



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КЛИНИЧКА ИСТРАЖИВАЊА

**МОЛЕКУЛАРНА И ГЕНСКА ХЕТЕРОГЕНОСТ
МЕТАСТАЗА У АКСИЛАРНИМ ЛИМФНИМ
ЧВОРОВИМА КОД ПАЦИЈЕНТКИЊА СА
ИНВАЗИВНИМ КАРЦИНОМОМ ДОЈКЕ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментори: Проф. др Тибор Тот
Проф. др Живка Ери

Кандидат: др ИЛИЈА БАРОШ

Нови Сад, 2019. године

Ѓорѓи, Жосип и Сирахињи

„Љубав је једини ваздух који сам удисао.
И осмех једини језик који на свету разумем.“

Мика Антић

Менторима, проф. Живки Ери и проф. Тидору Тоџу, на несебичној подршци и помоћи да
ова дисертација угледа светло дана. Хвала што сте веровали у мене и олакшавали
птерет у моментима кад сам поустајао.

Лекарима и лаборантима Одељења за клиничку патологију и цитологију Окружне болнице
Фралун- Шведска, посебно Хелени и Џурики.

Родитељима Боји и Владимиру на љубави и пожртвованости.

Породици, посебно Бранку и Мари, на помоћи кад је било најтеже,

Проф. Биљани Звездин, на несебичној, искреној, пријатељској подршци,

Пријатељима: Наџани, Маји, Занијелу, Сани, Маленој,... били сте уз мене кад је било
тешко али и кад је било најлепше,

Монаху Серџију, на духовној подршци и молитвама.

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада (дипл., маг., докт.): ВР	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: АУ	Илија Барош
Ментори (титула, име, презиме, звање): МН	Проф. др Тибор Тот, ванредни професор Проф. др Живка Ери, редовни професор
Наслов рада: НР	Молекуларна и генска хетерогеност метастаза у аксиларним лимфним чворовима код пацијенткиња са инвазивним карциномом дојке
Језик публикације: ЈП	српски
Језик извода: ЈИ	срп. / енг.
Земља публикавања: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	Војводина
Година: ГО	2019.
Издавач: ИЗ	ауторски репринт
Место и адреса: МА	Република Србија, Нови Сад, Улица Хајдук Вељкова 3

Физички опис рада: ФО	(број поглавља: 7/ страница: 80/ слика: 10/ графикана: 4/ табела: 13/референци: 96)
Научна област: НО	Медицинске науке
Научна дисциплина: НД	Патологија
Предметна одредница, кључне речи: ПО	неоплазме дојке; лимфне метастазе; лимфни чворови; HER2 рецептор; <i>HER2</i> ген; генска хетерогеност; генска амплификација; имунохистохемија; <i>in situ</i> хибридизација
УДК	618.19-006.6-033.2 616.428-006:577.2
Чува се: ЧУ	Библиотека Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду, Хајдук Вељкова 3
Важна напомена: ВН	нема
Извод: ИЗ	<i>HER2 Gene-Protein Assay (GPA)</i> је посебно погодан за истовремено процењивање експресије HER2 протеина и статуса амплификације <i>HER2</i> гена на нивоу појединачних ћелија и њихово повезивање са ћелијском морфологијом. Циљ истраживања био је испитати да ли су постојећи критеријуми препоручени од стране ASCO/CAP довољни за дијагностиковање HER2 позитивности код пацијенткиња које показују интратуморску хетерогеност, како у примарним туморима тако и у метастазама у регионалне лимфне чворове, учесталост HER2 хетерогености у макрометастазама лоцираним у лимфним чворовима, те да ли постоји јасна корелација између хетерогености нађене у примарном тумору дојке и припадајућим метастазама у лимфним чворовима. Испитивање је обухватило 41 од планиране 51 пацијенткиње које су испуниле све критеријуме укључивања. Репрезентативни парафински блокови метастатских лимфних чворова одабрани су из архивираног материјала, обојени <i>GPA</i> методом и процењени у складу са критеријумима <i>ASCO/CAP 2013</i> . Анализирано је 120 ћелија у хистолошком резу сваког метастатског

	<p>лимфног чвора. Статус HER2 се разликовао између примарног тумора и његових метастаза у 13,2% (5/38) случајева. Један случај HER2 позитивног примарног тумора имао је HER2 негативне метастазе, два додатна случаја са HER2 позитивним примарним тумором су имала метастазе са статусом граничне амплификације без прекомерне експресије HER2 протеина и два случаја са HER2 негативним примарним тумором су имала метастазе са статусом граничне амплификације без прекомерне експресије HER2 протеина. У 17,4% (4/23) случајева са HER2 не-амплификованим примарним тумором метастазе су постале граничне у статусу генске амплификације. Једна од четири метастазе HER2 негативног примарног тумора показала је мали фокус HER2 позитивних туморских ћелија (<3% тумора). Микрохетерогеност је анализирана у 108 лимфних чворова код 38 пацијенткиња и уочена у 22 лимфна чвора, тј. код четири пацијенткиње у свим анализираним лимфним чворовима, док је код једне пацијенткиње од 4 анализираних лимфних чворова микрохетерогеност потврђена у једном лимфном чвору. На основу добијених резултата може се закључити да постојећи критеријуми препоручени од стране ASCO/CAP применом прихваћених метода нису довољни за дијагностиковање HER2 позитивности код пацијенткиња које показују интратуморску и интертуморску хетерогеност како у примарним туморима тако и у метастазама, те да постоји статистички високо сигнификантан број макрометастаза лоцираних у лимфним чворовима које показују HER2 хетерогеност и позитивна корелација између хетерогености нађене у примарним туморима и припадајућим метастазама у лимфним чворовима.</p>
<p>Датум прихватања теме од стране Сената: ДП</p>	<p>16. новембар 2017.</p>

Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / назив организације / статус) КО	председник: члан: члан:

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
MEDICAL FACULTY**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD, Thesis
Author: AU	Ilija Baroš
Mentors: MN	Prof. dr Tibor Tot, MD, PhD Prof. dr Živka Eri, MD, PhD
Title: TI	Molecular and genetic heterogeneity of axillary lymph node metastases in breast cancer patients
Language of text: LT	Serbian (Cyrillic)
Language of abstract: LA	eng. / ser.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Chapters: 7 / Pages: 80 / Pictures: 10 / Graphics: 4 / Tables: 13 / References: 96
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pathology
Subject, Key words SKW	Breast Neoplasms; Lymphatic Metastasis; Lymph Nodes; Receptor, ErbB-2; Genes, ErbB-2; Genetic Heterogeneity; Gene Amplification; Immunohistochemistry; In Situ Hybridization
UC	618.19-006.6-033.2 616.428-006:577.2
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	none
Abstract: AB	<p>HER2 Gene Protein Assay (GPA) is particularly convenient to simultaneously assess the expression of HER2 protein and the amplification status of the HER2 gene at individual cell level and to correlate them with cellular morphology. The aim of the study was to examine whether the existing criteria recommended by ASCO / CAP are sufficient for diagnosing HER2 positivity in patients showing intratumoral heterogeneity, both in primary tumors and in metastases in regional lymph nodes, the frequency of HER2 heterogeneity in macrometastases located in the lymph nodes, and whether there is a clear correlation between the heterogeneity found in the primary tumor of the breast and the associated metastases in the lymph nodes. The study included 41 of the planned 51 female patients which fulfilling all the inclusion criteria. Representative paraffin blocks of metastatic lymph nodes were selected from archived material, stained with the GPA and assessed in accordance with the ASCO/CAP 2013 criteria. We analyzed 120 cells per section of each metastatic lymph node. The HER2 status differed between the primary tumor and</p>

	<p>its metastases in 13.2% (5/38) of the cases. A single case of HER2 positive primary tumor had HER2 negative metastases, two additional cases with HER2 positive primary tumor had metastases with equivocal amplification status without protein overexpression and two cases with HER2 negative primary tumors had metastases with equivocal amplification status without protein overexpression. The HER2 status of the lymph node metastases within the same patient having at least two metastatic nodes showed only subtle variations. In 17.4% (4/23) of the cases with HER2 non-amplified primary tumor the metastases became equivocal in gene-amplification status. One out of the four metastases of a HER2 negative primary tumor showed a small focus of HER2 positive tumor cells (<3% of the tumor). Microheterogeneity was analyzed in 108 lymph nodes in 38 patients and observed in 22 lymph nodes, i.e. in four patients in all analyzed lymph nodes, while in one patient of 4 lymph node analyzed, microheterogeneity was confirmed in one lymph node. Based on the obtained results, it can be concluded that the existing criteria recommended by ASCO / CAP using the accepted methods are not sufficient to diagnose HER2 positivity in patients showing intratumoral and intertumoral heterogeneity both in primary tumors and in metastases, and that there is statistically significant number of macrometases located in the lymph nodes showing HER2 heterogeneity and a positive correlation between the heterogeneity found in primary tumors and associated metastases in the lymph nodes.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>16th November 2017</p>
<p>Defended: DE</p>	

Thesis Defend Board: DB	president: member: member:
----------------------------	----------------------------------

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	2
1.1. Карцином дојке	2
1.1.1. Епидемиологија.....	2
1.1.2. Етиологија и патогенеза.....	6
1.1.3. Молекуларни механизми карциногенезе и прогресије тумора.....	9
1.2. Класификација карцинома дојке.....	12
1.3. Молекуларна класификација карцинома дојке.....	13
1.4. Прогностички и предиктивни фактори.....	17
1.4.1. Патолошки фактори.....	18
1.4.2. Предиктивни фактори.....	25
1.5. <i>HER-2</i> рецептор (рецептор за хумани епидермални фактор раста 2)	26
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	36
2.1. Основне хипотезе.....	37
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	38
4. РЕЗУЛТАТИ.....	45
4.1. Карактеристике кохорте.....	45
4.2. Резултати <i>GPA</i> процене.....	47
4.3. Поређење <i>HER2</i> статуса примарног тумора и метастаза у лимфним чворовима.....	49
4.4. Интернодална <i>HER2</i> хетерогеност.....	51
4.5. Интратуморска (интранодална) хетерогеност.....	53
4.6. Микрохетерогеност.....	55
5. ДИСКУСИЈА.....	57
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	66
7. ЛИТЕРАТУРА.....	67

1. УВОД

1.1. Карцином дојке

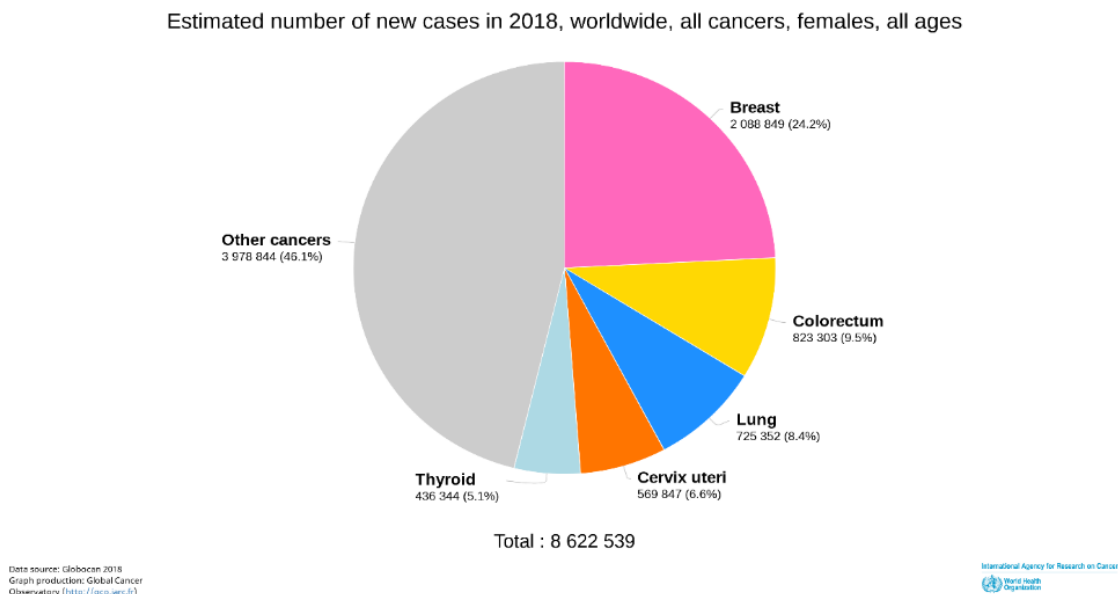
1.1.1. Епидемиологија

Карцином дојке је најчешће дијагностиковани малигни тумор (искључујући немеланомске карциноме коже) код жена у 140 од 180 земаља широм света ¹. Између 2008. и 2012. године инциденција карцинома дојке је порасла за 20%, док је смртност порасла за 14% ¹. Процењује се да тренутно у САД има 3,1 милион пацијенткиња које су преживеле карцином дојке ².

Укупне стопе преживљавања за карцином дојке варирају широм света, али су у порасту, већим делом зато што се највећи број случајева дијагностикује у ранијој и локализованој фази, захваљујући напретку хирургије и других видова терапије. У многим земљама стопа петогодишњег преживљавања код жена са карциномом дојке дијагностикованог у стадијуму I/II (тумор се само проширио на околно ткиво или чворове испод пазуха) је 80–90%. Ако је болест у унапредовалом стадијуму (ширење до удаљених лимфних чворова или органа), стопа преживљавања пада на 24% ³.

Стопа инциденце варира широм света, од 27 на 100.000 у Средњој Африци и Источној Азији до 92 на 100.000 у Северној Америци. То је пети најчешћи узрок смрти од карцинома код жена, са процењених 522 000 смртних случајева (6,4% од укупног броја). То је такође најчешћи разлог смрти од карцинома код жена у регионима са ниском стопом

развоја и/или прихода (14,3% умрлих), а други у регијама са већом стопом развоја и/или прихода (15,4 % смртних случајева), после рака плућа ⁴.

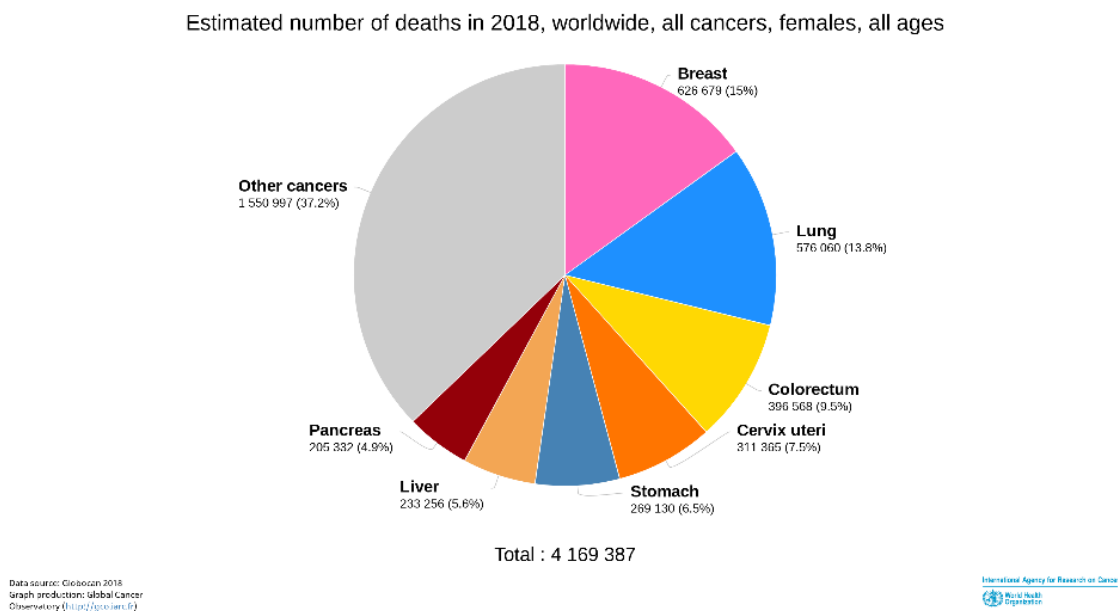


Графикон 1. Процењена инциденца карцинома жена свих узраста у свету

(преузето из WHO-International Agency for Research on Cancer- GLOBOCAN 2018; <http://gco.iarc.fr>)

У Србији, 20,2% оболелих и 18,2% умрлих жена због малигнух тумора има дијагнозу карцинома дојке ⁵. У периоду од 1990. до 2013. године, просечна стандардизована стопа инциденце карцинома дојке на територији централне Србије је износила 50,5/100.000, док је стопа морталитета била 19,2/100000 ⁵. Подаци из 2012. године показују да се у земљама Европске уније просечна годишња инциденца карцинома дојке креће у распону од 58,6/100000 (Грчка) до 147,5/100000 (Белгија), а стопа морталитета од 15,1/100000 (Естонија) до 29,5/100000 (Белгија) ⁶. Исте године у Србији (са Косовом и Метохијом) је забележена инциденца од 92,3/100000 уз стопу морталитета од 31,5/100000 која је на другом месту у Европи, после Македоније (36,3/100000) ⁶.

Према подацима Светске здравствене организације (WHO-*International Agency for Research on Cancer- GLOBOCAN 2018*) процењени број новооткривених случајева карцинома дојке за 2018. годину је готово 25 %, а процењени број смртних исхода узрокованих карциномом дојке је 15% (Графикон 1. и 2.).

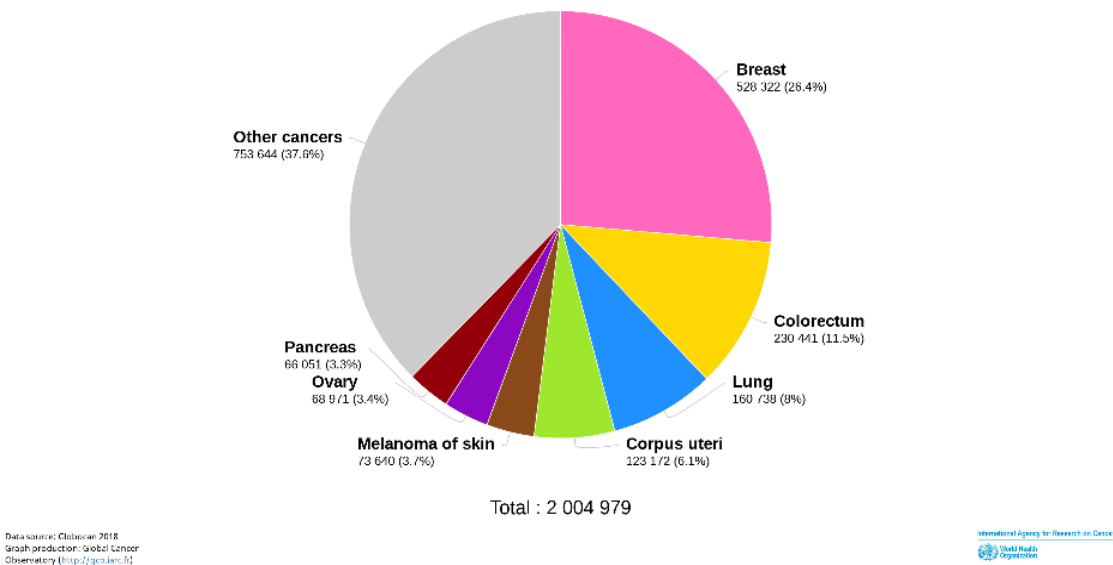


Графикон 2. Морталитет узрокован карциномом код жена свих узраста у свету

(преузето из WHO-*International Agency for Research on Cancer- GLOBOCAN 2018*; <http://gco.iarc.fr>)

Подаци истог истраживања за Србију су нешто виши, како за инциденцију тако и за морталитет (Графикон 3. и 4.).

