TNBC-a.
- Amplifikacija *CCND1* onkogeni je značajno češća kod ER+ nego kod TNBC tumora i najverovatnije doprinosi razlikama u njihovim patohistološkim karakteristikama i kliničkom ponašanju.
- Uvećanje broja kopija *CCND1* onkogeni nije u asocijaciji sa relevantnim kliničko-histopatološkim parametrima ni TNBC ni ER+ karcinoma što znači da amplifikacioni status *CCND1* ne može biti uzet kao prognostički marker za analizirane tumore dojke.
- Amplifikacija *c-MYC* onkogeni je statistički značajno često praćena amplifikacijom *FGFR1* onkogeni u TNBC. Ko-alteracija *c-MYC* i *FGFR1* onkogeni, u populaciji obolelih od TNBC-a, je statistički značajno povezana sa visokim pTNM stadijumom i visokim histološkim gradusom.
- Istovremena amplifikacija analiziranih onkogeni, sa statističkom značajnošću, detektovana je u oba tipa tumora i to: EGFR/FGFR1 onkogeni par kod TNBC, a EGFR/CCND1 i FGFR1/CCND1 kod ER+ karcinoma dojke.
- Amplifikacioni status ni jednog od analiziranih onkogeni nije uticao na ukupno preživljavanje obolelih u oba tipa karcinoma dojke.
- Ekspresija oba transportera, BCRP i MRP1, značajno je viša kod TNBC u poređenju i sa ER+ tumorima i sa zdravim tkivom dojke. Istovremeno, razlike u nivou ekspresije, ovih transportera između ER+ tumora i zdravog tkiva dojke, nisu detektovane.
- Izuzetno visoka ekspresija BCRP i MRP1 proteina kod TNBC ukazuje da bi ovi transporteri mogli da imaju ključnu ulogu u pojavi rezistencije na hemioterapiju u populaciji obolelih od TNBC.
- Visoka ekspresija BCRP transportera je u asocijaciji sa niskim stadijumom TNBC tumora i povoljno utiče na ukupno preživljavanje bolesnica u TNBC grupi što sugeriše dvostruku ulogu ovog

membranskog transportera. BCRP povećava rezistenciju, a istovremeno smanjuje agresivnost tumora čime doprinosi boljem preživljavanju obolelih.

- Ekspresioni status MRP1 transportera nije u asocijaciji sa relevantnim kliničko-histopatološkim parametrima TNBC karcinoma niti utiče na ukupno preživljavanje obolelih od TNBC.
- Inhibicija MRP1, ali ne i BCRP, uz istovremenu primenu hemioterapije, mogla bi biti logična strategija u tretmanu obolelih od TNBC.
- Odsustvo patološke ekspresije BCRP i MRP1 proteina u ER+ karcinomima dojke ukazuje da ekspresija ovih transportera ne utiču na tok i ishod bolesti obolelih od hormonski zavisnih karcinoma dojke.
- Amplifikacioni status ni jednog od analiziranih onkogeni nije uticao na nivo ekspresije BCRP i MRP1 transportera u oba tipa karcinoma dojke.

## 7. Literatura

---

Al-Kuraya, K., Schraml, P., Torhorst, J., Tapia, C., Zaharieva, B., Novotny, H., Spichtin, H., Maurer, R., Mirlacher, M., Köchli, O., i sar. (2004). Prognostic Relevance of Gene Amplifications and Coamplifications in Breast Cancer. *Cancer Res.* *64*, 8534–8540.

Alle, K.M., Henshall, S.M., Field, A.S., and Sutherland, R.L. (1998). Cyclin D1 protein is overexpressed in hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast. *Clin. Cancer Res.* *4*, 847–854.

Arnold, A., and Papanikolaou, A. (2005). Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J. Clin. Oncol.* *23*, 4215–4224.

Arteaga, C.L., Sliwkowski, M.X., Osborne, C.K., Perez, E. a., Puglisi, F., and Gianni, L. (2011). Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *9*, 16–32.

Atalay, C., Demirkazik, A., and Gunduz, U. (2008). Role of ABCB1 and ABCC1 gene induction on survival in locally advanced breast cancer. *J. Chemother.* *20*, 734–739.

Aulmann, S. (2006). c-myc Amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences. *J. Clin. Pathol.* *59*, 424–4248.

Austin Doyle, L., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., and Ross, D.D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15665–15670.

Aye Thike, A., Yian Cheok, P., Richelia Jara-Lazaro, A., Tan, B., Tan, P., and Hoon Tan, P. (2009). Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod. Pathol.* *23*, 123–133.

Azuma, K., Kawahara, A., Sonoda, K., Nakashima, K., Tashiro, K., Watari, K., Izumi, H., Kage, M., Kuwano, M., Ono, M., i sar. (2014). FGFR1 activation is an escape mechanism in human lung cancer cells resistant to afatinib, a pan-EGFR family kinase inhibitor. *Oncotarget* *5*, 5908–5919.

Baguley, B.C. (2010). Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol. Biotechnol.* *46*, 308–316.

Balaji, S.A., Udupa, N., Chamallamudi, M.R., Gupta, V., and Rangarajan, A. (2016). Role of the drug transporter ABCC3 in breast cancer chemoresistance. *PLoS One* *11*, 1–22.

Bauer, K.R., Brown, M., Cress, R.D., Parise, C.A., and Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: A population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer* *109*, 1721–

1728.

Bernard, P.S., Parker, J.S., Mullins, M., Cheung, M.C.U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., i sar. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* *27*, 1160–1167.