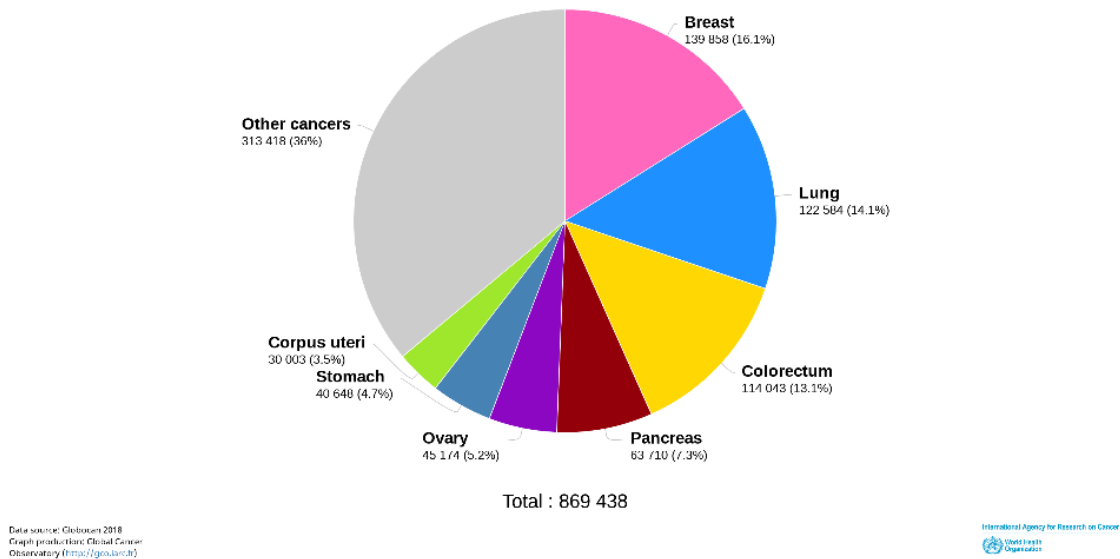
Estimated number of new cases in 2018, Europe, Serbia, all cancers, females, all ages



Графикон 3. Процењена инциденца карцинома жена свих узраста у Србији

(преузето из WHO-International Agency for Research on Cancer- GLOBOCAN 2018; <http://gco.iarc.fr>)

Estimated number of deaths in 2018, Europe, Serbia, all cancers, females, all ages



Графикон 4. Морталитет узрокован карциномом код жена свих узраста у Србији

(преузето из WHO-International Agency for Research on Cancer- GLOBOCAN 2018; <http://gco.iarc.fr>)

1.1.2. Етиологија и патогенеза

Осим женског пола (99% оболелих су жене), као главни фактори ризика наводе се херидитарни (генски) фактори, утицај хормона и фактори животне средине или животног стила.

Око 5% до 10% карцинома је повезано са мутацијама специфичних гена ⁷. Половина, тј. трећина жена са наследним карциномом дојке има мутацију у тумор супресорским генима BRCA1 и BRCA2 (енг. **Breast Cancer**) ⁸. Сматра се да карцином настаје када су оба алела инактивна или дефектна ⁹. BRCA1 (на хромозому 17q21) и BRCA2 (на хромозому 13q12.3) су оба велика гена и стотине разних мутација распоређених у регионима њиховог кодирања су повезани с породичним карциномом дојке. Карциноми дојке повезани са

мутацијом BRCA1 су често лошије диферентовани, имају "медуларне особине" (синцицијални образац раста са „pushing“ маргинама и лимфоцитним одговором) и биолошки су врло слични ER-негативним/HER2-негативним карциномима дојке идентификованим као „Basal-like“, али и са серозним карциномима јајника⁸. Карциноми дојке повезаних са мутацијом BRCA2 такође имају тенденцију да буду релативно лошије диференцирани, али су чешће ER-позитивни у односу на BRCA1 карциноме дојке. Преостали познати гени суцептибилности јављају се у мање од 10% наслеђених карцинома дојки⁸. Мутације у TP53 (*Li-Fraumeni* синдром) и мутације у CHEK2 заједно чине око 8% карцинома дојке узрокованих појединачним геном. Три друга тумора повезана са мутацијама супресорских гена PTEN (*Cowdenov* синдром), STK11 (*Peutz-Jeghers*-ов синдром) и ATM (*ataksia telangiectasia*) присутна су у мање од 1% свих фамилијарних карцинома дојке.

Већина ових гена игра сложене и међусобно повезане улоге у одржавању геномског интегритета. Након што ћелија претпри оштећење ДНК, мора да буде подвргнута заустављању ћелијског циклуса због евентуалне поправке ДНК или умире апоптозом. ATM је осетљив на ДНК оштећења и са p53 и CHEK2 изазива заустављање ћелијског циклуса⁸. BRCA1, BRCA2 и CHEK2 имају важне функције у поправци двоструких прекида ДНК. Ако је било који од ових механизма оштећен, вероватноћа да ће ћелије трајна ДНК оштећења се повећава, а самим тим и мутацијаће бити пропагирана.

Главни фактори ризика за „спорадични“ карцином дојке су у вези са утицајем хормона: пол, време прве менархе и менопаузе, репродуктивна историја, дојење, и егзогени естрогени. Остали доказани или сумњиви фактори ризика пореклом из животне средине укључују зрачење и изложеност хемикалијама са ефектима сличним естрогену.

Естроген јасно функционише као промотор карцинома дојке, вероватно кроз неколико различитих ефеката на ткиво дојке. Излагање хормона стимулише раст дојке током пубертета, менструалних циклуса и трудноће, чиме се повећава број ћелија које могу потенцијално малигно алтерирати. Пролиферација епитела дојке током менструалног циклуса такође погодује акумулацији оштећења ДНК и привременог „успављивања“ деобеног процеса ћелије која се јавља у другом делу менструалног циклуса што може довести до изостанка поправка неисправне ДНК па да мутације постану "фиксне" у геному⁸.

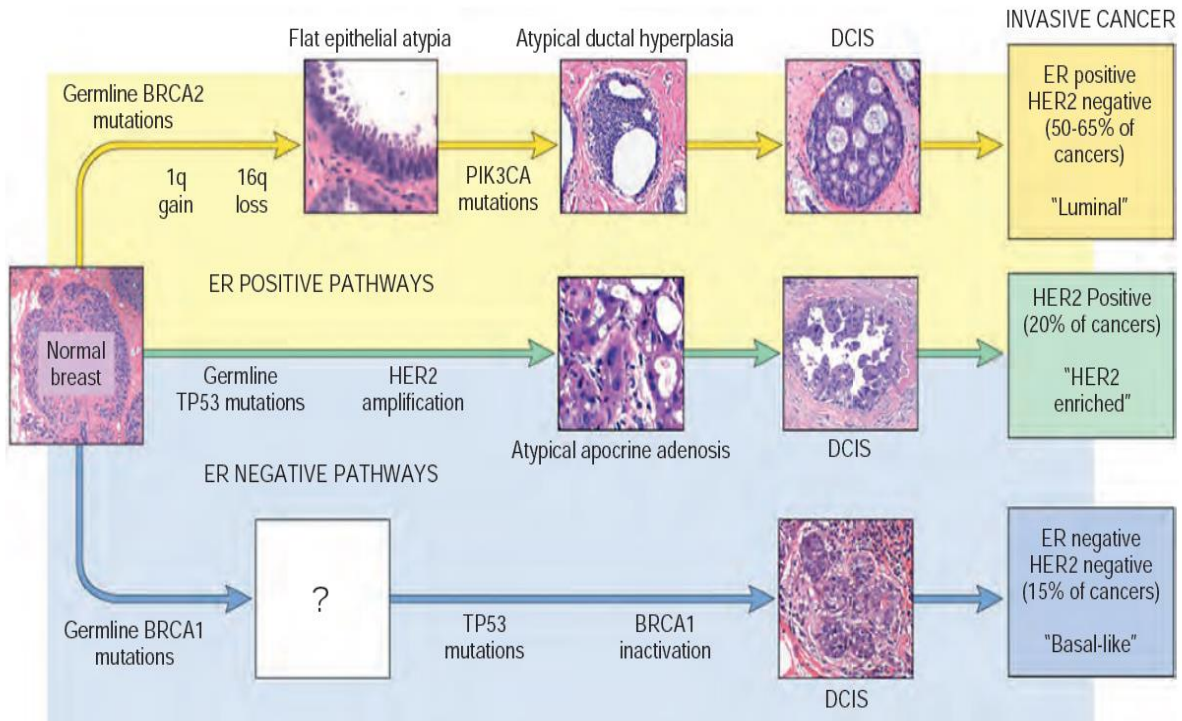
Такође се претпоставља да рецептори за естроген и прогестерон ступају у интеракцију са промоторима раста као што су TGF- β (енгл. *Transforming growth factor- β*), PDGF и FGF (енгл. *Fibroblast growth factor*), које луче ћелије карцинома дојке и тако обезбеђују аутокрини механизам развоја тумора⁸.

Важни фактори околине су зрачење и „егзогени естрогени“¹⁰. Продужена изложеност егзогеним естрогенима у постменопаузи, позната као хормонска супституциона терапија, са једне стране спречава или бар одлаже развој остеопорозе, а са друге је повезана са повећаним ризиком од настанка карцинома дојке, откривањем карцинома у вишим стадијумима и већим абнормалностима мамограма⁸. Многи други, слабије утемељени фактори ризика као што је гојазност, конзумирање алкохола и исхрана богата мастима су повезани са настанком карцинома дојке⁸.

1.1.3. Молекуларни механизми карциногенезе и прогресије тумора

Различит хистолошки изглед карцинома дојке и претпостављене прекурсорске лезије су спољашње манифестације сложених генетских и епигенетских промена које произилазе из канцерогенезе. У литератури се описују три главна генетичка пута карциногенезе (Слика 1.)⁸:

- **ER-позитивни, HER2-негативни карциноми** се развијају преко „доминантног“ пута канцерогенезе (жута стрелица-слика 1.) и присутни су у 50% до 65% случајева. Ово је најчешћи подтип карцинома дојке код особа које наслеђују мутиран BRCA2 ген. Често су повезани са абнормалностима хромозома 1q, губитком хромозома 16 q, и активирањем мутација у PIK3CA, гену који кодира фосфоинозитид-3-киназу (PI3K), која је важна компонента сигнализационих путева рецептора фактора раста. Сличне или исте генетске лезије често се налазе у променама дојке као што су „*flat epithelial*“ атипична дуктална хиперплазија, за које се претпоставља да су прекурсорске лезије за овај подтип карцинома дојке. ER-позитивни карциноми се називају "луминалним", јер највише подсећају на луминалне ћелије нормалних дојки и то у смислу њихове mRNA експресије, у којој доминирају гени који су регулисани естрогеном. Пут укључује и најмање два главна молекуларна подтипа који се разликују у брзини пролиферације и одговору на терапију.



Слика 1. Главни путеви развоја карцинома дојке

(Идентификована су три главна пута. Најчешћи пут (жута стрелица) води развоју ER-позитивних карцинома. Препознатљиве прекурсорске лезије укључују „flat epithelial“ атипичност и атипичну дукталну хиперплазију. Мање чест пут (плава стрелица) води карциномима који су ER и HER негативни. Квадрат са упитником указује на то да никакве прекурсорске лезије нису идентификоване - можда због тога ове лезије брзо напредују до карцинома. Трећи пут (зелена стрелица) води развоју HER2-позитивних карцинома, који могу бити ER-позитивни или ER-негативни. Амплификација HER2 гена је такође присутна у подскупу атипичних апокриних лезија, што може представљати прекурсорску лезију. Сваки молекуларни подтип има карактеристични профил експресије гена који се назива луминалним, HER2 позитивним, и *basal-like*, респективно.)

преузето из: Vinay Kumar, Abul K. Abbas JCA. Robbins and Cotran's Pathological Basis of Disease. Elsevier Saunders. 2015. 1043-1073 p.)

- **HER2-позитивни карциноми** се развијају кроз пут (зелена стрелица-слика 1.) који је повезан са амплификацијом HER2 гена на хромозому 17q. Они чине отприлике 20% свих

карцинома дојке и могу бити или ER-позитивни или ER-негативни. Ово је најчешћи подтип карцинома дојке код пацијената са мутацијом у TP53 (*Li-Fraumeni* синдром). Потврђена прекурсорска лезија се назива атипична апокрина аденоза.

- **ER-негативни, HER2-негативни карциноми** се развијају кроз посебан пут (плава стрелица-слика 1.) који је независан од ER-посредованих промена у експресији гена и HER2 генске амплификације. Прекурсорске лезије тек треба описати јер је ово најмање позната путања канцерогенезе. Ови тумори чине око 15% карцинома дојке, али су најчешћи тип тумора код пацијената са присутним BRCA1 мутацијама. Ови тумори имају "basal-like" образац mRNA експресије који укључује многе гене изражене у нормалним миоепителним ћелијама.

Када се успостави клон исходишног тумора, субклонална хетерогеност која произилази из геномске нестабилности несумњиво доприноси како напредовању тумора тако и развијању отпорности на терапију. Као и код многих других тумора, генска хетерогеност карцинома дојке је велики изазов за успех терапије, јер хетерогеност повећава вероватноћу појаве агресивнијег подтипа тумора отпорнијег на дејство терапије ⁸.

Неопластичне епителне ћелије се не развијају у „in vitro“ условима тј. изолацији, јер њихов раст зависи од интеракције са стромалним ћелијама. Истраживања такође говоре да се карциноми дојке чешће јављају у подручјима највеће мамографске густине, што говори у прилог хипотези да је повећана количина везивновлакнасте строме обележје ризика и биолошки важно за туморигенезу. Улога строма још није у потпуности разумљива. Фокалне измене строме могу играти директну улогу у стварању микросредине погодне за развој тумора и његов раст ¹¹. Са бољим разумевањем улоге коју игра строма, можда ће

бити могуће развити терапију(е) која циљано делује на компоненте строме одговорне за развој тумора.

1.2. Класификација карцинома дојке

Скоро сви (> 95%) малигнитети дојке су аденокарциноми који се прво развијају као карцином ин ситу, а у време клиничког откривања већина (најмање 70%) их је пробила базалну мембрану и инвадирала строму.

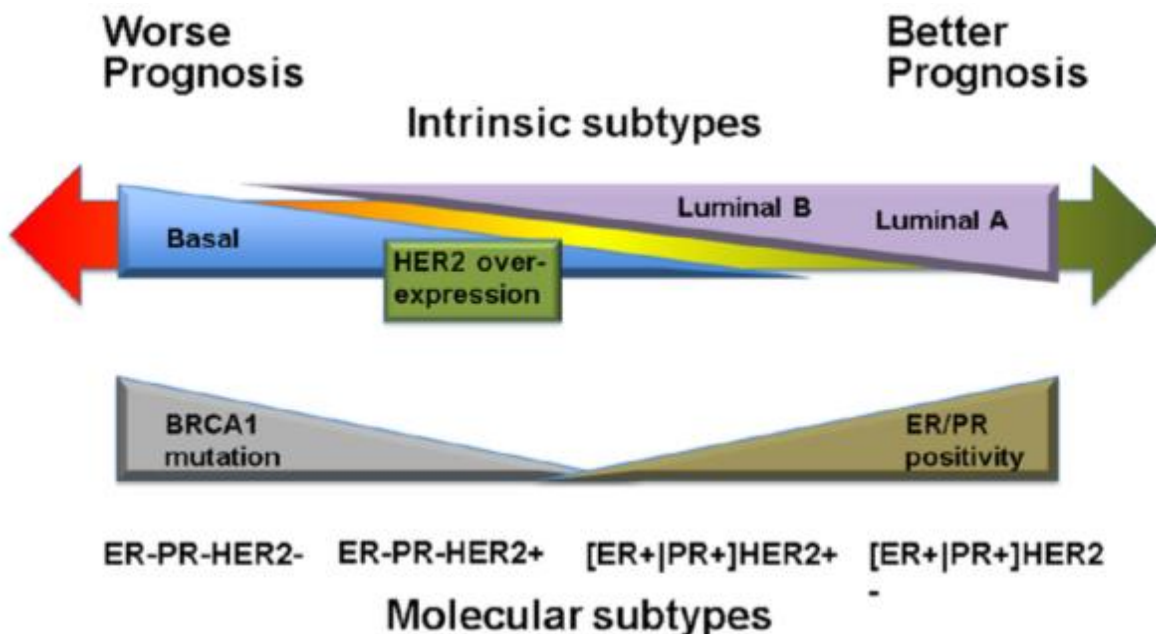
Термини дуктални и лобуларни се још увек користе за описивање подтипова ин ситу и инвазивних карцинома, али већина доказа указује да сви карциноми дојке заправо настају од ћелија у лобуларној јединици терминалног канала (*terminal ductal lobular unit- TDLU*). Карцином ин ситу првобитно је класификован као *DCIS (Ductal carcinoma in situ)* или лобуларни карцином ин ситу (*Lobular carcinoma in situ- LCIS*) заснован на сличности захваћених простора са нормалним дуктусима или лобулусима. Тренутно је прихваћено становиште да ови обрасци раста нису повезани са ћелијама порекла, већ прије да рефлектују разлике у генетици и биологији туморских ћелија ⁸.

Према тренутној конвенцији, "лобуларни" се односи на инвазивне карциноме који су биолошки повезани са *LCIS*, а "дуктални" се користи уштено за аденокарцином који не може бити класификован као посебан хистолошки тип ⁸.

Инвазивни карциноми се могу поделити на основу молекуларних и морфолошких карактеристика на неколико клинички значајних подтипова. Једна трећина може бити морфолошки класификована у посебне хистолошке типове, од којих су неки снажно

повезани са клинички релевантним биолошким карактеристикама, а остали су груписани заједно и називани „дуктални“ или без посебног типа (енгл. *Not otherwise specified, NOS*)¹².

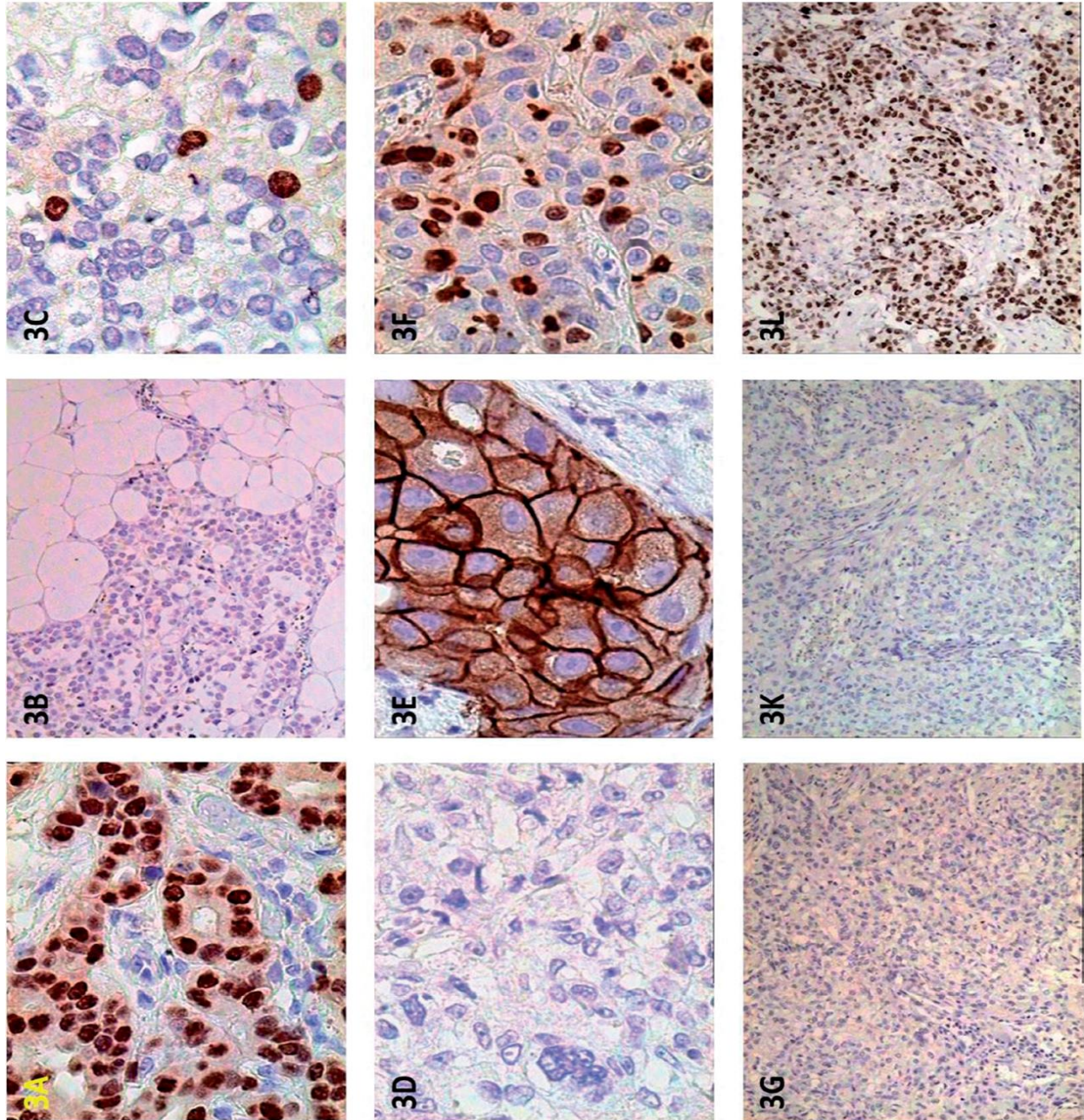
1.3. Молекуларна класификација карцинома дојке



Слика 2. Молекуларни подтипови карцинома дојке

(преузето из: 1. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* 2015 Sep 15;5(10):2929–43.)

На основу молекуларних и морфолошких карактеристика инвазивни карциноми дојке се могу поделити у неколико клинички важних подгрупа (слика 3.). Упркос недоследности именовања и категорисања ових подгрупа у бројним студијама^{13–15}, недавна открића кохортних студија геномских мутација и експресије гена и протеина у карциномима дојке, обезбедила су оквир за молекуларну класификацију карцинома дојке.



Слика 3. Молекуларни подтипови карцинома дојке.

(А-С- Луминални подтип: А- експресија естрогенског рецептора; В- негативна експресија HER2; С- ниска пролиферативна фракција; D-F- прекомерна експресија HER2: D- одсуство експресије естрогена; Е- прекомерна експресија HER2 протеина; F- умерена пролиферативна фракција; G-L- троструко негативни карциноми: G- одсуство експресије хормонских ресептора; К- одсуство експресије HER2 протеина; L- висока пролиферативна фракција. *преузето из: Strumfa, Ilze & Vanags, Andrejs & Āboliņš, Arnis & Gardovskis, Janis. (2012). Pathology of Breast Cancer: from Classic Concepts to Molecular Pathology and Pathogenesis. Acta Chirurgica Latviensis. 12. 10.2478/v10163-012-0012-x.)*

Три главна молекуларна подтипа карцинома дојке од којих сваки има снажну повезаност са клиничким карактеристикама, одговором на терапију али и исходом^{8,16,17}, су:

1. **Луминални** који чине 50% до 65% укупног броја карцинома дојке су најчешћи облик инвазивних карцинома дојке. Постоје најмање два подтипа луминалних тумора, тј. луминални А и луминални Б. Уопштено говорећи, луминални А су тумори са ER или PR позитивношћу и HER2 негативности, тј. луминални Б су тумори са ER или PR позитивношћу и HER2 позитивношћу¹⁷. На основу брзине пролиферације, даље се могу поделити у две подгрупе⁸:

а) **са ниском пролиферацијом** (40% до 55% карцинома): ова група карцинома дојке чини већину карцинома код старијих жена и код мушкараца. Многи од ових карцинома се откривају у раној фази. Они имају најнижу учесталост локалног рецидивирања и често се њихов третман заврши операцијом. Када метастазирају, то се најчешће дешава после дугог временског периода (преко 6 година) и типична локализација метастаза су кости. Одговарају на хормонску терапију па је и дуго преживљавање са метастазама могуће, упркос чињеници да је непотпун одговор на примењену хемиотерапију више правило него изузетак. Заиста, код већине пацијената хемиотерапија изгледа да мало доприноси хормонској терапији која је стандард у овом подтипу карцинома дојке.

б) **са високом пролиферацијом** (отприлике 10% карцинома); иако су ови тумори ER-позитивни, ниво експресије естрогенских и прогестеронским рецептора може бити низак или чак одсутан. Ово је најчешћи тип карцинома повезан са BRCA2 мутацијом. Експресија mRNK је слична другим ER-

позитивним карциномима, али је акценат експресије у овом случају на генима који се односе на пролиферацију. Међутим, за разлику од ER-позитивних карцинома са ниском пролиферацијом, око 10% ових карцинома показује потпун одговор на хемотерапију па ови пацијенти имају пуно бољу прогнозу.

2. **HER2-позитивни** (око 20% карцинома) су други најчешћи молекуларни подтип инвазивних карцинома дојке. Око половина ових карцинома су ER-позитивни. У том случају, експресија ER је обично ниска док је експресија прогестеронских рецептора често одсутна. Овај подтип карцинома је релативно чешћи код младих жена. Идентификација карцинома који припадају овом подтипу се постиже применом тестова експресије HER2 протеина или амплификације HER2 гена. Карциноми ове групе могу метастазирати када су мали и у раном стадијуму и то најчешће у мозак и висцералне органе. Пре примене HER2-циљане терапије, HER2-позитивни карциноми су били повезани са лошијим клиничким исходом. Међутим, једна трећина или више ових карцинома потпуно реагује на лекове која се везују и блокирају HER2 активност, па такви пацијенти сада имају изврсну прогнозу ^{8,14,15,18}.
3. **ER-негативни, HER2-негативни тумори** ("*basal-like*" или троструко негативни карциноми чине око 15% карцинома) су трећи главни молекуларни подтип ^{8,15,19}. Чешће се срећу код младих пременопаузалних жена и већина се јавља код жена са BRCA1 мутацијом. Због високог индекса пролиферације и брзог раста, ова врста карцинома се посебно често открива као палпабилна маса у интервалу између два мамографска прегледа. ER-негативни, HER2-негативни тумори су најразличитија

група карцинома дојке која дели генетичке сличности са серозним карциномом јајника, укључујући и удруженост са оба типа фамилијарних карцинома код жена са BRCA1 мутацијама. Ипак, у неким случајевима присутне су особине које се преклапају са другим молекулским подгрупама. На пример, око 10% карцинома ове подгрупе показују експресију естрогенских рецептора, а око 15% експримира HER2. Најчешће метастазирају док су мали и то на мозак и висцералне органе. Око 30% их потпуно реагује на хемиотерапију, рецидиви се дијагностикују у року од 5 година након третмана, а локални рецидив је чест чак и након мастектомије ⁸.

1.4. Прогностички и предиктивни фактори

По дефиницији, прогностички фактор је објективно мерљива клиничка или биолошка карактеристика која пружа информације о клиничком исходу при дијагнози, независно од примењеног третмана. Код карцинома, прогностички маркери су обично индикатори раста, инвазије и метастатског потенцијала ²⁰.

Предиктивни фактор је клиничка или биолошка карактеристика која пружа информације о вероватноћи одговора на дату терапију и може служити за идентификацију субпопулације пацијената који ће имати користи од одређеног третмана. Неки фактори карцинома дојке функционишу и као прогностички и као предиктивни маркери (нпр. HER2) ²⁰.

Прогностички фактори се групишу на следећи начин:

- Клинички фактори: старост, раса.
- Патолошки фактори: величина примарног тумора, захваћеност аксиларних лимфних чворова, стадијум, морфологија тумора, хистолошки градус, перитуморска лимфоваскуларна инвазија, експресија хормонских рецептора и HER2.
- Маркери пролиферације: Ki67

1.4.1. Патолошки фактори

Величина примарног тумора је дефинисана као највећи пречник примарног тумора. Стопа 5-годишњег преживљавања пада са 91% код карцинома који су мањи од 2 цм на 63% за оне веће од 5 цм ²¹. Величина тумора корелира и са ризиком од развоја метастаза у аксиларним лимфним чворовима, али ова два фактора су независна.

Захваћеност аксиларних лимфних чворова и број лимфних чворова са метастазама представљају јаке и независне прогностичке факторе ²¹. Стопа 5-годишњег преживљавања тумора локализованим у дојци у односу на туморе са метастазама у регионалним лимфним чворовима је 99% односно 85% ²², независно од величине тумора ²¹. Поред тога, присуство микро метастаза (<2 mm) у прегледаним аксиларним чворовима је повезано са лошијом прогнозом у поређењу са туморима без метастаза док разлика преживљавања између пацијената са негативним чворовима и оних са изолованим туморским ћелијама није нађена ^{23,24}.

Стадијум. Комбиновањем величине примарног тумора (*T*) (Табела 1.), статуса аксиларних лимфних чворова (*N*) (Табела 2.) и присуство удаљених метастаза (*M*) (Табела 3.) доприноси се одређивању стадијума карцинома дојке према *TNM* систему ²⁵. Интересантно, последње ажурирање АЈСС стадирања упућује на интегрисани модел који комбинује анатомски стадијум тумора дојке са молекуларним биомаркерима ради боље прогностичке класификације.

Морфологија тумора. Лобуларни карцином повезан је са мањим ризиком од рецидивирања у поређењу са дукталним карциномом али само у првих 6 година након дијагнозе, док се ризик повећава након шест година ²⁶. Тубуларни, папиларни, муцинозни, медуларни и аденоид-цистични карциноми имају бољу прогнозу, док су микропапиларни и метапластични повезани са краћим преживљавањем ²⁰.

T – Примарни тумор	
T _x	Примарни тумор не може бити одређен
T ₀	Нема доказа о постојању примарног тумора
T _{is}	In situ карцином
T _{is} (DCIS)	Дуктални карцином <i>in situ</i>
T _{is} (LCIS)	Лобуларни карцином <i>in situ</i>
T _{is} (Paget)	<i>Paget</i> -ова болест без присутног инвазивног и/или <i>in situ</i> (DCIS и/или LCIS) карцинома у ткиву дојке. Карциноми у паренхиму дојке повезани са <i>Paget</i> -овом болести се класификују према величини и карактеристикама паренхимске болести, иако је неопходно напоменути постојање напоменути <i>Paget</i> -ове болести.
T ₁	Тумор највећег пречника ≤ 20 mm
T _{1mi}	Тумор највећег пречника ≤ 1 mm
T _{1a}	Тумор највећег пречника > 1 mm али ≤ 5 mm
T _{1b}	Тумор највећег пречника > 5 mm али ≤ 10 mm
T _{1c}	Тумор највећег пречника > 10 mm али ≤ 20 mm
T ₂	Тумор највећег пречника > 20 mm али ≤ 50 mm
T ₃	Тумор највећег пречника > 50 mm
T ₄	Тумор било које величине са локалним ширењем у зид грудног коша и/или кожу (улцерације или сателитски чворови у кожи). Зид грудног коша укључује ребра, међуребарне мишиће и предњи зупчasti мишић (<i>serratus anterior</i>), али не пекторални мишић.
T _{4a}	Локално ширење у зид грудног.
T _{4b}	Улцерација коже дојке и/или истострани сателитски чворови у кожи и/или Или едем коже (укључујући изглед поморанџине коре - <i>peau d'orange</i>) без дијагностичких критеријума за инфламацијски карцином дојке.
T _{4c}	T _{4a} и T _{4b}
T _{4d}	Инфламацијски карцином

Табела 1. American Joint Committee on Cancer- Клиничка (cT) и патолошка (pT) класификација примарног тумора дојке (преузето и модификовано према: *Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 2017.*)

pN – Регионални лимфни чворови	
pNx	Регионални лимфни чворови се не могу проценити (нису уклоњени ради испитивања или су претходно уклоњени)
pN ₀	Регионални лимфни чвор без метастазе* <i>Напомена:</i> Изоловане групе туморских ћелија (engl. Isolated tumor cell clusters, ITC) су дефинисане као мање групе ћелија ≤ 0,2mm или појединачне ћелије или мање скупине ћелија < 200 ћелија на једном хистолошком пресеку. ITC могу бити детектоване рутинским НЕ или ИНС бојењем. Чворови који садрже само ITC се не убрајају у укупан број позитивних лимфних чворова за N класификацију али улазе у укупан број прегледаних лимфних чворова. ITC обично не доказују метастатску активност, нпр. размножавање или реакцију строме.
pN _{0(i-)}	Метастазе у регионалним лимфним чворовима нису детектоване НЕ и/или ИНС
pN _{0(i+)}	Метастазе у регионалним лимфним чворовима ≤ 0,2mm (уочене НЕ или ИНС методом, укључујући ITC)
pN _{0(mol-)}	Метастазе у регионалним лимфним чворовима нису детектоване НЕ и/или ИНС уз негативан RT-PCR налаз
pN _{0(mol+)}	Позитиван RT-PCR налаз али метастазе у регионалним лимфним чворовима нису детектоване НЕ или ИНС бојењем
pN ₁	Микрометастазе или метастаза у 1 до 3 истострана аксиларна лимфна чвора, односно истостраним унутрашњим чворовима дојке са метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, али клинички није очигледна [†]
pN _{1mi}	Микрометастаза (>0,2mm и/или више од 200 ћелија, али не >2mm)
pN _{1a}	Метастаза у 1 до 3 аксиларна лимфна чвора, укључујући бар један чија је највећа димензија >2mm
pN _{1b}	Унутрашњи лимфни чворови дојке са микроскопском метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, али која клинички није очигледна [†]
pN _{1c}	Метастаза у 1 до 3 лимфна чвора а унутрашњи лимфни чворови дојке садрже микроскопску метастазу откривену дисекцијом стражарског лимфног чвора, која није клинички детектована [†]
pN ₂	Метастазе у 4-9 истостраних аксиларних лимфних чворова или клинички очигледан [‡] лимфни чвор дуж мамарије интерне у одсуству аксиларних лимфонодалних метастаза
pN _{2a}	Метастазе у 4-9 аксиларних лимфних чворова, укључујући бар један који је већи од 2mm
pN _{2b}	Метастаза у клинички очигледном [‡] унутрашњем лимфном чвору (чворовима) дојке, у одсуству метастазе аксиларног лимфног чвора
pN ₃	Метастазе у ≥ 10 лимфних чворова аксиле или у инфраклавикуларним лимфним чворовима (аксиларни ниво III) или у клинички детектованом истостраним унутрашњем чвору (чворовима) од којих је најмање један позитиван у аксиларном нивоу I или II или у више од 3 аксиларна лимфна чвора и унутрашњим чворовима дојке са микрометастазама детектованим након дисекције стражарског лимфног чвора а која клинички није детектована [†] или у супраклавикуларним истостраним лимфним чворовима
pN _{3a}	Метастаза у 10 или више аксиларних лимфних чворова (од којих је бар један већи од 2mm) или метастаза у инфраклавикуларним лимфним чворовима
pN _{3b}	Метастаза у клинички очигледном [‡] унутрашњем лимфном чвору (чворовима) дојке у присуству позитивног аксиларног лимфног чвора (чворова); или метастаза у више од 3 аксиларна лимфна чвора и у унутрашњим лимфним чворовима дојке са микроскопском метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, а која није клинички очигледна [†]
pN _{3c}	Метастаза у супраклавикуларном лимфном чвору (чворовима)

*Класификације је заснована на микроскопском прегледу лимфних чворова добијених након дисекције аксиле са или без биопсије стражарског лимфног чвора. Класификација је заснована на биопсији стражарског лимфног чвора без накнадне дисекције аксиларних лимфних чворова и означава се (sn) што је скраћеница од „sentinel node“, нпр. pN_{0(sn)}

[†]“Није клинички очигледан“ се дефинише када није детектован клиничким прегледом или имџинг методама (искључујући лимфосцинтиграфију)

[‡]“Клинички очигледан“ се дефинише као детектован клиничким прегледом или имџинг методама (искључујући лимфосцинтиграфију) са карактеристика високо суспектним на малигнитет или налаз суспектан на макрометастазе у цитолошком прегледу узорка добијеног аспирационом биопсијом танком иглом (fine needle aspiration cytology, FNA)