Berry, D. a, Cronin, K. a, Plevritis, S.K., Fryback, D.G., Clarke, L., Zelen, M., Mandelblatt, J.S., Yakovlev, A.Y., Habbema, J.D.F., and Feuer, E.J. (2005). Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *353*, 1784–1792.

Bhatia, A., Schäfer, H.J., and Hrycyna, C.A. (2005). Oligomerization of the human ABC transporter ABCG2: Evaluation of the native protein and chimeric dimers. *Biochemistry* *44*, 10893–10904.

Bie, I., Olivi, M., Nogue, C., Vidaud, M., and Lidereau, R. (2002). Prognostic value of CCND1 gene status in sporadic breast tumours , as determined by real-time quantitative PCR assays. *Br. J. Cancer* 580–586.

Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M.K., and Poolman, B. (2006). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* *580*, 1023–1035.

Boxer, L.M., and Dang, C. V. (2001). Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* *20*, 5595–5610.

Boyle, P. (2012). Triple-negative breast cancer: Epidemiological considerations and recommendations. *Ann. Oncol.* *23*, 8–13.

Brady, N., Chuntova, P., Bade, L.K., and Schwertfeger, K.L. (2013). The FGF/FGFR axis as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* *8*, 391–402.

Van den Brandt, P.A., Spiegelman, D., Yaun, S.-S., Adami, H.-O., Beeson, L., Folsom, A.R., Fraser, G., Goldbohm, R.A., Graham, S., and Kushi, L. (2000). Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* *152*, 514–527.

Brangi, M., Litman, T., Ciotti, M., Nishiyama, K., Kohlhagen, G., Takimoto, C., Robey, R., Pommier, Y., Fojo, T., and Bates, S.E. (1999). Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer Res.* *59*, 5938–5946.

Brooks, A.N., Kilgour, E., and Smith, P.D. (2012). Molecular pathways: Fibroblast growth factor signaling: A new therapeutic opportunity in cancer. *Clin. Cancer Res.* *18*, 1855–1862.

Carroll, J.C., Cremin, C., Allanson, J., Blaine, S.M., Dorman, H., Gibbons, C. a, Grimshaw, J., Honeywell, C., Meschino, W.S., Permaul, J., i sar. (2008). Hereditary breast and ovarian cancers. *Can. Fam. Physician* *54*, 1691–1692.

- Cheang, M.C.U., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S.K., Perou, C.M., and Nielsen, T.O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin. Cancer Res.* *14*, 1368–1376.
- Chen, D.-L., Wang, Z.-Q., Zeng, Z.-L., Wu, W.-J., Zhang, D.-S., Luo, H.-Y., Wang, F., Qiu, M.-Z., Wang, D.-S., Ren, C., et al. (2014). Identification of miR-214 as a negative regulator of colorectal cancer liver metastasis via regulation of FGFR1 expression. *Hepatology* 1–12.
- Chen, H., Liu, H., and Qing, G. (2018). Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduct. Target. Ther.* *3*, 5.
- Cheng, C.L., Thike, A.A., Tan, S.Y.J., Chua, P.J., Bay, B.H., and Tan, P.H. (2015). Expression of FGFR1 is an independent prognostic factor in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *151*, 99–111.
- Clarke, R., Leonessa, F., and Trock, B. (2005). Multidrug resistance/P-glycoprotein and breast cancer: review and meta-analysis. *Semin. Oncol.* *32*, S9-15.
- Colditz, G., and Rosner, B. (2000). Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: Data from the Nurses' Health Study. *Am. J. Epidemiol.* *152*, 950–964.
- Colditz GA, R.B. (2000). Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* *152*, 950.
- Cole, S., Bhardwaj, G., and Gerlach, J. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* (80-. ). *258*, 1650–1654.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br. J. Cancer* *87*, 1234–1245.
- Coller, H.A. (2007). What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Mol. Cell Biol.* *8*, 667–670.
- Collett, K., Stefansson, I.M., Eide, J., Braaten, a, Wang, H., Eide, G.E., Thoresen, S.O., Foulkes, W.D., and Akslen, L. a (2005). A basal phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen-detected tumours. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *14*, 1108–1112.
- Coqueret, O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* *299*, 35–55.
- Corzo, C., Corominas, J.M., Tusquets, I., Salido, M., Bellet, M., Fabregat, X., Serrano, S., and Solé, F. (2006). The MYC oncogene in breast cancer progression: from benign epithelium to invasive carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* *165*, 151–156.
- Criscitello, C., Esposito, A., and Curigliano, G. (2017). Targeting FGFR pathway in

breast cancer. *Breast Cancer Innov. Res. Manag.* 37, 819–822.

da Cunha Santos, G., Shepherd, F.A., and Tsao, M.S. (2011). EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 49–69.

Dang, C. V (1999). c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth , Apoptosis , and Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1–11.

Dauchy, S., Dutheil, F., Weaver, R.J., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.-O., Scherrmann, J.-M., De Waziers, I., and Declèves, X. (2008). ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 107, 1518–1528.

Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001). The Human ATP-Binding Cassette transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 42, 1007–1017.

Dedović, N. (2004) Molekulska patogeneza tumora glave i vrata. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu: Biološki fakultet.

Degnim, A.C., Visscher, D.W., Berman, H.K., Frost, M.H., Sellers, T.A., Vierkant, R.A., Maloney, S.D., Pankratz, V.S., de Groen, P.C., Lingle, W.L., i sar. (2007). Stratification of breast cancer risk in women with atypia: A mayo cohort study. *J. Clin. Oncol.* 25, 2671–2677.

Deming, S.L., Nass, S.J., Dickson, R.B., and Trock, B.J. (2000). C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br. J. Cancer* 83, 1688–1695.

Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2007). Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* 13, 4429–4434.