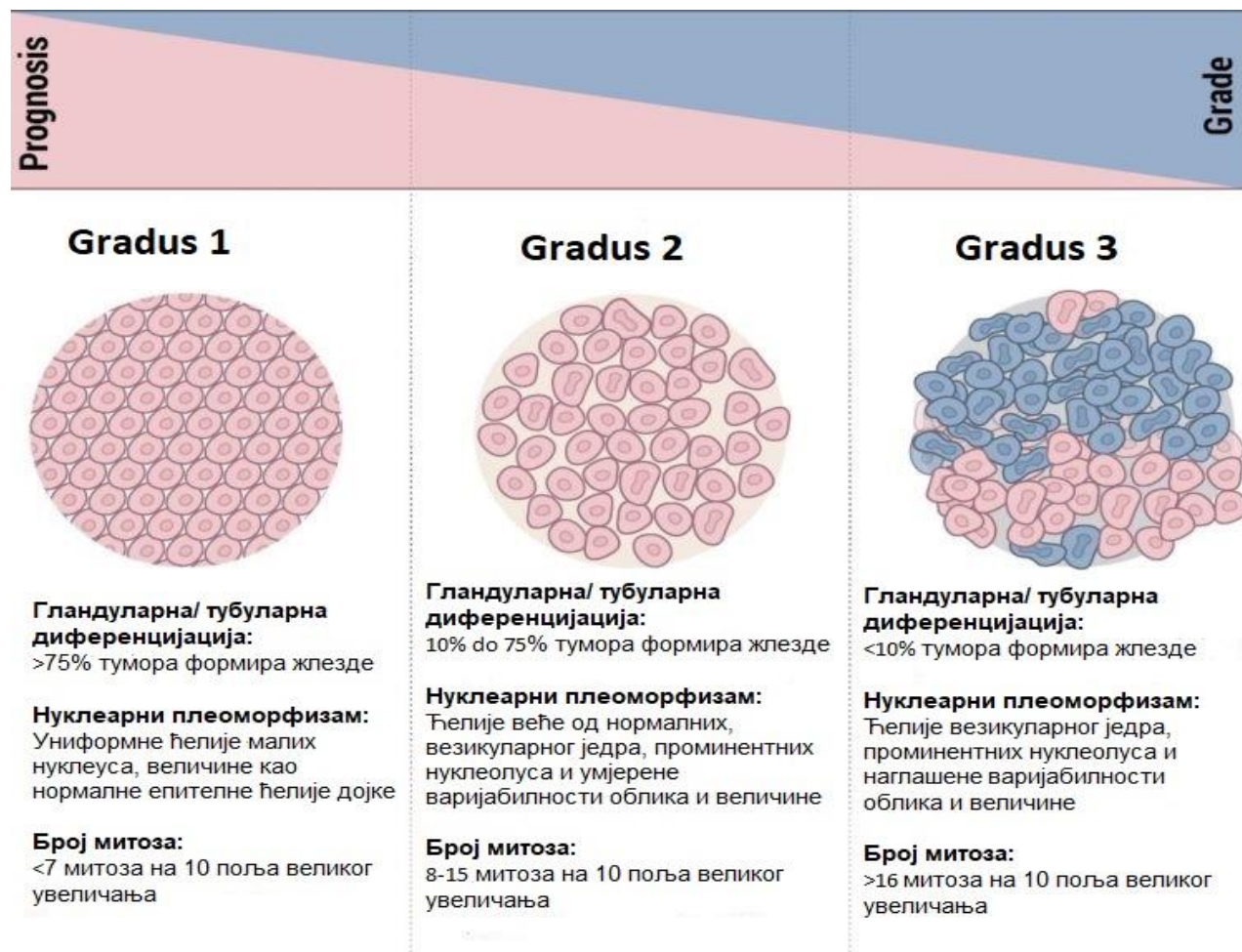
Табела 2. American Joint Committee on Cancer- Клиничка (cT) и патолошка (pT) класификација регионалних лимфних чворова (преузето и модификовано према: *Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 2017.*)

M – Удаљене метастазе	
M ₀	Без клиничких и радиографских доказа за постојање удаљених метастаза
cM ₀₍₊₎	Без клиничких и радиографских доказа за постојање удаљених метастаза али су туморске ћелије молекуларним методама или микроскопски детектоване у циркулишућој крви, костној сржи или другом нерегионалним лимфном ткиву у пречнику до 0,2mm код пацијената без симптома и знакова који указују на постојање удаљених метастаза.
M ₁	Постојање метастаза је потврђено клиничким и радиографским прегледом и/или су хистолошки доказане у пречнику већем од 0,2mm
<i>Напомена:</i> У односу на претходну TNM класификацију (6th ed.) укинута је категорија M _x која је означавала не могућност процене удаљених метастаза.	

Табела 3. American Joint Committee on Cancer- Дефиниција удаљених метастаза (преузето и модификовано према: Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 2017.)

Хистолошки градус (енгл. *Histological grade*, G) означава степен сличности са нормалним ткивом и сразмеран је степену ткивне и ћелијске атипичности. То је прогностички маркер који омогућава стратификацију ризика унутар стадијума датог тумора ²⁷. Најчешће кориштен систем оцењивања је *Nottingham histological grading* који се зове и *Elston and Ellis grading*, и представља унапређен *Scarff-Bloom-Richardson Grading* систем којим се процењује степен диференцијације тумора (формирање тубула и нуклеарни плеоморфизам) и пролиферативна активност (митотски индекс) дајући „бројчану вредност“ сваком од ових карактеристика, а затим добија коначан резултат. Његово одређивање се заснива на процентуалној заступљености жлезданих и тубуларних структура са централним луминалним простором. Постоје три степена хистолошке градације (Слика 4.). Код хистолошког градуса 1, тумор је саграђен од жлезданих/тубуларних формација у више од 75% туморског ткива. Тумори хистолошког градуса 2 се карактеришу интермедијарним архитектурним налазом што се манифестује присуством glandularних/тубуларних структура у 10% до 75% туморског ткива. Хистолошки градус 3 чине туморске плаже, острва и низови малигних ћелија а

жлездане/тубуларне формације су присутне у мање од 10% туморског ткива. На основу овог коначног резултата, тумори су даље подељени у три градуса, од којих градус 1 одговара добро диферентованим карциномима са најбољом прогнозом, до градуса 3 коме припадају недиференцираним карциномима ^{28,29}.



Слика 4. Хистолошки градус тумора

(преузето и модификовано према: <https://pathology.jhu.edu/breast/my-results/staging-grade/>)

Хормонски рецептори. Прогностичка релевантност ER и PR је била предмет дебате током много година. Недавна анализа 4.000 пацијената укључених у четири клиничке студије и праћена током 24 године, описује да ER-позитивни тумори имају мању

годишњу стопу рецидивирања у поређењу са ER-негативним туморима током првих 5 година. После периода од 5 година стопе рецидивирања код ER-позитивних карцинома су веће и остају прилично стабилне после 10 година од примарне дијагнозе, без обзира на стање лимфних чворова³⁰. PR је добро познат прогностички фактор времена за поновну појаву карцинома али и прогностички фактор периода преживљавања³¹ и допуњава прогностичку вредност за имунохистохемијско дефинисање подтипова карцинома дојке идентификовањем Luminal A тумора са добром прогнозом³².

У одсуству системске терапије, прекомерна експресија HER2 је повезана са лошијом прогнозом, без обзира на статус аксиларних лимфних чворова³³. HER2 задржава негативан прогностички ефекат чак и у туморима $\leq 1\text{cm}$ са негативним лимфним чворовима³⁴.

Маркери пролиферације. Стопа пролиферације код карцинома дојке може се проценити употребом неколико метода, укључујући бројање митоза, одређивање фракције ћелија у S-фази проточном цитометријом и имунохистохемијски користећи директна моноклонска антитела против антигена изражених у пролиферишућим ћелијама, као што су *ciklin A* и *Ki67*. Најчешће кориштена метода за одређивање стопе пролиферације ћелија карцинома дојке је процена броја једара обојених моноклонским мишијим антителом *Mib-1*, који детектује протеин Ki67 са већом осетљивошћу у односу на друга упоређивања антитела у FFPE узорцима³⁵. Упркос недоследностима у методологији процене и „граничним“ вредностима, две велике мета-анализе доследно препознају Ki67 као прогностички фактор код раног карцинома дојке, без обзира на статус аксиларних лимфних чворова³⁵. Међутим, ретроспективна „природа“ већине студија које истражују Ki67, варијабилност у кориштеним антителима, техници и протоколима за бодовање

спречавају хармоничну интерпретацију података. У скорије време, ретроспективне анализе клиничких испитивања са централизованом проценом Ki67 описале су вредност Ki67 као независан прогностички маркер преживљавања без болести, док је само 1 од 5 испитивања потврдило независну повезаност са укупним преживљавањем ³⁶.

1.4.2. Предиктивни фактори

Предиктивни фактори омогућавају прилагођавање третмана пружањем „алата“ за идентификацију особа са већом или мањом вероватноћом да одговоре на одређени третман. На тај начин се може постићи побољшање у одговору на третман, а пацијенти који нису „реактивни“ могу бити поштеђени од непотребних терапија. Резултати метанализе од преко 100.000 пацијената укључених у 123 испитивања открили су да је корист од адјувантне хемиотерапије независна од старосне доби, ER статуса, градуса, величине тумора, захваћености лимфних чворова и адјувантне примене тамоксифена ³⁷.

Једини добро утврђени предиктивни маркери карцинома дојке су ER и HER2.

Предиктивна улога ER је обимно описана у метанализи од преко 20.000 пацијената у 20 испитивања и то „*adjuvant tamoxifen vs. no tamoxifen*“. У ER-позитивним туморима, примена тамоксифена је довела до снижавања ризика од поновног јављања карцинома на 39% тј на 30% ризика смртог исхода у 15 година. Резултати су били независни од примене PR, старосне доби, нодалног статуса и употребе других видова хемиотерапије. Насупрот томе, тамоксифен није утицао на преживљавање код пацијената са ER-негативним карциномима. PR-позитивни тумори имају бољу прогнозу када се лече са

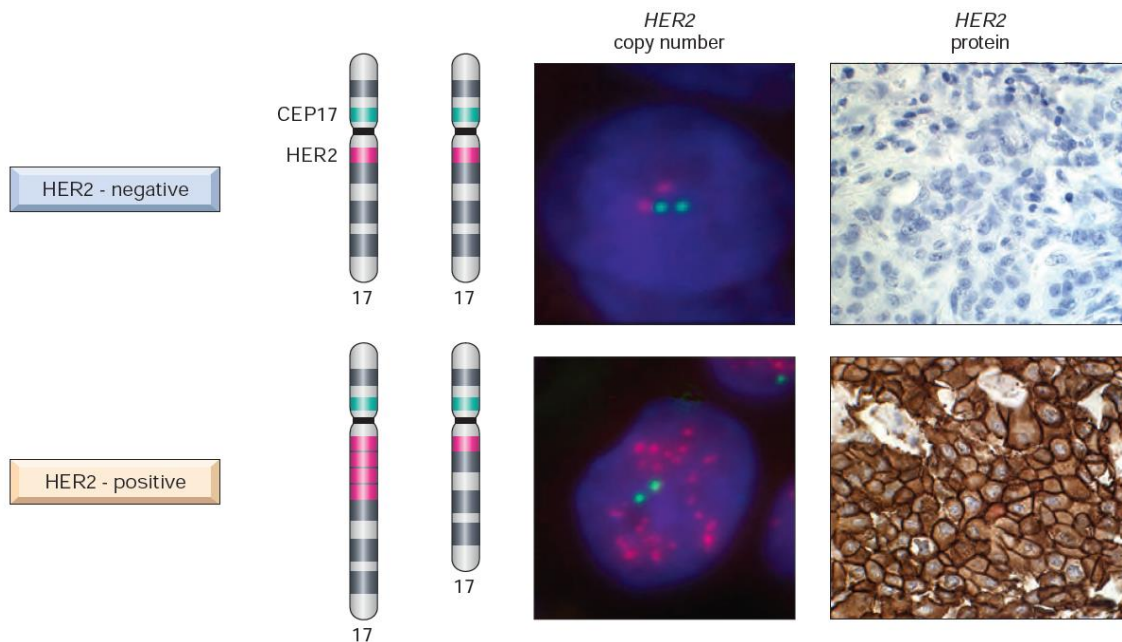
тамоксифеном. Међутим, како експресија PR зависи од ER, предиктивна улога PR-а је стога нејасна, посебно када је познат ER статус ³⁷.

HER2 је предиктивни фактор одговора на HER2-усмерену терапију и користи од терапије трастузумабом у HER2-позитивним туморима, те је добро описан како у ранијим ³⁸, тако и у недавним истраживањима ³⁹.

1.5. HER-2 рецептор (рецептор за хумани епидермални фактор раста 2)

HER2 припада породици рецептора хуманог епидермалног фактора раста (HER). HER2 открили су готово истовремено три групе истраживача из Америке и јапанска група истраживача. Ген за HER2 лоциран је на дугом краку хромозома 17 (регион q21). То је протоонкоген са тирозин-кинаском активношћу (слика 5.). Ова група рецептора укључује и HER1 (познат као рецептор епидермалног фактора раста (EGFR)), HER3 и HER4. Чланови ове „породице“ су експримирани у многим врстама ткива и играју кључну улогу у пролиферацији и диференцијацији ћелија. HER рецептори се генерално активирају везивањем лиганда, што доводи до формирања хомодимера и хетеродимера, а све је праћено фосфорилацијом специфичних тирозиназа у цитоплазмичном домену рецептора. HER1 и HER4 су потпуно функционални рецептори тирозин-киназе, док HER2 нема ендогени лиганд, а HER3 има ефекат слабо функционалне киназе. Због одсуства специфичног лиганда за HER2, он првенствено функционише као лиганд-зависни хетеродимер са другим члановима HER фамилије ⁴⁰.

Прекомерна експресија или генска амплификација HER2 повезана је са агресивнијом прогресијом болести, метастазама и лошијом клиничком прогнозом код пацијената оболелих од канцера дојке и желуца ⁴¹.



Слика 5. Идентификација HER2-позитивног карцинома дојке.

(Прекомерна експресија HER2 протеина је практично увек узрокована амплификацијом региона хромозома 17q који садржи HER2 ген. Повећање броја копија гена HER2 открива се између осталог и применом флуоресцентне ин ситу хибридизације (FISH) помоћу специфичне HER2 пробе (црвени сигнал), која је типично кохбридована на једра туморских ћелија са другом пробом специфичном за регион центромере хромозома 17 (зелени сигнал), омогућавајући одређивање броја копија хромозома 17. Алтернативно, прекомерна експресија XEP2 протеина у туморским ћелијама може се открити имунохистохемијским бојењем са антителима специфичним за HER2; преузето из: *Vinay Kumar, Abul K. Abbas JCA. Robbins and Cotran's Pathological Basis of Disease. Elsevier Saunders. 2015. 1043-1073 p.*)

HER2 тестови који подразумевају HER2 ИHC (имунохистохемијске тестове) и HER2 ISH (*in situ* хибридизационе тестове) анализирају статус HER2 протеина употребом светлосног микроскопа на формалином фиксираним, парафином импрегнираним ткивним узорцима. Резултати се означавају као HER2 негативни (0 и 1+), HER2 гранични (HER2 *equivocal* (2+)) и HER2 позитивни (3+). Ови тестови користе се за исту сврху: избор пацијенткиња са карциномом дојке за HER2-циљану терапију. Међутим, HER2 ИHC и HER2 ISH тестови детектују биолошки различите мете, односно прекомерну експресију HER2 протеина као циља HER2 усмерене терапије и HER2 амплификацију гена (са или без контроле CEN17) која је у корелацији са прекомерном експресијом HER2 протеина. Сваки тест има своје предности и недостатке. HER2 ИHC су технички лакше изводљиви у односу на HER2 ISH тестове. HER2 ISH тестови имају за циљ визуализацију HER2 гена са или без визуализације циљног хромозома 17 тј. центромере хромозома 17 (CEN17). Постоји више система за детекцију сигнала које је одобрила FDA (*Food and Drug Administration*): флуоресцентна *in situ* хибридизација (FISH), хромогена *in situ* хибридизација (CISH) и двострука *in situ* хибридизација (DISH).

HER2 FISH се врши коришћењем мануалних или полуаутоматизованих протокола, а каснија анализа захтева специјализовани флуоресцентни микроскоп у мрачној комори. HER2 CISH тестови су такође мануелни или полуаутоматизовани протоколи, а резултати се анализирају обичним светлосним микроскопом. HER2 DISH тестови врше се само по аутоматизованим протоколима, а резултати се анализирају светлосним микроскопом.

Очување сигнала на HER2 CISH и DISH слајдовима је боље у односу на HER2 FISH слајдове, а и процена морфологије ткива је такође лакша у хромогеним тестовима. Главна предност HER2 ISH тестова у поређењу са HER2 ИHC тестовима је да се процена статуса

HER2 спроводи квантитативним анализама и такође укључује „унутрашњу контролу“ ћелија у околини тумора у одељку истог ткива.

С обзиром да су разне студије показале да око 20% HER2 тестирања може бити непрецизно, Америчко друштво за клиничку онкологију и Колегијум америчких патолога (ASCO/CAP) уводи 2007. године смернице за HER2 тестирање ⁴², које су ажуриране 2013. године ⁴³ када се поред постојећих тестова уводе HER2 ISH тестови у „светлом пољу“ (енгл. *HER2 bright-field in situ hybridization assays*). Према тим препорукама, тестирање HER2 статуса ради се код свих метастатских и новодијагностикованих карцинома дојке у раној фази. Пацијенткиње са негативним HER2 статусом одређеним употребом ИНС или ISH метода није неопходно подвргавати алтернативним методама (као нпр. *reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)*). HER2 гранични случајеви (*HER2 equivocal*) дијагностиковани било HER2 имунохистохемијским (HER2 ИНС) или HER2 ISH тестовима морају бити поново тестирани другом методом HER2 тестирања или пак истом методом тестирања али на другим ткивним калупима (узорцима). Након имплементације нових HER2 ISH критеријума бодовања, број HER2 FISH граничних и позитивних случајева је знатно повећан јер број копија HER2 гена постао важан фактор одлучивања без обзира на HER2/CEN17 однос. Дакле, постоји више HER2 граничних случајева дијагностикованих са оба HER2 ИНС и HER2 ISH тестовима са ажурираним ASCO/CAP смерницама за тестирање HER2. Ипак, још увек постоје различити фактори који могу довести до лажно негативних резултата (случајеви који би били прихватљиви за HER2 циљану терапију) као и лажно позитивних резултата (непотребна, скупа терапија са бројним нежељеним ефектима).

У зависности од величине и типа тумора те степена ширења, лечење обично укључује поштедне хируршке интервенције или мастектомију. Аксиларна лимфаденектомија може бити извршена и током операције да би се проценио степен проширености тумора. Хируршка терапија може бити праћена адјувантном (помоћном) терапијом (радиотерапијом, хемиотерапијом, хормоналном или HER циљаном терапијом)⁴⁴. Чак и пацијенткиње са сличним типом или градусом карцинома дојке могу различито реаговати на терапију или имати различит дугорочни исход⁴⁴.

Молекуларна циљана терапија представља велики напредак у лечењу карцинома, а терапија са највише позитивних резултата је управо терапија усмерена ка рецептору хуманог епидермалног фактора раста 2 (HER2-усмерена терапија).

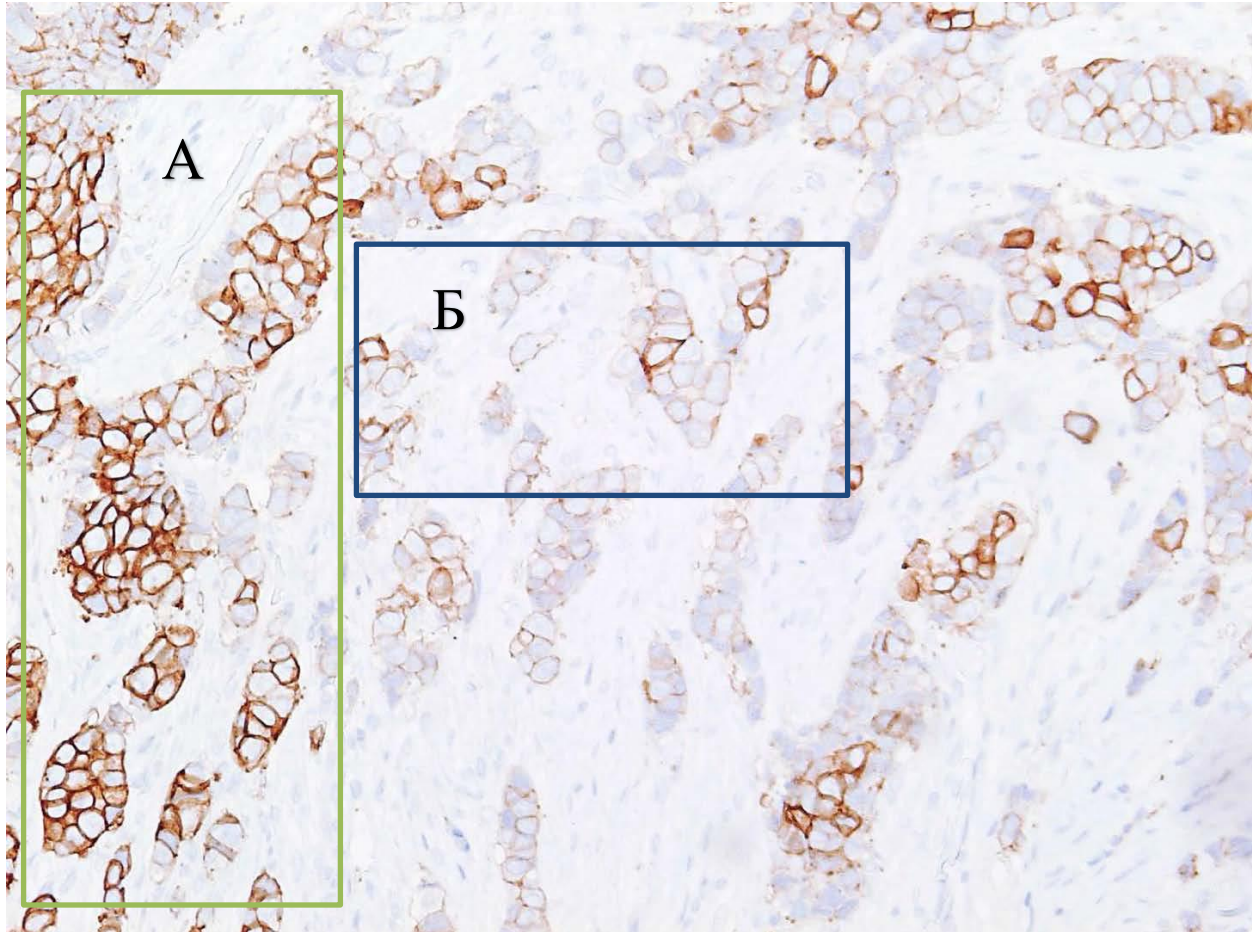
Први концепт циљане HER2 терапије представљен је 1986. године ксенографтским моделом тумора помоћу моноклонског анти-HER2 антитела које је успешно показало антитуморске ефекте *in vivo*. Трастузумаб (*Herceptin, Genentech, San Francisco, CA, USA*) је рекомбинантно хуманизовано моноклонално имуноглобулин Г1 капа антитело против екстрацелуларног домена HER2 протеина⁴⁵. Одобрена га је FDA 25. септембра 1998. као први HER2 циљани лек за метастатски карцином дојке са прекомерном експресијом HER2 протеина. Касније, 16. новембра 2006. године, FDA проширује одобрење за трастузумаб као помоћни третман за све пацијенте са HER2 позитивним карциномом дојке и метастазама у лимфним чворовима. Коначно, 2008. године употреба трастузумаба је одобрена као монотерапија за лечење HER2 позитивних карцинома дојке пацијенткиња са негативним статусом лимфних чворова. Тренутно, одобрени третмани за карциноме дојке са прекомерном експресијом или амплификацијом гена HER2 (HER2+ карциноми дојке) од стране FDA укључују интрацелуларне инхибиторе тирозин-киназе лапатиниб (*Tikerb*)

и нератиниб, затим моноклонска антитела, као што је трастузумаб (*Herceptin*) и пертузумаб (*Perjeta*), и антитело-лек коњугат адо-трастузумаб емтанзин (*Kadcila*)⁴⁶.

Са свим претходно разматраним варијаблама, HER2 хетерогеност тумора представља незаобилазан фактор у прецизној процени HER2 статуса⁴⁷. HER2 хетерогеност тумора или HER2 генска хетерогеност описује се као карцином са различитим туморским ћелијским популацијама (укључујући статус очигледне HER2 амплификације) код исте пацијенткиње⁴⁸, те као таква ствара потешкоће у лечењу пацијенткиња оболелих од карцинома дојке употребом монотерапије⁴⁹.

Постоје две главне врсте HER2 генске хетерогености (слика 5A): 1) груписана (енгл. *clustered*) HER2 хетерогеност која подразумева нагомилану популацију HER2 амплификованих ћелија тумора ограничених туморским ћелијама без HER2 амплификације и 2) мешовита (енгл. *Mixed / scattered*) HER2 хетерогеност која показује дисперговане HER2 амплификоване туморске ћелије унутар популације туморских ћелија без HER2 амплификације⁴⁸. HER2 генска хетерогеност се дефинише као "више од 5 али мање од 50% инфилтрирајућих ћелија тумора са HER2/CEN17 односом већим од 2,2", засновано на резултатима HER2 ISH са двоструким пробама, тј. „више од 5 али мање од 50% инфилтрирајућих ћелија тумора са више од 6 HER2 сигнала по ћелији", засновано на резултатима ISH тестова без контроле⁵⁰.

Тренутни приступ за утврђивање HER2 статуса пацијенткиња са карциномом дојке употребом једноструких тестова није препоручљив⁵¹, а незаобилазан фактор у погрешној процени HER2 статуса представља хетерогеност тумора⁴⁷. Осим тога, неке од HER2 негативних пацијенткиња могу имати користи од HER2 циљане терапије^{52,53}, а разлог лажно негативних резултата би могао бити досадашњи приступ HER2 тестирању.



Слика 5А. Главне врсте HER2 генске хетерогености
(А- груписана/ clustered; Б- мешовита/scattered)

Главно неслагање резултата статуса HER2 протеина и HER2 гена узроковано је туморском хетерогеношћу, углавном откривеном у HER2 граничним случајевима. Осим тога, ажурирање ASCO/CAP HER2 смерница тестирања повећало је број HER2 граничних случајева. Уопштено, анализа HER2 статуса граничних случајева захтева употребу и HER2 IHC и HER2 ISH тестова, осим у случају да су доступни различити ткивни блокови за ретестирање истом методом.

Стога је циљ GPA (Gene Protein Assay) теста, којег користимо у нашем истраживању хетерогености, да обједини HER2 ИHC и HER2 ISH тестове као један тест којим би се статус HER2 протеина и HER2 гена могао прецизније одредити на индивидуалном нивоу ћелије у хетерогеним карциномима дојке.

Постоји неколико публикација за примену HER2 GPA у светлом пољу⁵⁴⁻⁵⁶. Nitta и група аутора објавили су прву триколор HER2 GPA методу у светлом пољу која је омогућила детекцију ћелијске популације тумора дојке која показује амплификацију HER2 гена без прекомерне експресије HER2 протеина у HER2 позитивним, граничним и негативним клиничким случајевима. Они су предложили да се овај феномен хетерогености на индивидуалном ћелијском нивоу назове "HER2 микрохетерогеност" и то као нова категорија HER2 хетерогености. Такође су потврдили да HER2 микрохетерогеност постоји у ксенографтним туморима HER2 позитивне ћелијске линије. Osamura и други аутори оценили су да HER2 микрохетерогеност може бити биолошки механизам резистенције на HER2 циљану терапију⁵⁷. Дакле, туморске ћелије са амплификацијом HER2 гена без прекомерне експресије HER2 протеина могу избећи одговор на HER2 циљану терапију.

HER2 хетерогеност која утиче на прецизну процену HER2 статуса је примећена код 11–13% пацијенткиња са инвазивним карциномом дојке^{58,59}. Стога је очигледно да HER2 туморска хетерогеност представља изазов за тачну процену HER2 статуса карцинома дојке, као и других врста карцинома, посебно желуца, „озлоглашеног“ управо због HER2 туморске хетерогености.

Међутим, смернице за процену HER2 хетерогености још увек нису доступне па је и процена присуства хетерогености субјективна. Неколико студија је доказало да

пацијенткиње са HER2 позитивним карциномима дојке који показују HER2 генску хетерогеност имају знатно краће време преживљавања у односу на пацијенткиње без хетерогености ⁵⁹ и да је HER2 хетерогеност независан предиктор клиничког исхода при терапији рака дојке трастузумабом ⁶⁰. Да би се побољшао третман пацијенткиња са карциномом дојке, неопходно је да смернице за процену података клинички значајне HER2 хетерогености буду детаљно описане ^{61,62}.

HER2 генска хетерогеност најчешће се открива код HER2 граничних случајева (HER2 ИНС 2+). Индивидуалне туморске ћелије са амплификацијом HER2 гена често се налазе у HER2 негативним карциномима дојке класификованим тренутним смерницама за HER2 тестирање ⁶³.

Према актуелним критеријумима, HER2 негативни случајеви који показују очигледну амплификацију HER2 гена не испуњавају услове за HER2 циљану терапију, без обзира на HER2 позитивну популацију ћелија тумора. Студијски модел за интратуморалну хетерогеност у HER2 позитивним ксенографтским туморима показао је корелацију између ефикасности терапије анти-HER2 антителом и степена HER2 хетерогености ⁶⁴. Ако би се ови налази могли применити на третман хуманог карцинома дојке, статус HER2 хетерогености би био главни фактор одлучивања у одабиру одговарајуће терапије.

Прецизна идентификација HER2 хетерогености је важан фактор у избору адекватног терапијског приступа у лечењу карцинома дојке, а у те сврхе се посебно добрим показала нова метода идентификације HER2, тј. HER2 GPA (енгл. gene protein assay) метода која патологу омогућава истовремену процену статуса HER2 протеина и HER2 гена на индивидуалном ћелијском нивоу, корелирајући их са ћелијском морфологијом чак и у „граничним“ случајевима. Како овом методом HER2 микрохетерогеност може бити лако

идентификована, HER2 GPA могао би постати неходан тест за процену HER2 статуса не само за карцином дојке него и за карцином желуца, који такође показује HER2 хетерогеност⁶⁵.

Према наводима из литературе, HER2 регионална хетерогеност идентификована је код око 9% случајева HER2 позитивних метастазирајућих карцинома дојке. Детаљна процена HER2 статуса, укључујући ниво HER2 амплификације, регионалне хетерогености и процента туморских ћелија са односом HER2/CEP17 већим од 2,2 или експресијом HER2 протеина у вредности 3+, може обезбедити важне информације за процену очекиваног одговора на терапију⁶⁰. По неким ауторима, чак су и случајеви са лакостепеним повећањем броја копија HER2 (4,0–5,9), упркос негативном статусу односа HER2/CEP17, веома важни јер могу допринети адекватнијем терапијском одговору⁶⁶.

HER2 је прекомерно експримиран код око 15–20% случајева карцинома дојке. Имајући у виду да HER2 позитивни тумори имају лошију прогнозу од оних који су HER2 негативни, значај адекватне дијагностике и правовремене терапије се сам по себи намеће.

Други важан и још недовољно истражен фактор је и хетерогеност, интратуморска и интертуморска. Најновија истраживања показала су њено присуство код око 10% случајева карцинома дојке, али, у значајном проценту, и код других типова карцинома. Док HER2 хетерогеност може довести до неадекватне процене HER2 статуса, а тиме и погрешне одлуке у третману, идентификација присуства хетерогености важнија је због тога што она доводи до слабљења ефеката HER2 усмерене терапије (трастузумаб, нпр.).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

На основу испитивања експресије протеина и промена на генском нивоу у примарном ткиву карцинома дојке и метастазама у регионалним лимфним чворовима, циљ истраживања је да се испита:

1. да ли су постојећи критеријуми препоручени од стране ASCO/CAP довољни за дијагностиковање HER2 позитивности код пацијенткиња које показују интратуморску хетерогеност, како у примарним туморима тако и у метастазама у регионалне лимфне чворове?
2. учесталост HER2 хетерогености у макрометастазама лоцираним у лимфним чворовима.
3. да ли постоји јасна корелација између хетерогености нађене у примарном тумору дојке и припадајућим метастазама у лимфним чворовима?
4. да ли постоје случајеви у којима HER2 негативни примарни тумори дедиференцирањем „прелазе“ у HER2 позитивне метастазе у лимфним чворовима.

2.1. Основне хипотезе

1. постојећи критеријуми постојећим методама нису довољни за дијагностиковање HER2 позитивности код пацијенткиња које показују интратуморску и интратуморску хетерогеност како у примарним туморима тако и у метастазама;
2. значајан број макрометастаза лоцираних у лимфним чворовима показује HER2 хетерогеност;
3. постоји позитивна корелација између хетерогености нађене у примарним туморима и припадајућим метастазама у лимфним чворовима;
4. постоје случајеви у којима HER2 негативни тумори дедиференцирањем „прелазе“ у HER2 позитивне метастазе у лимфним чворовима.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је проведено као проспективна студија и обухватила је архивирани биопсијски материјал (парафинске калупе) од 41 пацијенткиње које су оперисане током 2014. и 2015. године због примарног карцинома дојке са макрометастазама у аксиларним лимфним чворовима. Хируршки оперативни материјал тј. ткиво дојке са тумором добијено сегментектомијом и мастектомијом и аксиларни лимфни чворови са присутним метастазама достављени су на Одељење патологије и цитологије у болници округа Даларна, Фалун (Шведска), где је и извршена комплетна патохистолошка дијагностика.

Старост болесника и локализација тумора у дојци су регистровани из клиничких досијеа пацијенткиња. Пацијенткиње су потписале информисану сагласност да се укључе у студију. Протокол студије одобрио је Етички комитет Упсале - региона Оребро у Шведској, *EPN Dnr 2010/461*.

Критеријуми за укључивање у студију били су:

- примарни карцином дојке са аксиларним лимфним макрометастазама,
- примарни тумор са комплетно одређеним статусом рецептора применом имунохистохемије.

Критеријуми за искључивање из студије били су:

- случајеви са рекурентним туморима дојке након примењене терапије,
- случајеви без метастаза у аксиларним лимфним чворовима,
- случајеви са микрометастазама (депозити тумора ≤ 2 mm) или појединачним изолованим туморским ћелијама у аксиларним лимфним чворовима.

Од 51 пацијенткиње колико смо планирали укључити у студију, искључили смо оне са поновљеном болешћу и оне које имају само микрометастазе (0,2 мм у величини) или изоловане туморске ћелије (<0,2 мм) у испитиваним лимфним чворовима.

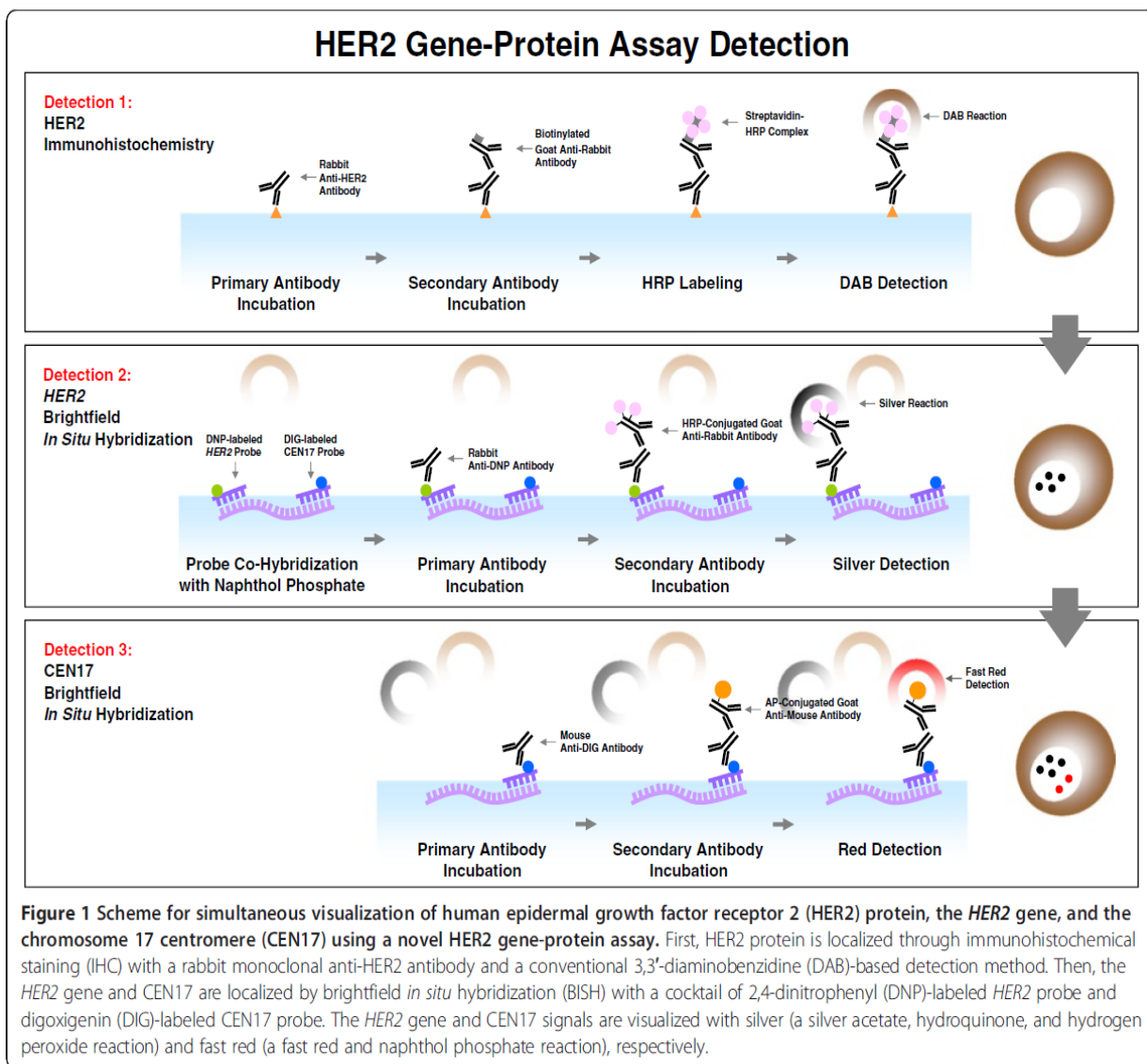
Примарни тумори су документовани на хистолошким слајдовима великог формата (*large-format histologic sections*), а образац раста инвазивне туморске компоненте (унифокални, мултифокални или дифузни) је одређен кориштењем раније објављених критеријума⁶⁷. Хистолошки тип тумора је процењен у складу са критеријумима СЗО-е¹², док је градирање извршено у складу са Елстон-Елис (*Elston-Ellis*) системом класификације²⁸. Репрезентативни парафински блокови метастатских лимфних чворова одабрани су из архивираног материјала који се обојени кориштењем HER2 GPA (*gene protein assay*) као што је претходно описао Нита (*Nitta*) и сарадници⁵⁶.