Dent, R., Hanna, W.M., Trudeau, M., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2009). Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 115, 423–428.

Depowski, P.L., Rosenthal, S.I., and Ross, J.S. (2001). Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod. Pathol.* 14, 672–676.

Dillon, J.L., Mockus, S.M., Ananda, G., Spotlow, V., Wells, W.A., Tsongalis, G.J., and Marotti, J.D. (2016). Somatic gene mutation analysis of triple negative breast cancers. *Breast* 29, 202–207.

van Dongen, J.A. (2000). Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European organization for research and treatment of cancer 10801 trial 4606. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1143–1150.

Eccles, S.A. (2011). The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 685–696.

Eeckhoute, J., Carroll, J.S., Geistlinger, T.R., Torres-Arzayus, M.I., and Brown, M. (2006). A cell-type-specific transcriptional network required for estrogen regulation of cyclin D1 and cell cycle progression in breast cancer. *Genes Dev.* 20, 2513–2526.

Einstein, A.J., Henzlova, M.J., and Rajagopalan, S. (2007). Estimating risk of cancer associated with radiation exposure from 64-slice computed tomography coronary angiography. *Jama-Journal Am. Med. Assoc.* 298, 317–323.

Elbauomy Elsheikh, S., Green, A.R., Lambros, M.B.K., Turner, N.C., Grainge, M.J., Powe, D., Ellis, I.O., and Reis-Filho, J.S. (2007). FGFR1 amplification in breast carcinomas: a chromogenic in situ hybridisation analysis. *Breast Cancer Res.* 9, R23.

Ellis, C.M., Dyson, M.J., Stephenson, T.J., and Maltby, E.L. (2005). HER2 amplification status in breast cancer: a comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridisation using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques. *J. Clin. Pathol.* 58, 710–714.

Ertel, A., Dean, J.L., Rui, H., Liu, C., Witkiewicz, A.K., Knudsen, K.E., and Knudsen, E.S. (2010). RB-pathway disruption in breast cancer: Differential association with disease subtypes, disease-specific prognosis and therapeutic response. *Cell Cycle* 9, 4153–4163.

Fernández-Medarde, A., and Santos, E. (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes and Cancer* 2, 344–358.

Filipits, M., Pohl, G., Rudas, M., Dietze, O., Lax, S., Grill, R., Pirker, R., Zielinski, C.C., Hausmaninger, H., Kubista, E., i sar. (2005). Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: The Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* 23, 1161–1168.

Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M.F., Allen, C., Hansen, G., Woodbrook, R., Wolfe, C., i sar. (2015). The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 1, 505.

Fletcher, J.I., Haber, M., Henderson, M.J., Norris, M.D. (2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature reviews Cancer*.10, 147-56

Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D.T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., i sar. (1998). Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 676–689.

Foulkes, W.D., Metcalfe, K., Hanna, W., Lynch, H.T., Ghadirian, P., Tung, N., Olopade, O., Weber, B., McLennan, J., Olivotto, I.A., i sar. (2003). Disruption of the expected positive correlation between breast tumor size and lymph node status in BRCA1-related breast carcinoma. *Cancer* 98, 1569–1577.

Foulkes, W.D., Smith, I.E., and Reis-Filho, J.S. (2010). Triple-Negative Breast Cancer.

N. Engl. J. Med. 1938–1948.

Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T., and Pestell, R.G. (2004). Minireview: Cyclin D1: Normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145, 5439–5447.

Gillett, C., Fantl, V., Smith, R., Fisher, C., Bartek, J., Dickson, C., Barnes, D., and Peters, G. (1994). Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res.* 54, 1812–1817.

Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., and Senn, H.J. (2011). 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. *Ann. Oncol.* 22, 1736–1747.

Gonzalez-Angulo, A.M., Timms, K.M., Liu, S., Chen, H., Litton, J.K., Potter, J., Lanchbury, J.S., Stemke-Hale, K., Hennessy, B.T., Arun, B.K., i sar. (2011). Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 17, 1082–1089.

Gorski, J.J., James, C.R., Quinn, J.E., Stewart, G.E., Staunton, K.C., Buckley, N.E., McDyer, F.A., Kennedy, R.D., Wilson, R.H., Mullan, P.B., i sar. (2010). BRCA1 transcriptionally regulates genes associated with the basal-like phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 122, 721–731.

Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002). MULTIDRUG RESISTANCE IN CANCER: ROLE OF ATP-DEPENDENT TRANSPORTERS. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48–58.

Green, A.R., Aleskandarany, M.A., Agarwal, D., Elsheikh, S., Nolan, C.C., Diez-Rodriguez, M., Macmillan, R.D., Ball, G.R., Caldas, C., Madhusudan, S., i sar. (2016). MYC functions are specific in biological subtypes of breast cancer and confers resistance to endocrine therapy in luminal tumours. *Br. J. Cancer* 114, 917–928.

Gross, R.E. (2000). Breast Cancer: Risk Factors, Screening, and Prevention. *Semin. Ontol. Nursing*, 16, 176–184.

Gudjonsson, T., Rønnov-Jessen, L., Villadsen, R., Rank, F., Bissell, M.J., and Petersen, O.W. (2002). Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J. Cell Sci.* 115, 39–50.

Gumuskaya, B., Alper, M., Hucumenoglu, S., Altundag, K., Uner, A., and Guler, G. (2010). EGFR expression and gene copy number in triple-negative breast carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 203, 222–229.

Gupta, P.B., Proia, D., Cingoz, O., Weremowicz, J., Naber, S.P., Weinberg, R.A., and Kuperwasser, C. (2007). Systemic stromal effects of estrogen promote the growth of estrogen receptor-negative cancers. *Cancer Res.* 67, 2062–2071.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.