Поступак одређивања HER2 статуса HER2 GPA методом подразумевао је да се из ткива фиксираног у формалину и импрегнираног парафином (парафински ткивни блокови) формирају исечци који су били обојени кориштењем антитела *HER2/neu Rabbit Monoclonal (clone 4B5, Ventana, Tuscon, Arizona)*. Након тога следио је процес двоструке хромогене (енгл. *dual chromogen*) *in situ* хибридизације како би се квантификовали HER2

гени као и центромере хромозома 17. *HER2* копије гена боје се употребом сребрне *in situ* хибридизације (енгл. *silver in situ hybridization* – SISH), док су копије хромозома 17 детектоване употребом црвене хромогене *in situ* хибридизације (енгл. *chromogen red in situ hybridization* – Red ISH) (слика 6.).

Процес је изведен помоћу апарата BenchMark® XT (*Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona*). Укратко, ткивни узорци дебљине 5 μm су након процеса депарафинизације са *EZ Prep™* (*Ventana*) на 60° C и додатком *Liquid Coverslip™* (*LCS, Ventana*) третирани са *CC1* (*Cell Conditioning 1; Ventana*). Ендогена пероксидаза се инактивирала инкубацијом са хидроген-пероксидом и то 4 минута на 37° C. Потом су ткивни узорци инкубирани са зечјим моноклоналним анти-*HER2* антителом (*PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)-prediluted*) тј. *HER2/neu Rabbit Monoclonal (clone 4B5, Ventana, Tuscon, Arizona)*) 32 минута на 37° C, а ендогени биотин је блокиран употребом *Endogenous Biotin Blocking Kit*. Следила је инкубација са биотинилованим секундарним антителом 8 минута, а потом са HRP-коњугованим стрептавиридином 8 минута на 37 °C. Визуализација *HER2* протеина добија се у реакцији са бакром обогаћеним *DAB* (3,3' *Diaminobenzidine*). За бојење *HER2* гена и *CEN17* ткивни узорци се у четири осмоминутна циклуса изложени дејству *CC2* (*Cell Conditioning 2; Ventana*) на 75° C, а потом дигестији помоћу ензима *ISH-Protease 2* у трајању од 16 минута на 37° C. Следио је процес хибридизације са *DNP labeled HER2* и *DIG labeled CEN17* пробама на 44° C у трајању од шест часова након денатурације на 80° C у трајању од четири минута. Процес “испирања” је вршен помоћу 2x *SSC* (*Sodium Chloride Sodium Citrate*) осам минута на 72° C. Потом се на ткивни узорак апликовао *ultraView SISH DNP Detection Kit*, затим *ultraView Red ISH*

DIG Detection Kit и коначно контрастирање помоћу *Hematoxylin II* и *Bluing Reagent*TM (Ventana).



Слика 6. HER2 Gene-Protein Assay детекција

(преузето из Nitta H, Kelly BD, Padilla M, Wick N, Brunhoeber P, Bai I, et al. A gene-protein assay for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2): brightfield tricolor visualization of HER2 protein, the *HER2* gene, and chromosome 17 centromere (CEN17) in formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissue sections. *Diagn Pathol.* 2012;7(1):60.)

Након бојења узорака направљене су микрофотографије (камером *Olympus XC50*) најмање три одвојена удаљена фокуса туморских ћелија у лимфном чвору.

Амплификација *HER2* је квантификована у 120 туморских ћелија (по 40 ћелија из сваког фокуса) или свих туморских ћелија уколико је њихов број био мањи од 40.

За побољшање микрофотографија коришћен је програма за обраду слике (*Microsoft Office Picture Manager 2010*), а затим је следило бројање *HER2* сигнала (црне тачке) и сигнала центромере хромозома 17 (црвене тачке).

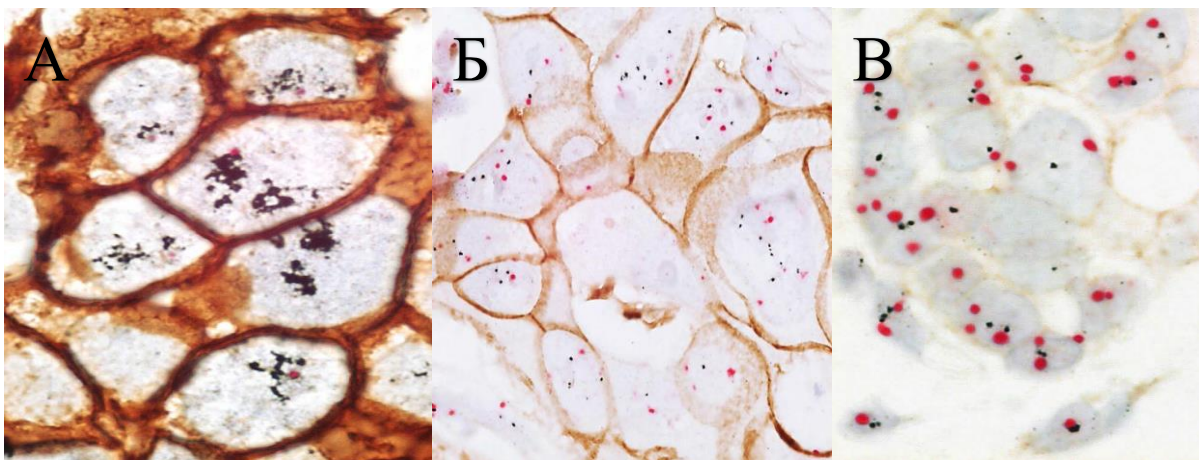
На свакој микрофотографији процењени су следећи параметри:

- **Мембранска експресија *HER2* протеина** (градирана као 0, 1+, 2+, 3+) и то употребом алгоритама препоручених од стране ASCO/CAP⁶⁸. Као *HER2* 0 (негативни) сматрали су се случајеви са одсутним или непотпуним (једва приметним) бојењем цитоплазматске мембране у $\leq 10\%$ туморских ћелија. Као *HER2* 1+ сматрали су се случајеви са одсутним или непотпуним (једва приметним) бојењем цитоплазматске мембране у $> 10\%$ туморских ћелија. Као *HER2* 2+ сматрани су случајеви са непотпуним и/или slabим/умереним циркумферентним бојењем цитоплазматске мембране у $> 10\%$ туморских ћелија или интензивним циркумферентним комплетним бојењем цитоплазматске мембране у $\leq 10\%$ туморских ћелија. Као *HER2* 3+ сматрали су се случајеви са интензивним циркумферентним комплетним бојењем цитоплазматске мембране у $> 10\%$ туморских ћелија.
- **Број копија *HER2* гена и сигнала центромере хромозома 17 (CEN17)** у појединачним туморским ћелијама
- **Просечан број копија *HER2* гена и CEN17** у сваком микроскопском пољу посебно, а затим за све процењиване појединачне туморске ћелије унутар лимфног чвора.

- Број неполизомичних ћелија у којима је регистровано више од 4 HER2 „сигнала“ тј. CEN17 „сигнала“ ≥ 3
- однос HER2 / CEN17

Статус амплификације HER2 је одређен у складу са ASCO/CAP 2013 смерницама ⁶⁸ на следећи начин:

- позитивна **HER2** амплификација – однос HER2/CEN17 већи од 2,2 или број копија *HER2* гена већи од 6,0; (слика 7а.)
- гранична (*equivocal*) **HER2** амплификација – однос HER2/CEN17 1,8–2,2 или број копија *HER2* гена 4,0–6,0; (слика 7б.)
- негативна **HER2** амплификација – однос HER2/CEN17 мањи од 1,8 или број копија *HER2* гена мањи од 4,0 (слика 7в.).



Слика 7. Позитивна *HER2* амплификација (А- позитивна *HER2* амплификација; Б- гранична (*equivocal*) *HER2* амплификација; В- негативна *HER2* амплификација)

HER2 статус примарног тумора оцењен је током рутинског дијагностичког рада. Поред HER2 статуса, имунохистохемијски је одређен статус естрогенских и прогестеронских рецептора у примарном тумору и то употребом одговарајућих антитела (*clone SP1, Ventana Medical Systems, Tucson Arizona, prediluted and clone 1E2, Ventana, Tucson, Arizona, prediluted*, респективно); 10% позитивних туморских ћелија су сматране за граничну (*cut-off*) вредност. На основу ових резултата, одређени су „сурогатни“ имунохистохемијски фенотипови примарног тумора и то као: луминални А-тип (*luminal A-like*), луминални Б-тип (*luminal B-like*), HER2 тип (*HER2 type*) и троструко негативни (*triple negative*) према *ASCO/CAP 2013* смерницама ⁶⁸.

На основу добијених података одређено је присуство хетерогености и то:

- **Интертуморалне HER2 хетерогености** дефинисане као разлика у статусу HER2 између примарног тумора и било које од његових метастаза. У овој ситуацији смо користили „сумирани“ HER2 статус аксиле што значи да је присуство једног HER2 позитивног лимфног чвора квалификовао случај као XEP2 позитиван у аксиларним метастазама без обзира на статус других чворова.
- **Интернодалне HER2 хетерогености** дефинисане као разлика у HER2 статусу појединачних метастаза у лимфним чворовима у оквиру исте аксиле.
- **Микрохетерогености** дефинисаном као присуство више од 10% појединачних амплификованих неполизомичних ћелија.

Добијени подаци су обрађени кориштењем софтверског пакета – *IBM SPSS Statistics*

20.0. Приликом статистичке обраде података кориштене су методе дескриптивне статистике (укључујући и графичко приказивање података) и статистичког закључивања. Квантитативна обележја описана су аритметичком средином, медијаном и стандардном девијацијом, а квалитативна фреквенцијама односно процентима.

Централни део статистичке обраде односио се на статистичко закључивање како би се установило постојање статистички значајних разлика у резултатима, односно постоји ли значајна зависност између неких појава и то употребом χ^2 -теста, и t -теста. Статистички значајна разлика дефинисана је на нивоу 0,05, а разлика од врло високог статистичког значаја на нивоу од 0,01.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Карактеристике кохорте

Студија је обухватила 41 пацијенткињу старости од 42 до 92 године (просечна старост 69,54 +/- 10,99 година, медијана 70 година). Тумор је локализован у десној дојци код 23 (56,1%) пацијенткиње, у горњем медијалном квадранту дојке у 8 (19,5%), горњем латералном квадранту у 20 (48,8%), у доњем медијалном и доњем латералном код 4 (9,8%) и 6 (14,6%), а централно лоциран карцином је био присутан у 3 (7,3%) пацијенткиње. Тумор је био унифокални у 18 (43,9%), мултифокални у 18 (43,9%) и дифузан у 5 (12,2%) случајева. Већина тумора показала је умерен хистолошки градус (грабус II) (56,1%, 23/41) и нису били специјалног типа (73,2%, 30/41). Молекуларни фенотип тумора био је следећи: Луминални А код 12 (29,3%), луминални Б у 21 (51,2%), ХЕР2 тип у 3 (7,3%) и троструки негативни тип код 5 (12,2%) пацијенткиња. Табела 4. детаљније показује неке клиничке и патолошке карактеристике тумора.

Табела 4. Одабране клиничке и патолошке карактеристике примарног карцинома дојке.

ПАРАМЕТАР	ПАЦИЈЕНТКИЊЕ (N)	(%)
Латералитет		
Десно	23	56,1
Лево	18	43,9
Дистрибуција по квадрантима		
Горњи медијални	8	19,5
Горњи латерални	20	48,8
Доњи медијални	4	9,8
Доњи латерални	6	14,6
Централно	3	7,3
Фокалност		
Унифокалан	18	43,9
Мултифокалан	18	43,9
Дифузан	5	12,2
Хистолошки градус		
I	6	14,6
II	23	56,1
III	12	29,3
Хистолошки подтип		
Инвазивни дуктални карцином, NOS	30	73,2
Инвазивни лобуларни карцином	7	17,1
Тубуларни карцином	2	4,9
Инвазивни апокрини карцином	1	2,4
Инвазивни микропапиларни карцином	1	2,4
Молекуларни подтипови		
Luminal A	12	29,3
Luminal B	21	51,2
HER2 type	3	7,3
TNBC	5	12,2
УКУПНО	41	100,0

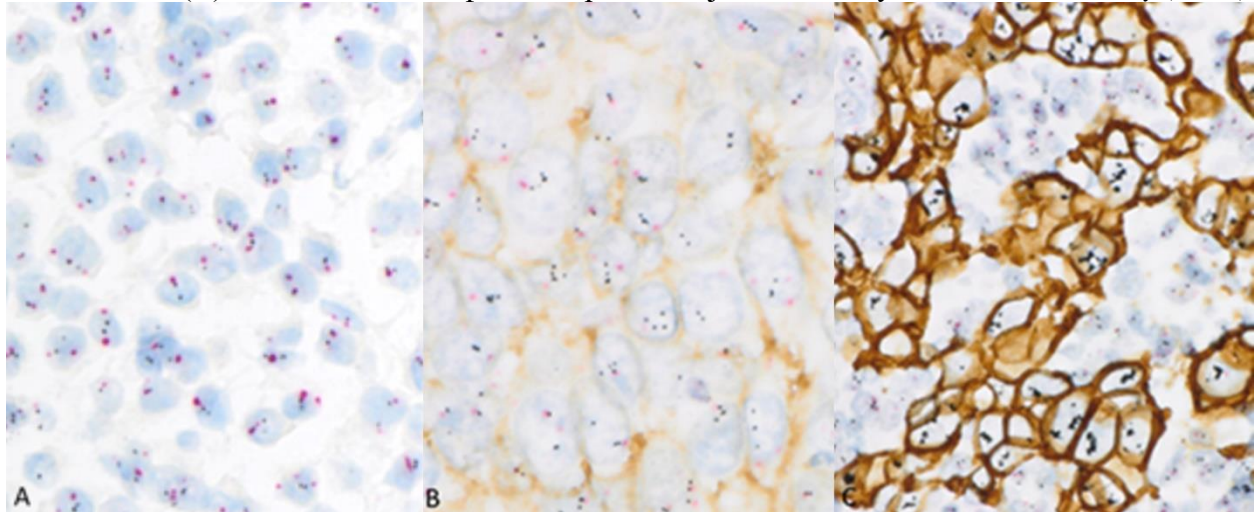
NOS: Not otherwise specified; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; TNBC: Triple-negative breast cancer.

4.2. Резултати GPA процене

Просечан број лимфних чворова био је 8 чворова по случају са опсегом од 1 до 29 лимфних чворова, док је просечан број лимфних чворова са макро-метастазом био 2 са опсегом од 0 до 17 лимфних чворова. Анализирали смо 108 метастатских лимфних чворова и 120 ћелија по метастазама (са четири изузетка где се могло анализирати само 28, 40, 53 и 105 ћелија по једном микроскопском пољу). То даје збир од 12586 процењених туморских ћелија.

Gene-Protein Assay (GPA) се показао као робустан метод са лаку процену сигнала гена и центромере, као и процену карактеристика мембранске експресије протеина на нивоу појединачних ћелија. Слика 8. илуструје типичне случајеве метастаза лимфних чворова са негативним, граничним и позитивним ХЕР2 статусом, респективно.

Слика 8. Типични случајеви са HER2 негативним (А), HER2 граничним (В) и HER2 позитивним (С) метастазама лимфних чворова, обојених помоћу *Gene-Protein Assay (GPA)*



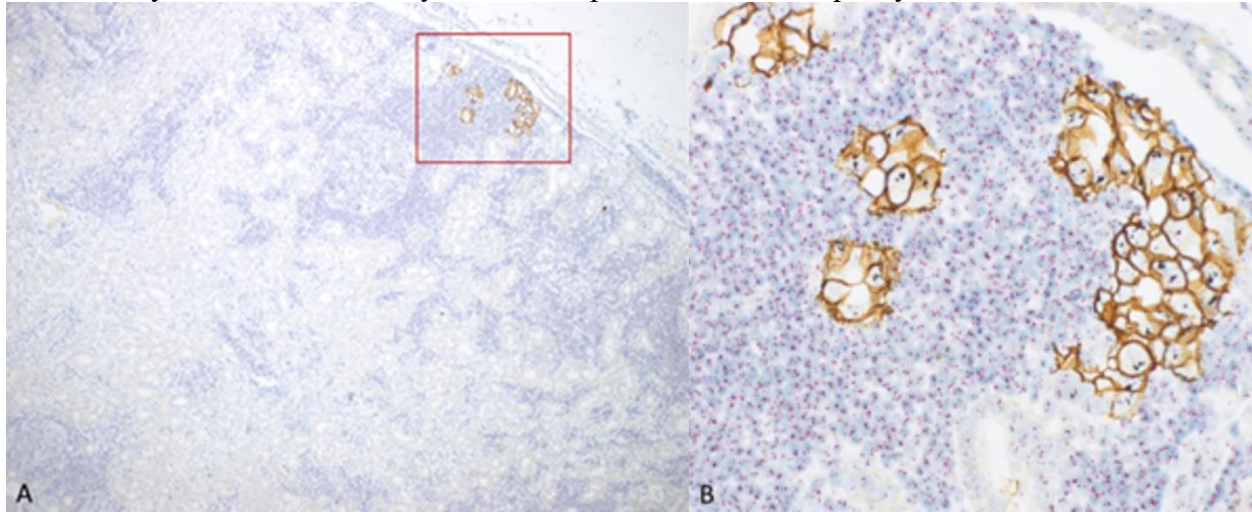
Макрометастазе аксиларних лимфних чворова су биле присутне код 92,7% (38/41) пацијенткиње, док је код преостале 3 одабране пацијенткиње метастатски фокус био

премален за адекватну анализу HER2 статуса користећи GPA. Табела 5. приказује усклађеност прекомерне експресије HER2 протеина и статуса амплификације гена у 38 пацијенткиња (укупни статус свих лимфних чворова по пацијенткињи) ($p < 0,001$).

Четири од 33 пацијенткиње са негативном (0/1 +) експресијом HER2 су имале граничан (еквивокалан) статус амплификације. Ниједан од имунохистохемијски негативних случајева није био са генском амплификацијом. Сви случајеви са амплификацијом гена су показали експресију HER2 протеина у степену 3+. Један случај са четири метастатска лимфна чворова који показују укупну експресију HER2 протеина у степену који одговара 0/1 + има мали фокус HER2 позитивних туморских ћелија (3+, кластер амплификација) у мање од 3% туморских ћелија (Слика 9).

Табела 5: Компарација укупне експресије HER2 протеина и статуса амплификације гена метастаза у лимфних чворовима.				
Статус експресије HER2 протеина у лимфним чворовима	Статус амплификације HER2 гена у лимфним чворовима			
	Без амплификације	Граничан	Амплификован	УКУПНО
Негативан (0/1+)	76.3% (29/38)	10.5% (4/38)	0.0% (0/38)	86.8% (33/38)
Граничан (2+)	0.0% (0/38)	0.0% (0/38)	0.0% (0/38)	0.0% (0/38)
Позитиван (3+)	0.0% (0/38)	0.0% (0/38)	13.2% (5/38)	13.2% (5/38)
УКУПНО	76.3% (29/38)	10.5% (4/38)	13.2% (5/38)	100% (38/38)

Слика 9. Метастазе лимфних чворова које показују интратуморску хетерогеност.
А: мало увећање; В: велико увећање површине означене правоугаоником на слици 9А.



4.3.Поређење HER2 статуса примарног тумора и метастаза у лимфним чворовима

У табели 6. приказано је поређење статуса експресије HER2 протеина примарног карцинома дојке и његових метастаза у лимфних чворова (агрегатни статус лимфних чворова) ($p < 0,001$). Четири од 38 случајева (10,5%) имало је гранични статус експресије HER2 протеина у примарном тумору, али негативан статус у метастазама. Губитак експресије протеина (3 + до 0/1 +) је примећен у два од 38 случајева (5,3%). Тако су разлике између примарних тумора и лимфних чворова метастаза у нивоу експресије HER2 протеина забележене у 6 случајева (15,8%) који су изгубили 2+ или 3+ статус протеина у метастазама.

Табела 6. Статус експресије HER2 протеина примарног тумора и експресије HER2 протеина у метастазама у лимфним чворовима				
HER2 протеинска експресија у лимфним чворовима	HER2 протеинска експресија у примарном тумору			
	Негативна (0/1+)	Гранична (2+)	Позитивна (3+)	Укупно
Негативна (0/1+)	71.1% (27/38)	10.5% (4/38)	5.3% (2/38)	86.8% (33/38)
Гранична (2+)	0.0% (0/38)	0.0% (0/38)	0.0% (0/38)	0.0% (0/38)
Позитивна (3+)	0.0% (0/38)	0.0% (0/38)	13.2% (5/38)	13.2% (5/38)
Укупно	71.1% (27/38)	10.5% (4/38)	18.4% (7/38)	100% (38/38)

Однос статуса амплификације HER2 гена у примарном тумору и метастаза у лимфним чворовима ($p < 0,001$) приказан је у табели 7. Међу случајевима са HER2 амплификованим примарним тумором, један је био без амплификације, а друга два су показивала граничну HER2 амплификацију у метастазама у лимфним чворовима. У два случаја без HER2 амплификације примарног тумора, уочене су HER2 граничне метастазе.

Табела 7. Однос статуса амплификације HER2 гена примарног тумора и збирног статуса амплификације метастаза у лимфним чворовима.				
Статус HER2 генске амплификације у лимфним чворовима	Статус HER2 генске амплификације у примарном тумору			
	Без амплификације	Граничан	Амплификован	Укупно
Без амплификације	73.7% (28/38)	0.0% (0/38)	2.6% (1/38)	76.3% (29/38)
Граничан	5.3% (2/38)	0.0% (0/38)	5.3% (2/38)	10.5% (4/38)
Амплификован	0.0% (0/38)	0.0% (0/38)	13.2% (5/38)	13.2% (5/38)
Укупно	78.9% (30/38)	0.0% (0/38)	21.1% (8/38)	100% (38/38)

У закључку, један случај са HER2 позитивним примарним тумором имао је HER2 негативне метастазе. Додатна два случаја са HER2 позитивним примарним тумором су имала метастазе са граничним статусом генске амплификације без прекомерне експресије протеина. Два случаја са HER2 негативним примарним тумором су такође имала метастазе са граничним статусом амплификације без прекомерне експресије протеина. Стога, статус HER2 генске амплификације између примарног тумора и његових метастаза у лимфним чворовима је био различит код 5 од 38 пацијенткиња тј 13.2%.

4.4.Интернодална HER2 хетерогеност

Интеродална HER2 хетерогеност међу метастазама лимфних чворова анализирана је код 23 од 38 (56,1%) пацијенткиња које су имале више од једног метастатског лимфног чвора. Интеродална HER2 хетерогеност је пронађена код 17,4% (4/23) пацијенткиња. Као што је приказано у табели 8, интернодална хетерогеност је била последица присуства метастаза оба HER2 негативног и HER2 еквивокалног статуса амплификације гена унутар исте аксиле; ниједна од ових метастаза није била HER2 позитивна.

У три од ове четири пацијенткиње, метастазе су имале негативни статус експресије HER2 протеина (0 или 1+). Пацијенткиња број 3 у овој табели имала је четири метастатска лимфна чвора, од којих сви показују ниво експресије протеина 0/1 +. У једном од лимфних чворова, примећена је мала површина јасно HER2 позитивних туморских ћелија. За разлику од 0/1 + без појачаног „*background*-а“, ове ћелије су показале јаку и потпуну мембрану позитивност и кластер амплификацију HER2 гена (Слика 7.). Пошто је HER2

позитиван фокус био врло ограничен величином (<3% туморских ћелија), метастаза у овом лимфном чвору била је категорисана као HER2 негативна.

Табела 8. Интернодална хетерогеност метастаза аксиларних лимфних чворова у односу на њихов статус амплификације HER2 гена

Пацијенткиња	Број лимфних чворова	HER2 неамплификовани	HER2 гранични	HER2 амплификовани
1	2	1	1	0
2	3	2	1	0
3	4	3	1	0
4	4	1	3	0

Ниједан од 23 случаја није показао присуство HER2 негативних и HER2 позитивних метастаза унутар исте аксиле. Интернодална HER2 хетерогеност била је ограничена на четири „гранична“ случаја приказана у табели 8. Заправо, у већини случајева није било одступања од HER2 статуса. У једном случају, 17 метастатских лимфних чворова анализирано је у истој аксиле: свих 6120 појединачних туморских ћелија у 51 анализираном микроскопском пољу показале су експресију протеина 0, ниједна од њих није имала >6 HER2 копија гена и однос HER2 гена-центромере 17 варирао је мало између 0.9322 и 1.2407 по микроскопском пољу. Још један пример је случај са 11 метастатских лимфних чворова унутар исте аксиле, од којих су сви имали негативан HER2 статус, 0/1 + протеинску експресију, однос HER2/CEN17 око 1,00 и нема туморских ћелија са >6 HER2 копија гена међу 1320 испитиваних туморских ћелија. Слично томе, свих пет HER2 позитивних метастатских случајева показали су експресију протеина у степену 3+ и били су HER2 амплификовани у свим испитиваним лимфним чворовима у свим испитиваним микроскопским пољима.

4.5. Интратуморска (интранодална) хетерогеност

Интратуморска (интранодална) хетерогеност је анализирана код 38 пацијенткиња. Анализирано је укупно 108 лимфних чворова. Расподела броја лимфних чворова и статуса HER2 амплификације приказана је у табелама 9. и 10.

Табела 9. Расподела броја анализираних лимфних чворова									
	Број лимфних чворова								УКУПНО
	1	2	3	4	6	9	11	17	
Пацијенткиње (n=38)	14	13	3	4	1	1	1	1	108

Табела 10. Расподела HER2 амплификације у лимфним чворовима									
	HER2 амплификација								
	негативна		гранична		позитивна		УКУПНО		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Лимфни чворови (n)	81	75,00	6	5,56	21	19,44	108	100	
HER2/CEP17 однос	1.07 +/- 0.16		1.94 +/- 0.10		12.19 +/- 22.30				

У 21 лимфном чвору где је присутна позитивна HER2 амплификација, код 20 (95,24%) је анализирано 3 арее туморских ћелија, а само у једном лимфном чвору анализирана је једна ареа. Код свих лимфних чворова где је амплификација HER2 гранична анализирани су по три арее туморских ћелија. У 81 лимфном чвору где је негативна HER2 амплификација, код 79 (97,54%) је анализирано 3 арее туморских ћелија, у једном лимфном чвору (1,23%) анализирана је само једна, а у једном (1,23%) две арее туморских ћелија.

У све три анализиране арее туморских ћелија у свим анализираним лимфним чворовима код 27 пацијенткиња HER2 амплификација је негативна, као и код једне пацијенткиње где су у једном лимфном чвору анализиране ара 1 и 2 негативне.

У све три анализиране арее туморских ћелија у свим анализираним лимфним чворовима код 5 пацијенткиња HER2 амплификација је позитивна.

У табели 11. приказана је расподела HER2 амплификације у лимфним чворовима код пацијенткиња са присутном интранодалном хетерогености

Табела 11. Расподела HER2 амплификације у лимфним чворовима код пацијенткиња са присутном интранодалном хетерогености				
Пацијенткиња	Број анализираних лимфних чворова	HER2 амплификација		
		Ареа 1	Ареа 2	Ареа 3
1	2	гранична	негативна	негативна
		гранична	негативна	гранична
2	4	негативна	негативна	негативна
		негативна	негативна	негативна
		негативна	негативна	негативна
		позитивна	гранична	негативна
3	3	негативна	негативна	негативна
		негативна	негативна	негативна
		гранична	гранична	гранична
4	4	негативна	негативна	негативна
		гранична	гранична	гранична
		гранична	негативна	гранична
		негативна	гранична	гранична

HER2 интранодална хетерогеност је била статистички сигнификантна ($p < .001$).

4.6.Микрохетерогеност

Микрохетерогеност је анализирана у 108 лимфних чворова код 38 пацијенткиња. Код шест пацијенткиња уочена је микрохетерогеност и то у 22 лимфна чвора, тј. код четири пацијенткиње у свим анализираним лимфним чворовима (9/9, 6/6 и три пута 2/2), док је код једне пацијенткиње од 4 анализираних лимфних чворова микрохетерогеност потврђена у једном лимфном чвору (табеле 12А. и 12Б.).

Табела 12А. РАСПОДЕЛА МИКРОХЕТЕРОГЕНОСТИ У ЛИМФНИМ ЧВОРОВИМА				
Пацијенткиња		Микрохетерогеност		Укупно анализираних лимфних чворова
		Не	Да	
	1	3	0	3
	2	2	0	2
	3	2	0	2
	4	1	0	1
	5	4	0	4
	6	1	0	1
	7	1	0	1
	8	11	0	11
	9	0	9	9
	10	0	6	6
	11	0	2	2
	12	2	0	2
	13	3	0	3
	14	1	0	1
	15	1	0	1
	16	17	0	17
	17	1	0	1
	18	2	0	2
	19	4	0	4
	20	1	0	1
	21	2	0	2
	22	1	0	1
	23	0	2	2
	24	1	0	1
	25	1	0	1
	26	1	0	1
	27	2	0	2
	28	1	0	1
	29	2	0	2
Наставак у табели 12Б.				

Табела 12Б. РАСПОДЕЛА МИКРОХЕТЕРОГЕНОСТИ У ЛИМФНИМ ЧВОРОВИМА				
Пацијенткиња		Микрохетерогеност		Укупно анализираних лимфних чворова
		Не	Да	
	30	2	0	2
	31	1	0	1
	32	1	0	1
	33	3	1	4
	34	3	0	3
	35	0	2	2
	36	2	0	2
	37	2	0	2
	38	4	0	4
Total		86	22	108

HER2 микрохетерогеност је била статистички сигнификантна ($p < .001$).

5. ДИСКУСИЈА

Одавно је познато да примарни карцином дојке садржи веома мали проценат ћелија које су одговорне за метастазе; ови клонови не морају бити детектовани и могу имати генетске карактеристике различите од већине ћелија примарног тумора⁶⁹.

У ретроспективној студији коју је спровео *Liedtke* и сарадници⁷⁰ на укупно 789 пацијената са рекурентним карциномом дојке, неслагање у HER2 експресији између примарног и метастатског тумора је нађена у 13,6%.

Nishimura и сарадници су проучавали различиту експресију ER, PR, HER2, Ki-67, и p53 између примарног и рекурентног метастатског тумора код 97 пацијената са карциномом дојке⁷¹. У 11 од 97 болесника (11,3%), HER2 је био прекомјерно експримиран у рекурентном за разлику од примарних тумора.

Liu и сарадници су проучавали промене у ER, PR и HER2 статусу после терапије⁷². Експресију поменутих маркера аутори су анализирали на на узорцима ткива примарног тумор и метастаза у јетри и то на начин да су пацијенте поделили у две групе; прва група је обухватала 46 пацијенткиња, без јасних метастаза у моменту дијагнозе, третираних или са неoadјувантом терапијом или операцијом као примарним третманом, а касније адјувантном терапијом код пацијенткиња које су развиле метахроне метастазе у јетри. У другу групу је било укључено 12 пацијенткиња са метастатском болешћу у јетри у време постављања дијагнозе. У првој групи, пацијенткиње које су имале позитиван ER / PR статус примиле су хормонску терапију; 66,7% пацијенткиња са HER2-позитивним примарним тумором су третиране су трастузумабом, а све пацијенткиње су примиле

адјувантну хемиотерапију (*Docetaxel, Epirubicin, Ciklofosamid; Epirubicin, Docetaxel; Docetaxel, Ciclophosphamide; Ciklofosamid, Epirubicin, Fluorouracil*). Статус HER2 је измењен у 10,9% случајева у првој групи и 8,3% у другој групи.

Niikura и сарадници су проценили стопе несклада HER2 између примарних тумора дојке и метастаза након третмана хемиотерапијом или трастузумабом⁷³. Готово четвртина пацијенткиња (24%) које су имале HER2-позитиван примарни тумор резултирале су са HER2-негативним метастазама. Посебно интересантно је то да је стопа несклада HER2 статуса била значајно различита у пацијенткиња које су примале хемиотерапију са или без трастузумаба, у односу на пацијенткиње које су примиле или нису примиле само трастузумаб. Тиме се наглашава селективна улогу лека или лекова (у овом случају трастузумаба) у окружењу тумора. У ствари, стопа несклада HER2 је била присутна у 20% пацијенткиња које су третиране трастузумабом и 26% у пацијенткиња које нису примиле трастузумаб прије биопсије метастатског тумора. Насупрот томе, 27% пацијенткиња третираних хемиотерапијом имало је промене статуса HER2 у односу на 10% пацијенткиња које нису примиле хемиотерапију.

Синхроне метастазе у аксиларним лимфним чворовима могу потенцијално представљати популацију метастатских ћелија бољу (за проучавање) него оних у примарном тумору. Претпоставља се да ћелије које метастазирају локално путем лимфатика могу бити биолошки различите од ћелија способних за васкуларну инвазију и затим метастазирање на удаљене локације⁷⁴.

Према ранијим студијама, *Jensen* и сарадници⁷⁵ су уочили несклад HER2 експресије између примарног тумора и асинхроних метастаза у 9% испитаника; међутим, нису нашли

разлику између примарног тумора и синхроних метастаза у аксиларним лимфним чворовима^{76,77}.

Насупрот томе, *Aitken et al.* пронашли су значајан број пацијената са нескладним статусом рецептора у синхроним аксиларним чворовима у поређењу са примарним тумором⁷⁸. Ниједна од пацијенткиња укључених у истраживање није примила било какву неoadјувантну терапију, тако да је већина промена била независна од терапије и вероватно у вези са хетерогеношћу тумора. Промена у статусу HER2 уочена је код 9,9% пацијенткиња, 14 од њих (7,4%) је имало промену статуса од негативног ка позитивном, а 3 са позитивног на негативан HER2 статус (1,5%).

У закључку истраживања више студија које су се бавиле овом темом, Сабрина Роси и сарадници наводе високу HER2 подударност између примарних тумора и метастаза у аксиларним лимфним чворовима или у удаљеним метастазама⁷⁸⁻⁸¹. У нескладним случајевима, чешће су HER2-позитивне метастазе са негативним примарним туморима него супротно. Овај феномен би могао бити у корелацији са појачаном агресивношћу тумора или са подцењивањем прекомерне експресије HER-2 протеина у примарном тумору од стране патолога.

Раније се статус HER2 сматрао релативно хомогеним у свим ћелијама унутар тумора и константним током прогресије карцинома дојке, сугеришући да би *antiHER2* терапија требала бити успешна тј деловати на већину ћелија тумора код пацијенткиња са HER2-позитивним карциномом дојке⁸². Међутим, све више се препознаје интратуморска хетерогеност експресије HER2 протеина и *HER2* амплификације гена у значајном проценту карцинома дојке^{58,83-86}. Готово сви случајеви *HER2* генске или регионалне

хетерогености чија је процена базирана на *HER2/CEP17* односу показивали су негативну или граничну амплификацију *HER2*. Овакав налаз условљава закључак да постоји уска повезаност између интратуморске хетерогености *HER2* и негативне *HER2* амплификације или граничне експресије *HER2* протеина^{58,83–85}. Код пацијенткиња са тумором који показује ниску амплификацију *HER2* и *HER2* регионалну хетерогеност процењену *HER2 / CEP17* односом, клиничка корист и стопа објективног одговора на терапију су биле ниже него код пацијената са „хомогеним“ статусом *HER2*, иако статистичка значајност није доказана⁸⁷. Ови аутори у закључци наводе да резултати њиховог истраживања покрећу питање у вези са извештавањем резултата *HER2 in situ* хибридизације у пракси и релеватности истих. Они предлажу да би резултати *HER2 in situ* хибридизације требало да садрже информације о *HER2* хетерогеност - на пример, проценат тумора чије ћелије имају *HER2 / CEP17* однос већи од 2.2 и томе слично. Први корак у овом процесу је идентификација било којих области са различитим нивоима експресије, а затим анализом најмање три „репрезентатива“ поља (ареа) укључујући како амплификована тако и неамплификована подручја, а све у циљу адекватне процене *HER2* регионалне хетерогености. У претходној студији истих аутора, регионална *HER2* хетерогеност идентификована је у 18% и генетска хетерогеност у 11% од укупно 96 случајева примарног *HER2*-позитивног рака дојке, коришћењем *HER2 / CEP17* односа⁸⁵. У студији која је следила ову, пропорција тумора са *HER2* регионалном и генетском хетерогеношћу била је нижа. Могуће објашњење је да *HER2* регионална и генетска хетерогеност уско повезана са ниском или граничном *HER2* амплификацијом, а да је проценат пацијената са ниском или граничном *HER2* амплификацијом била мањи у скорашњој (23%) него у претходној студији (41%).

Како се према постојећим *ASCO/CAP* смерницама препоручује бројање по 20 ћелија у три арее, нашим истраживањем смо очекивали нешто прецизније и другачије резултате водећи се идејом да се број ћелија које се узимају у обзир прошири на по 40 у свакој од 3 арее. Међутим, иако добијени резултати нису „значајно“ другачији на већ објављене, и даље смо мишљења да се исти могу разликовати уколико би се број пацијенткиња повећао у студији која би се требала провести у блиској будућности.