Hare, S.H., and Harvey, A.J. (2017). mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer. *Am. J. Cancer Res.* 7, 383–404.

Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F., and Bast, R.C. (2007). American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 25, 5287–5312.

Hassan, M.S., Ansari, J., Spooner, D., and Hussain, S.A. (2010). Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncol. Rep.* 24, 1121–1131.

Haugsten, E.M., Wiedlocha, A., Olsnes, S., and Wesche, J. (2010). Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Mol. Cancer Res.* 8, 1439–1452.

Henderson, M.J., Haber, M., Porro, A., Munoz, M.A., Iraci, N., Xue, C., Murray, J., Flemming, C.L., Smith, J., Fletcher, J.I., et al. (2011). ABCG2 multidrug transporters in childhood neuroblastoma: Clinical and biological effects independent of cytotoxic drug efflux. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1236–1251.

Herget, M., and Tampé, R. (2007). Intracellular peptide transporters in human - Compartmentalization of the “peptidome.” *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 453, 591–600.

Higgins, C.F. (1992). ABC transporters : from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67–113.

Hipfner, D.R., and Cohen, S.M. (2004). Connecting proliferation and apoptosis in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 805–815.

Hooijberg, J.H., Broxterman, H.J., Kool, M., Assaraf, Y.G., Peters, G.J., Noordhuis, P., Scheper, R.J., Borst, P., Pinedo, H.M., and Jansen, G. (1999). Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.* 59, 2532–2535.

Hubbard, S.R. (1999). Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71, 343–358.

Hwang, T.S., Han, H.S., Hong, Y.C., Lee, H.J., and Paik, N.S. (2003). Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Pathol. Int.* 53, 74–80.

Imai, Y., Ishikawa, E., Asada, S., and Sugimoto, Y. (2005). Estrogen-Mediated Post transcriptional Down-regulation of Breast Cancer Resistance Protein / ABCG2. *Cancer Res.* 65, 596–605.

Inwald, E.C., Klinkhammer-Schalke, M., Hofstädter, F., Zeman, F., Koller, M., Gerstenhauer, M., and Ortmann, O. (2013). Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: Results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res. Treat.* 139, 539–552.

Ishikawa, T. (1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump.

Trends Biochem. Sci. *17*, 463–468.

Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. Trends Genet. *20*, 563–569.

Jang, M., Kim, E., Choi, Y., Lee, H., Kim, Y., Kim, J., Kang, E., Kim, S.-W., Kim, I., and Park, S. (2012). FGFR1 is amplified during the progression of in situ to invasive breast carcinoma. Breast Cancer Res. *14*, R115.

Jemal, A., Bray, F., and Ferlay, J. (1999). Global Cancer Statistics: 2011. CA Cancer J Clin *49*, 1,33-64.

Johnson, DE. Williams, L. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. Adv Cancer Res. *60*, 1–41.

Jordan, V.C. (2003). Tamoxifen: A most unlikely pioneering medicine. Nat. Rev. Drug Discov. *2*, 205–213.

Kalkat, M., De Melo, J., Hickman, K.A., Lourenco, C., Redel, C., Resetca, D., Tamachi, A., Tu, W.B., and Penn, L.Z. (2017). MYC deregulation in primary human cancers. Genes (Basel). *8*, 2–30.

Kanzaki, a, Toi, M., Nakayama, K., Bando, H., Mutoh, M., Uchida, T., Fukumoto, M., and Takebayashi, Y. (2001). Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma. Jpn. J. Cancer Res. *92*, 452–458.

Kato, G.J., Lee, W.M.F., Chen, L., and Dang, C. V. (1992). Max: Functional domains and interaction with c-Myc. Genes Dev. *6*, 81–92.

Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M.C.U., Voduc, D., Speers, C.H., Nielsen, T.O., and Gelmon, K. (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. J. Clin. Oncol. *28*, 3271–3277.

Kim, B., Fatayer, H., Hanby, A.M., Horgan, K., Perry, S.L., Valleley, E.M.A., Verghese, E.T., Williams, B.J., Thorne, J.L., and Hughes, T.A. (2013). Neoadjuvant Chemotherapy Induces Expression Levels of Breast Cancer Resistance Protein That Predict Disease-Free Survival in Breast Cancer. PLoS One *8*, 1–8.

König, J., Hartel, M., Nies, A.T., Martignoni, M.E., Guo, J., Büchler, M.W., Friess, H., and Keppler, D. (2005). Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. Int. J. Cancer *115*, 359–367.

Koo, J.S., and Jung, W. (2011). Clinicopathologic and Immunohistochemical Characteristics of Triple Negative Invasive Lobular Carcinoma. Yonsei Med. J. *52*, 89–97.

Koziczak, M., Holbro, T., and Hynes, N.E. (2004). Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins. Oncogene *23*, 3501–3508.

- Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., and Frei, E. (2003). *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th edition (BC Decker).
- Kuss, B.J., Corbo, M., Lau, W.M., Fennell, D.A., Dean, N.M., and Cotter, F.E. (2002). In vitro and in vivo downregulation of MRP1 by antisense oligonucleotides: A potential role in neuroblastoma therapy. *Int. J. Cancer* *98*, 128–133.
- Lakhani, S.R., Reis-filho, J.S., Fulford, L., Penault-llorca, F., Van, M., Parry, S., Bishop, T., Benitez, J., Rivas, C., Bignon, Y., i sar. (2005). Prediction of BRCA1 Status in Patients with Breast Cancer Using Estrogen Receptor and Basal Phenotype Prediction of BRCA1 Status in Patients with Breast Cancer Using Estrogen Receptor and Basal Phenotype. *11*, 5175–5180.
- Leake, R. (2000). Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. *J. Clin. Pathol.* *53*, 634–635.
- Lee, H.J., Seo, A.N., Park, S.Y., Kim, J.Y., Park, J.Y., Yu, J.H., Ahn, J.-H., and Gong, G. (2014). Low Prognostic Implication of Fibroblast Growth Factor Family Activation in Triple-negative Breast Cancer Subsets. *Ann. Surg. Oncol.* 1561–1568.
- Leonard, G.D. (2003). The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Oncologist* *8*, 411–424.
- Leonessa, F., and Clarke, R. (2003). ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* *10*, 43–73.
- Létourneau, I.J., Deeley, R.G., and Cole, S.P.C. (2005). Functional characterization of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the gene encoding human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pharmacogenet. Genomics* *15*, 647–657.
- Levitt, N.C., and Hickson, I.D. (2002). Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol. Med.* *8*, 179–186.
- Liang, S.C., Yang, C.Y., Tseng, J.Y., Wang, H.L., Tung, C.Y., Liu, H.W., Chen, C.Y., Yeh, Y.C., Chou, T.Y., Yang, M.H., i sar. (2015). ABCG2 Localizes to the Nucleus and Modulates CDH1 Expression in Lung Cancer Cells. *Neoplasia* *17*, 265–278.
- Liao, D.J., and Dickson, R.B. (2000). c-Myc in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* *7*, 143–164.
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K.R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. a., Symmans, W.F., Gonzalez-Angulo, A.M., Hennessy, B., Green, M., i sar. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* *26*, 1275–1281.
- Liu, D., He, J., Yuan, Z., Wang, S., Peng, R., Shi, Y., Teng, X., and Qin, T. (2012). EGFR expression correlates with decreased disease-free survival in triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med. Oncol.* *29*, 401–405.

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408.
- Livasy, C. a, Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M.S., Olopade, O.I., Moore, D.T., and Perou, C.M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol.* 19, 264–271.
- Loging, W.T., and Reisman, D. (1999). Inhibition of the putative tumor suppressor gene TIMP-3 by tumor-derived p53 mutants and wild type p53. *Oncogene* 18, 7608–7615.
- Longley, D., and Johnston, P. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* 205, 275–292.
- De Luca, A., Frezzetti, D., Gallo, M., and Normanno, N. (2017). FGFR-targeted therapeutics for the treatment of breast cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* 26, 303–311.
- Lv, N., Xie, X., Ge, Q., Lin, S., Wang, X., Kong, Y., Shi, H., Xie, X., and Wei, W. (2011). Epidermal growth factor receptor in breast carcinoma: association between gene copy number and mutations. *Diagn. Pathol.* 6, 118.
- Macfarland, A., Abramovich, D.R., Ewen, S.W.B., and Pearson, C.K. (1994). Stage-specific distribution of P-glycoprotein in first-trimester and full-term human placenta. *Histochem. J.* 26, 417–423.
- Malchers, F., Dietlein, F., Schöttle, J., Lu, X., Nogova, L., Albus, K., Fernandez-Cuesta, L., Heuckmann, J.M., Gautschi, O., Diebold, J., i sar. (2014). Cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of transformation by amplified FGFR1 in lung cancer. *Cancer Discov.* 4, 246–257.
- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2014). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* 10, 955–960.
- Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C.L.M., Schinkel, A.H., van de Vijver, M.J., Scheper, R.J., and Schellens, J.H.M. (2001). Subcellular Localization and Distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues. *Cancer Res.* 61, 3458–3464.
- Marcil, M., Brooks-Wilson, A., Clee, S.M., Roomp, K., Zhang, L.H., Yu, L., Collins, J.A., Van Dam, M., Molhuizen, H.O.F., Loubster, O., i sar. (1999). Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* 354, 1341–1346.
- McMahon, S.B. (2014). MYC and the Control of Apoptosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, a014407–a014407.
- Meyer, P., Landgraf, K., Högel, B., Eiermann, W., and Ataseven, B. (2012). BRCA2 Mutations and Triple-Negative Breast Cancer. *PLoS One* 7, e38361.
- Millikan, R.C., Newman, B., Tse, C.-K., Moorman, P.G., Conway, K., Dressler, L.G.,

- Smith, L. V, Labbok, M.H., Geradts, J., Bensen, J.T., i sar. (2008). Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *109*, 123–139.
- Moelans, C.B., de Weger, R.A., Monsuur, H.N., Vijzelaar, R., and van Diest, P.J. (2010). Molecular profiling of invasive breast cancer by multiplex ligation-dependent probe amplification-based copy number analysis of tumor suppressor and oncogenes. *Mod. Pathol.* *23*, 1029–1039.
- Moureau-Zabotto, L., Ricci, S., Lefranc, J.P., Coulet, F., Genestie, C., Antoine, M., Uzan, S., Lotz, J.P., Touboul, E., and Lacave, R. (2006). Prognostic impact of multidrug resistance gene expression on the management of breast cancer in the context of adjuvant therapy based on a series of 171 patients. *Br. J. Cancer* *94*, 473–480.
- Mukohara, T. (2015). Pi3k mutations in breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer Targets Ther.* *7*, 111–123.
- Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A., and Sutherland, R.L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 558–572.
- Nakai, K., Hung, M.C., and Yamaguchi, H. (2016). A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *Am. J. Cancer Res.* *6*, 1609–1623.
- Nakajima, H., Ishikawa, Y., Furuya, M., Sano, T., Ohno, Y., Horiguchi, J., and Oyama, T. (2012). Protein expression, gene amplification, and mutational analysis of EGFR in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer* *2*, 66–74.
- Namisaki, T., Schaeffeler, E., Fukui, H., Yoshiji, H., Nakajima, Y., Fritz, P., Schwab, M., and Nies, A.T. (2014). Differential Expression of Drug Uptake and Efflux Transporters in Japanese Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Drug Metab. Dispos.* *42*, 2033–2040.
- Neumeister, P., Pixley, F.J., Xiong, Y., Xie, H., Wu, K., Ashton, A., Cammer, M., Chan, A., Symons, M., Stanley, E.R., i sar. (2003). Cyclin D1 Governs Adhesion and Motility of Macrophages. *Mol. Biol. Cell* *14*, 2005–2015.
- NF, B., Guo, H., LJ, M., Sun, L., Stone, J., Fishell, E., RA, J., Hislop, G., Chiarelli, A., Minkin, S., i sar. (2007). Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med* *356*, 227–236.
- Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., i sar. (2004). Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal- Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *10*, 5367–5374.
- Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, a C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., and Devilee, P. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* *342*, 705–708.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D.S. (2006). Epidermal

growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366, 2–16.

Ohsawa, M., Ikura, Y., Fukushima, H., Shirai, N., Sugama, Y., Suekane, T., Hirayama, M., Hino, M., and Ueda, M. (2005). Immunohistochemical expression of multidrug resistance proteins as a predictor of poor response to chemotherapy and prognosis in patients with nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Oncology* 68, 422–431.

Olayioye, M. a, Neve, R.M., Lane, H. a, and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19, 3159–3167.

Omran, O.M. (2012). The Prognostic Value of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Expression in Breast Carcinomas. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 31, 367–376.

Osborne, C. (2004). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *Oncologist* 9, 361–377.

Oselin, K., Mrozikiewicz, P.M., Gaikovitch, E., Pähkla, R., and Roots, I. (2003). Frequency of MRP1 genetic polymorphisms and their functional significance in Caucasians: Detection of a novel mutation G816A in the human MRP1 gene. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 59, 347–350.

Park, H.S., Jang, M.H., Kim, E.J., Kim, H.J., Lee, H.J., Kim, Y.J., Kim, J.H., Kang, E., Kim, S.-W., Kim, I.A., i sar. (2014). High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod. Pathol.* 1–11.

Park, K., Han, S., Shin, E., Kim, H.J., and Kim, J.Y. (2007). EGFR gene and protein expression in breast cancers. *Eur. J. Surg. Oncol.* 33, 956–960.

Park, Y.S., Na, Y.-S., Ryu, M.-H., Lee, C.-W., Park, H.J., Lee, J.-K., Park, S.R., Ryoo, B.-Y., and Kang, Y.-K. (2015). FGFR2 Assessment in Gastric Cancer Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, Fluorescent In Situ Hybridization, and Immunohistochemistry. *Am. J. Clin. Pathol.* 143, 865–872.

Parkin, D.M. (2004). International variation. *Oncogene* 23, 6329–6340.

Parris, T.Z., Kovács, A., Hajizadeh, S., Nemes, S., Semaan, M., Levin, M., Karlsson, P., and Helou, K. (2014). Frequent MYC coamplification and DNA hypomethylation of multiple genes on 8q in 8p11-p12-amplified breast carcinomas. *Oncogenesis* 3, e95.

Pawlowski, V., Revillion, F., Hebbar, M., Hornez, L., and Peyrat, J.P. (2000). Prognostic value of the type I growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin. Cancer Res.* 6, 4217–4225.

Peaston, A.E., Gardaneh, M., Franco, A. V., Hocker, J.E., Murphy, K.M., Farnsworth, M.L., Catchpoole, D.R., Haber, M., Norris, M.D., Lock, R.B., i sar. (2001). MRP1 gene expression level regulates the death and differentiation response of neuroblastoma cells. *Br. J. Cancer* 85, 1564–1571.

Peddi, P.F., Ellis, M.J., and Ma, C. (2012). Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy. *Int. J. Breast Cancer* 2012, 217185.

Pitot, H.C. (1993). The Molecular Biology of Carcinogenesis. *Cancer* 72, 962–970.

Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J. Clin. Invest.* 117, 3155–3163.

Porta, R., Borea, R., Coelho, A., Khan, S., Araújo, A., Reclusa, P., Franchina, T., Van Der Steen, N., Van Dam, P., Ferri, J., i sar. (2017). FGFR a promising druggable target in cancer: Molecular biology and new drugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 113, 256–267.

Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12, R68.

Qie, S., and Diehl, J.A. (2016). Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J. Mol. Med.* 94, 1313–1326.

Rakha, E.A., El-Sayed, M.E., Powe, D.G., Green, A.R., Habashy, H., Grainge, M.J., Robertson, J.F.R., Blamey, R., Gee, J., Nicholson, R.I., i sar. (2008). Invasive lobular carcinoma of the breast: Response to hormonal therapy and outcomes. *Eur. J. Cancer* 44, 73–83.

Reis-Filho, J.S., Simpson, P.T., Turner, N.C., Lambros, M.B., Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Sarrio, D., Savage, K., Dexter, T., i sar. (2006a). FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 12, 6652–6662.

Reis-Filho, J.S., Savage, K., Lambros, M.B.K., James, M., Steele, D., Jones, R.L., and Dowsett, M. (2006b). Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis. *Mod. Pathol.* 19, 999–1009.

Riese, D.J., and Stern, D.F. (1998). Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays* 20, 41–48.

Robanus-Maandag, E.C., Bosch, C.A.J., Kristel, P.M., Hart, A.A.M., Faneyte, I.F., Nederlof, P.M., Peterse, J.L., and van de Vijver, M.J. (2003). Association of C-MYC amplification with progression from the in situ to the invasive stage in C-MYC-amplified breast carcinomas. *J. Pathol.* 201, 75–82.

Rosebrock, A., Caban, J.J., Figueroa, J., Gierach, G., Linville, L., Hewitt, S., and Sherman, M. (2013). Quantitative analysis of TDLUs using adaptive morphological shape techniques. In *Proceedings of SPIE*, M.N. Gurcan, and A. Madabhushi, eds. p. 86760N.

Rosenberg, M.F., Mao, Q., Holzenburg, a., Ford, R.C., Deeley, R.G., and Cole, S.P.C. (2001). The Structure of the Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1): CRYSTALLIZATION AND SINGLE-PARTICLE ANALYSIS. *J. Biol. Chem.* 276, 16076–

16082.

Roy, P.G., and Thompson, A.M. (2006). Cyclin D1 and breast cancer. *Breast* 15, 718–727.

Roy, P.G., Pratt, N., Purdie, C.A., Baker, L., Ashfield, A., Quinlan, P., and Thompson, A.M. (2010). High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer. *Int. J. Cancer* 127, 355–360.

Seo, A.N., Jin, Y., Lee, H.J., Sun, P.L., Kim, H., Jheon, S., Kim, K., Lee, C.T., and Chung, J.H. (2014). FGFR1 amplification is associated with poor prognosis and smoking in non-small-cell lung cancer. *Virchows Arch.* 465, 547–558.

Shackney, S.E., and Silverman, J.F. (2003). Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv. Anat. Pathol.* 10, 278–290.

Shao, M.-M., Zhang, F., Meng, G., Wang, X.-X., Xu, H., Yu, X.-W., Chen, L.-Y., and Tse, G.M. (2011). Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein overexpression in basal-like carcinoma of the breast. *Histopathology* 59, 264–273.

Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672–1677.

Shukla, S., Ohnuma, S., and Ambudkar, S. V (2011). Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Curr. Drug Targets* 12, 621–630.

Simpson, P.T., Reis-Filho, J.S., Gale, T., and Lakhani, S.R. (2005). Molecular evolution of breast cancer. *J. Pathol.* 205, 248–254.

Singletery, S.E., Allred, C., Ashley, P., Bassett, L.W., Berry, D., Bland, K.I., Borgen, P.I., Clark, G., Edge, S.B., Hayes, D.F., et al. (2002). Revision of the American Joint Committee on cancer staging system for breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 20, 3628–3636.

Sissung, T.M., Baum, C.E., Kirkland, C.T., Gao, R., Gardner, E.R., and Figg, W.D. (2010). Pharmacogenetics of membrane transporters: an update on current approaches. *Mol. Biotechnol.* 44, 152–167.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10869–10874.

Sousa, V., Reis, D., Silva, M., Alarcão, A.M., Ladeirinha, A.F., d'Aguiar, M.J., Ferreira, T., Caramujo-Balseiro, S., and Carvalho, L. (2016). Amplification of FGFR1 gene and expression of FGFR1 protein is found in different histological types of lung carcinoma. *Virchows Arch.* 469, 173–182.

Sun, W., and Yang, J. (2010). Functional mechanisms for human tumor suppressors. *J. Cancer* 1, 136–140.



Takahashi, K., Kimura, Y., Nagata, K., Yamamoto, A., Matsuo, M., and Ueda, K. (2005). ABC proteins: Key molecules for lipid homeostasis. *Med. Mol. Morphol.* *38*, 2–12.

Tamura, A., Onishii, Y., An, R., Koshiba, S., Wakabayashi, K., Hoshijima, K., Priebe, W., Yoshida, T., Kometani, S., Matsubara, T., i sar. (2007). In Vitro Evaluation of Photosensitivity Risk Related to Genetic Polymorphisms of Human ABC Transporter ABCG2 and Inhibition by Drugs. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *22*, 428–440.

Thompson, M.E., Jensen, R. a, Obermiller, P.S., Page, D.L., and Holt, J.T. (1995). Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat. Genet.* *9*, 444–450.

Tiede, B., and Kang, Y. (2011). From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy and breast cancer. *Cell Res.* *21*, 245–257.

Tomiguchi, M., Yamamoto, Y., Yamamoto-ibusuki, M., Goto-yamaguchi, L., Fujiki, Y., Fujiwara, S., Sueta, A., Hayashi, M., Takeshita, T., Inao, T., i sar. (2016). Fibroblast growth factor receptor-1 protein expression is associated with prognosis in estrogen receptor-positive / human epidermal growth factor receptor-2-negative primary breast cancer. *Cancer Sci.* *107*, 491–498.

Tomlinson, D.C., Baxter, E.W., Loadman, P.M., Hull, M.A., and Knowles, M.A. (2012). FGFR1-induced Epithelial to mesenchymal transition through MAPK/PLCγ/COX-2-mediated mechanisms. *PLoS One* *7*.

Toyama, T., Yamashita, H., Kondo, N., Okuda, K., Takahashi, S., Sasaki, H., Sugiura, H., Iwase, H., and Fujii, Y. (2008). Frequently increased epidermal growth factor receptor (EGFR) copy numbers and decreased BRCA1 mRNA expression in Japanese triple-negative breast cancers. *BMC Cancer* *8*, 309.

Travis, R.C., and Key, T.J. (2003). Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* *5*, 239–247.

Tsutsui, S., Ohno, S., Murakami, S., Hachitanda, Y., and Oda, S. (2002). Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *71*, 67–75.

Turner, N., Pearson, A., Sharpe, R., Lambros, M., Geyer, F., Lopez-Garcia, M.A., Natrajan, R., Marchio, C., Iorns, E., Mackay, A., i sar. (2010). FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* *70*, 2085–2094.

Untch, M., and Lück, H.J. (2010). Lapatinib - Member of a new generation of ErbB-Targeting drugs. *Breast Care* *5*, 8–12.

Vaziri, S. a, Tubbs, R.R., Darlington, G., and Casey, G. (2001). Absence of CCND1 gene amplification in breast tumours of BRCA1 mutation carriers. *Mol. Pathol.* *54*,

259–263.

Versantvoort, C.H.M., Broxterman, H.J., Pinedo, H.M., De Vries, E.G.E., Feller, N., Kuiper, C.M., and Lankelma, J. (1992). Energy-dependent processes involved in reduced drug accumulation in multidrugresistant human lung cancer cell lines without P-glycoprotein expression. *Cancer Res.* *52*, 17–23.

Vineis, P., Schatzkin, A., and Potter, J.D. (2010). Models of carcinogenesis: An overview. *Carcinogenesis* *31*, 1703–1709.

Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* *10*, 789–799.

Warburg, O. (1925). The Metabolism of Carcinoma Cells. *J. Cancer Res.* *9*, 148–163.

Waters, C.M., Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Moore, J.P., and Evan, G.I. (1991). c-myc protein expression in untransformed fibroblasts. *Oncogene* *6*, 797–805.

Wee, P., and Wang, Z. (2017). Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers (Basel)*. *9*, 1–45.

Witton, C.J., Reeves, J.R., Going, J.J., Cooke, T.G., and Barlett, J.M.S. (2003). Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J. Pathol.* *200*, 290–297.

Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., et al. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* *25*, 118–145.

Xiang, L., Su, P., Xia, S., Liu, Z., Wang, Y., Gao, P., and Zhou, G. (2011). ABCG2 is associated with HER-2 expression, lymph node metastasis and clinical stage in breast invasive ductal carcinoma. *Diagn. Pathol.* *6*, 90.

Xu, J., Chen, Y., and Olopade, O.I. (2010). MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer* *1*, 629–640.

Yabuuchi, H., Takayanagi, S., Ichiro, Yoshinaga, K., Taniguchi, N., Aburatani, H., and Ishikawa, T. (2002). ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *299*, 410–417.

Yamada, A., Ishikawa, T., Ota, I., Kimura, M., Shimizu, D., Tanabe, M., Chishima, T., Sasaki, T., Ichikawa, Y., Morita, S., et al. (2013). High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival. *Breast Cancer Res. Treat.* *137*, 773–782.

Yang, J., Zhao, H., Xin, Y., and Fan, L. (2014). MicroRNA-198 inhibits proliferation and induces apoptosis of lung cancer cells via targeting FGFR1. *J. Cell. Biochem.* *115*, 987–995.

Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 127–137.

Zaman, G.J., Flens, M.J., van Leusden, M.R., de Haas, M., Mulder, H.S., Lankelma, J., Pinedo, H.M., Scheper, R.J., Baas, F., and Broxterman, H.J. (1994). The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 8822–8826.

Zhang, M., Zhang, X., Zhao, S., Wang, Y., Di, W., Zhao, G., Yang, M., and Zhang, Q. (2014). Prognostic value of survivin and EGFR protein expression in triple-negative breast cancer (TNBC) patients. *Target. Oncol.* *9*, 349–357.

Zhu, X., Shan, L., Wang, F., Wang, J., Wang, F., Shen, G., Liu, X., Wang, B., Yuan, Y., Ying, J., et al. (2015). Hypermethylation of BRCA1 gene: implication for prognostic biomarker and therapeutic target in sporadic primary triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *150*, 479–486.

## STRUČNA BIOGRAFIJA

Milica Nedeljković rođena je 30.08.1984. godine u Užicu. Osnovne studije upisala je 2003. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2009. godine sa prosečnom ocenom 9.11, odbranom diplomskog rada pod nazivom "Polimorfizam IL-10 T3575.A kod bolesnika od Oralnog Lichen Planus-a". Diplomski rad uradila je u laboratoriji Instituta za medicinska istraživanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd.

Školske 2010/2011. godine upisala je poslediplomske, doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Molekularna biologija, smer Molekularna biologija eukariota.

Od oktobra 2011. zaposlena je u Laboratoriji za imunologiju, Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. U zvanje istraživač-saradnik izabrana je 2015. godine.

Do sada je publikovala 2 rada u časopisima od međunarodnog značaja i 5 saopštenje u zbornicima naučnih skupova. Od 2011. godine član je Evropskog udruženja za istraživanje raka (EACR), kao i Srpskog društva istraživača raka (SDIR).

Trenutno je angažovana na projektu "Identifikacija molekularnih markera za predikciju progresije tumora, odgovora na terapiju i ishoda bolesti" (III41031) finansirnog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Милица Недељковић

број индекса M3014/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларно профилисање и карактеризација троструко негативних и хормонски зависних тумора дојке

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 26.07. 2018.

  
\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Недељковић

Број индекса M3014/2010

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Молекуларно профилисање и карактеризација троструко негативних и хормонски зависних тумора дојке

Ментор др Никола Танић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања Синиша Станковић, Универзитет у Београду; др Гордана Коњевић, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије – у пензији од 3.12.2017.

Потписани/а Милица Недељковић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 26.07.2018.

  
\_\_\_\_\_

**Прилог 3.**

## **Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Молекуларно профилисање и карактеризација троструко негативних и хормонски зависних тумора дојке

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

**3. Ауторство – некомерцијално – без прераде**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима


5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 26.07. 2018.

  
\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

**3. Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.