Са друге стране, развојем методологије би се могао очекивати значај допринос овој проблематици што најновије студије и указују. Наиме, све претходно описане студије су користиле методе које нису укључивале *GPA (Gene-Protein Assay)* и резултате истих би можда требало посматрати на извесном одстојању. Једна од новијих која у методологији користи *GPA* је студија *Kurozumi* и сарадника⁸⁸. Исти наводе пример да је 11,8% *HER2 IHC* случајева који су идентификовани у њиховој студији, захтевало према *ASCO/CAP* смерницама, ретестирање употребом других узорака из истог тумора или пак кориштењем алтернативног тестирања *HER2* статуса; међутим за исто није било потребе јер је *GPA*, како то између осталог наводе и *Li et al.* у другој студији, прецизно поделио случајеве карцинома дојке (у коме су доминирали *HER2* гранични случајеви) на позитивне, граничне и негативне без потребе за додатним тестирањима. Према томе, *HER2 GPA* метод се може ефикасно користити као за позитивне, тако и за граничне *HER2* случајеве.

Недавне студије засноване на „*next generation sequencing*-у“ бациле су ново светло на хетерогеност тумора, ојачавајући хипотезе да варијације у *ER*, *PgR* и *HER2* статусу можда стварно одражавају клонску еволуцију генома. Хетерогеност тумора се може приписати

биолошком дрефту тумора, селективном притиску терапије која доводи до клоналне селекције са развојем новог клона ћелија тумора, или присуство малих субклонова који се рутински неоткривају унутар примарног тумора⁸⁹.

Ако се томе дода мишљење неколико новијих студија према којима постоје и „подгрупе“ HER2 негативних пацијенткиња које имају корист од HER2-усмерене терапије, развој и прецизна идентификација протокола којима се дефинише приступ оцењивању HER2 хетерогености, намеће се сама по себи.

HER2 хетерогеност је уобичајена. Може се посматрати како у простору тако и у времену. „Просторна“ варијанта се може манифестовати као интратуморална хетерогеност са присуством HER2 позитивних и HER2 негативних клонова туморских ћелија у истом инвазивном туморском фокусу или као интратуморална хетерогеност ако су одвојени HER2 позитивни и HER2 негативни туморски фокуси (примарни и/или метастатски) присутни код једног пацијента у исто време. Временска варијанта (варијанта зависна од времена) са друге стране значи да рекурентне лезије могу одступати од примарног тумора у HER2 статусу или HER2 статус тумора може да се промени током природне историје болести или под дејством терапије⁹⁰. Интратуморална HER2 хетерогеност је уочена у до 40% случајева рака дојке и представља главну препреку у лечењу ране, не-метастатске HER2 позитивне болести^{49,59,64,91}. Додатна препрека у таквој ситуацији је честа мултифокалност инвазивне компоненте у карциному дојке и чињеница да ови истовремени ипсилатерални туморски фокуси одступају у свом HER2 статусу у око 10% случајева⁹².

Разлике примарних и метастатских болести су добро проучене. Такве разлике су доказане имунохистохемијом⁹³ као и методама *in situ* хибридизације⁹⁴. Аурилио и сарадници⁸⁹

објавили су мета-анализу 31 рада који се баве овом темом, укључујући податке о скоро 3000 пацијената. Удео неслагања варира између 0 и 24%, у просеку 8%. Наши резултати спадају у исти распон од 15,8% у односу на експресију мембранских протеина и 13,2% у односу на статус амплификације гена. Један случај HER2 позитивног примарног тумора имао је HER2 негативне метастазе, додатни случајеви са HER2 позитивним примарним тумором имали су метастазе са статусом граничне амплификације без прекомерне експресије протеина и два случаја са HER2 негативним примарним туморима која су имала метастазе са граничним статусом амплификације без прекомерне експресије протеина. Терапеутска одлука заснована на HER2 статусу примарног тумора би се разликовала од оног на HER2 статусу метастаза у најмање три од ових пет случајева, или у ствари у најмање три од 38 анализираних случајева.

Насупрот већ разматраним типовима HER2 хетерогености који су добро проучени, подаци о интернодалној хетерогености лимфних чворова, метастазе карцинома дојке недостају у енглеској литератури коју смо претраживали. Стога смо проучавали метастазе лимфних чворова код 23 пацијента у нашој кохорти, оних који имају више од једног лимфног чвора са макрометастазама. Донекле неочекивано, открили смо да је HER2 статус метастаза био хармоничан у већини случајева, чак и у 17 или 11 метастатских чворова у истој аксили. Сви HER2 позитивни метастатски случајеви задржали су своју позитивност у свим испитиваним лимфним чворовима и на свим испитиваним микроскопским пољима. Суптилне разлике су нађене у форми интратуморалне HER2 хетерогености у једном случају и у форми граничне амплификације гена у четири случаја са HER2 негативним примарним туморима. Еквивалентни HER2 статус метастаза прихватили смо као одступање од негативног HER2 статуса примарних тумора. Разлог за

то је да постоје извјештаји који указују да би HER2 еквивалентни случајеви могли имати користи од циљане анти-HER2 терапије ⁹⁵.

Наша студија је искористила предности нове методе HER2 GPA која омогућава истовремену анализу статуса гена и експресије протеина унутар исте ћелије. Тиме смо потврдили претходна запажања да је метода робустна, те да се резултати могу лако проценити ⁹⁶. Дигиталне микрофотографије репрезентативних подручја омогућиле су поновну анализу резултата. Слабости студије су релативно мали број случајева унутар кохорте, ограничен број анализираних микроскопских поља и недостатак резултата праћења. Потребна су већа и проспективна истраживања да би се потврдила ова запажања.

Вишеструке метастазе у аксиларним лимфним чворовима биле су присутне у само 23 пацијента у нашој кохорти, очигледно представљајући ограничење студије, упркос великом броју проучаваних појединачних ћелија рака. За потврду резултата потребне су и планиране су веће студије.

Осим недостатка литературе на енглеском језику о већ поменутој интернодалној хетерогености, подаци од микрохетерогености су такође оскудни. Први који уопште помињу и предлажу увођење појма микрохетерогености су Хироаки Нита и сарадници ⁸⁸. У поменутом раду се наводи да HER2 GPA метод омогућава детекцију популације ћелија тумора дојке али и желуца у којима је присутна амплификација *HER2* гена без прекомерне експресије HER2 протеина у HER2 амплификованим, граничним и негативним клиничким случајевима, те предлажу да се уведе појам „микрохетерогеност“ која би означавала овај нови феномен „нескладности“ *HER2* гена и HER2 протеина у појединачној ћелији. Тиме се “HER2 микрохетерогеност” уводи као нова категорија HER2 хетерогености.

У каснијој студији која су су провели Осамура и сарадници сугерише се да би HER2 микрохетерогеност могао бити биолошки механизам резистенције на HER2 усмерену терапију, јер је „мета“ деловања трастузумаба HER2 протеин, а не *HER2* ген ⁵⁷. Према томе, туморске ћелије у којима је присутна амплификација *HER2* гена без прекомерне експресије HER2 протеина могу показати одсуство реакције на HER2 усмерену терапију.

Наредна студија коју су провели Сонг и сарадници ⁶⁴ показује да је ефикасност анти-HER2 терапије зависна од односа туморских ћелија са амплификованим *HER2* геном и прекомерном експресијом HER2 протеина и туморских ћелија са експримираним HER2 протеином. Стога су будуће студије потребне како би се испитала хипотеза HER2 микрохетерогености, јер статус хетерогености може играти значајну улогу у одређивању избора одговарајућих третмана за пацијенте са HER2 позитивним карциномом дојке.

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Постојећи критеријуми препоручени од стране ASCO/CAP применом прихваћених метода нису довољни за дијагностиковање HER2 позитивности код пацијенткиња које показују интратуморску и интертуморску хетерогеност како у примарним туморима тако и у метастазама.
2. Постоји статистички високо сигнификантан број макрометастаза лоцираних у лимфним чворовима које показују HER2 хетерогеност.
3. Постоји позитивна корелација између хетерогености нађене у примарним туморима и припадајућим метастазама у лимфним чворовима.
4. Није доказано да HER2 негативни тумори дедиференцирањем „прелазе“ у HER2 позитивне метастазе у лимфним чворовима“.
5. Наши резултати указују на релативно ретке али значајне разлике у статусу HER2 између примарног карцинома дојке и његових метастаза у аксиларним лимфним чворовима које имају потенцијални утицај на ефекат циљане терапије и исхода. Утицај ретке и суптилне интернодалне HER2 хетерогености која је доказана у овој студији остаје неизвесна. Према томе, чини се да је рационално одредити HER2 статус лимфних чворова, али процена ограниченог броја метастатских чворова може бити недовољна. Потребна су већа и проспективна истраживања да би се потврдила ова запажања.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2014 Sep 13;136(5):E359–86.
2. American Cancer Society. *Cancer Treatment & Survivorship Facts and Figures 2014-2015*. Atlanta: American Cancer Society. 2014.
3. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2014*. *Cancer Facts Fig*. 2014;1–72.
4. World Cancer Research Fund International: Continuous Update Project Report. *Analysing research on cancer prevention and survival*. 2015;(December 2015):24.
5. Регистар за рак у централној Србији. Инциденција и морталитет од рака у централној Србији 2013. Београд; 2015.
6. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr 1;49(6):1374–403.
7. Campeau M. Philippe; Foulkes D. William; Tischkowitz D. Marc. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet*. 2008;124(1):31–42.
8. Vinay Kumar, Abul K. Abbas JCA. *Robbins and Cotran's Pathological Basis of Disease*. Elsevier Saunders. 2015. 1043-1073 p.
9. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. 2005 Aug 19;95(11):866–71.

10. Chen WY. Exogenous and endogenous hormones and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008 Aug;22(4):573–85.
11. Khamis ZI, Sahab ZJ, Sang Q-XA. Active roles of tumor stroma in breast cancer metastasis. *Int J Breast Cancer.* 2012/02/19. 2012;2012:574025.
12. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, Organization. WH, et al. WHO classification of tumours of the breast. *World Health Organization classification of tumours.* 2012.
13. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;
14. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003/08/13. 2003 Sep 2;100(18):10393–8.
15. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
16. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* 2015 Sep 15;5(10):2929–43.
17. Vallejos CS, Gómez HL, Cruz WR, Pinto JA, Dyer RR, Velarde R, et al. Breast Cancer Classification According to Immunohistochemistry Markers: Subtypes and Association With Clinicopathologic Variables in a Peruvian Hospital Database. *Clin Breast Cancer.* 2010 Aug 1;10:294–300.

18. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready for Clinical Application? *J Clin Oncol*. 2005 Oct 10;23(29):7350–60.
19. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees C a, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
20. Foukakis Theodoros BJ. Prognostic and predictive factors in early, nonmetastatic breast cancer [Internet]. [cited 2018 Nov 14]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/prognostic-and-predictive-factors-in-earlynonmetastatic-breast-cancer.%0A>
21. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989;
22. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics 2015. *Cancer J Clin*. 2015;65(1):29.
23. de Boer M, van Dijck JAAM, Bult P, Borm GF, Tjan-Heijnen VCG. Breast Cancer Prognosis and Occult Lymph Node Metastases, Isolated Tumor Cells, and Micrometastases. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2010 Mar 17;102(6):410–25.
24. Andersson Y, Frisell J, Sylvan M, de Boniface J, Bergkvist L. Breast Cancer Survival in Relation to the Metastatic Tumor Burden in Axillary Lymph Nodes. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 10;28(17):2868–73.
25. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;
26. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, et al. Distinct Clinical and Prognostic Features of Infiltrating Lobular Carcinoma of the Breast:

- Combined Results of 15 International Breast Cancer Study Group Clinical Trials. *J Clin Oncol.* 2008 Jun 20;26(18):3006–14.
27. Fitzgibbons PL, Page DL, Wicker LS, et al. College of American Pathologists. Prognostic factors in breast cancer. *Arch Pathol.* 1999;
 28. ELSTON CW, ELLIS IO. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 2018 Nov 7;19(5):403–10.
 29. Frkovic-Grazio S, Bracko M. Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. *J Clin Pathol.* 2002;
 30. Colleoni M, Sun Z, Price KN, Karlsson P, Forbes JF, Thürlimann B, et al. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *J Clin Oncol.* 2016/01/19. 2016 Mar 20;34(9):927–35.
 31. Dowsett M, Allred C, Knox J, Quinn E, Salter J, Wale C, et al. Relationship Between Quantitative Estrogen and Progesterone Receptor Expression and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2) Status With Recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination Trial. *J Clin Oncol.* 2008 Mar 1;26(7):1059–65.
 32. Prat A, Cheang MCU, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2012/12/10. 2013 Jan 10;31(2):203–9.
 33. Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Overexpression As a Prognostic Factor in a Large Tissue Microarray Series of Node-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol.* 2008 Dec

- 10;26(35):5697–704.
34. Curigliano G, Viale G, Bagnardi V, Fumagalli L, Locatelli M, Rotmensz N, et al. Clinical Relevance of HER2 Overexpression/Amplification in Patients With Small Tumor Size and Node-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 1;27(34):5693–9.
 35. Lindboe CF, Torp SH. Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. *J Clin Pathol*. 2002 Jun;55(6):467–71.
 36. Luporsi E, André F, Spyrtos F, Martin P-M, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat*. 2011/11/03. 2012 Apr;132(3):895–915.
 37. (EBCTCG) EBCTCG, Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2012 Feb 4;379(9814):432–44.
 38. (EBCTCG) EBCTCG, Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2011 Aug 27;378(9793):771–84.
 39. Baselga J, Cortés J, Kim S-B, Im S-A, Hegg R, Im Y-H, et al. Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2011 Dec 7;366(2):109–19.
 40. Peraldo-Neia C, Migliardi G, Mello-Grand M, Montemurro F, Segir R, Pignochino Y, et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression

- profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. *BMC Cancer*. 2011;11(1):31.
41. Gonzalez-Angulo AM, Litton JK, Broglio KR, Meric-Bernstam F, Rakhit R, Cardoso F, et al. High risk of recurrence for patients with breast cancer who have human epidermal growth factor receptor 2-positive, node-negative tumors 1 cm or smaller. *J Clin Oncol*. 2009;27(34):5700–6.
 42. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(1):118–45.
 43. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997–4013.
 44. Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report 2014*. World Health Organization: Geneva. 2014. 953 p.
 45. Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther*. 1999;21(2):309–18.
 46. Eroglu Z, Tagawa T, Somlo G. Human epidermal growth factor receptor family-targeted therapies in the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Oncologist*. 2014;19(2):135–50.
 47. Perez EA, Press MF, Dueck AC, Jenkins RB, Kim C, Chen B, et al.

- Immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization assessment of HER2 in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer (NCCTG N9831, BCIRG 006, and BCIRG 005). *Breast Cancer Res Treat.* 2013;138(1):99–108.
48. Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, Coudry R a, Dowsett M, Osamura RY, et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol.* 2014;27(1):4–18.
 49. Cottu PH, Asselah J, Lae M, Pierga JY, Diéras V, Mignot L, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer [2]. *Ann Oncol.* 2008;19(3):596–7.
 50. Vance GH, Barry TS, Bloom KJ, Fitzgibbons PL, Hicks DG, Jenkins RB, et al. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer panel summary and guidelines. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(4):611–2.
 51. Kaufman PA, Bloom KJ, Burris H, Gralow JR, Mayer M, Pegram M, et al. Assessing the discordance rate between local and central HER2 testing in women with locally determined HER2-negative breast cancer. In: *Cancer.* 2014.
 52. Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 Status and Benefit from Adjuvant Trastuzumab in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2008;
 53. Pogue-Geile KL, Kim C, Jeong JH, Tanaka N, Bandos H, Gavin PG, et al. Predicting degree of benefit from adjuvant trastuzumab in NSABP trial B-31. *J Natl Cancer Inst.* 2013;
 54. Ni R, Mulligan AM, Have C, O'Malley FP. PGDS, A Novel Technique Combining Chromogenic In Situ Hybridization and Immunohistochemistry for the Assessment of ErbB2 (HER2/neu) Status in Breast Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*

- 2007;15(3).
55. Reisenbichler ES, Horton D, Rasco M, Andea A, Hameed O. Evaluation of dual immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization for HER2 on a single section. *Am J Clin Pathol.* 2012;137(1):102–10.
 56. Nitta H, Kelly BD, Padilla M, Wick N, Brunhoeber P, Bai I, et al. A gene-protein assay for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2): brightfield tricolor visualization of HER2 protein, the HER2 gene, and chromosome 17 centromere (CEN17) in formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissue sections. *Diagn Pathol.* 2012;7(1):60.
 57. Osamura RY, Kuwayama A, Katoh M. Abstract P4-06-12: Simultaneous phenotypic and genotypic heterogeneity at the cellular level approached by HER2 gene-protein assay (GPA) in the invasive ductal carcinoma of the breast: A new approach for cancer pathobiology. *Cancer Res.* 2014 Mar 26;73(24 Supplement):P4-06-12 LP-P4-06-12.
 58. Brunelli M, Manfrin E, Martignoni G, Miller K, Remo A, Reghellin D, et al. Genotypic intratumoral heterogeneity in breast carcinoma with HER2/ieif amplification wvaluation according to ASCO/CAP criteria. *Am J Clin Pathol.* 2009;131(5):678–82.
 59. Seol H, Lee HJ, Choi Y, Lee HE, Kim YJ, Kim JH, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol.* 2012;
 60. Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, Jang MH, Suh KJ, Ryu HS, et al. HER2 heterogeneity affects trastuzumab responses and survival in patients with her2-positive metastatic breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2014;142(6):755–66.
 61. Allison KH, Dintzis SM, Schmidt RA. Frequency of HER2 heterogeneity by fluorescence in situ hybridization according to CAP Expert Panel Recommendations: Time for a new

- look at how to report heterogeneity. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(6):864–71.
62. Yang YL, Fan Y, Lang RG, Gu F, Ren MJ, Zhang XM, et al. Genetic heterogeneity of HER2 in breast cancer: Impact on HER2 testing and its clinicopathologic significance. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134(3):1095–102.
 63. Wu JM, Halushka MK, Argani P. Intratumoral heterogeneity of *HER-2* gene amplification and protein overexpression in breast cancer. *Hum Pathol.* 2017 May 14;41(6):914–7.
 64. Song H, Kim TO, Ma SY, Park J-H, Choi J-H, Kim J-H, et al. Intratumoral heterogeneity impacts the response to anti-neu antibody therapy. *BMC Cancer.* 2014;
 65. Nitta H, Kelly BD, Allred C, Jewell S, Banks P, Dennis E, et al. The assessment of HER2 status in breast cancer: The past, the present, and the future. Vol. 66, *Pathology International.* 2016. p. 313–24.
 66. Biserni GB, Engstrøm MJ, Bofin AM. HER2 gene copy number and breast cancer-specific survival. *Histopathology.* 2016 Nov 1;69(5):871–9.
 67. Tot T. The role of large-format histopathology in assessing subgross morphological prognostic parameters: a single institution report of 1000 consecutive breast cancer cases. *Int J Breast Cancer.* 2012;2012:395415.
 68. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2013 Nov 1;31(31):3997–4013.
 69. Kuukasjärvi T, Karhu R, Tanner M, Kähkönen M, Schäffen A, Nupponen N, et al. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous

- metastasis in human breast cancer. *Cancer Res.* 1997;
70. Liedtke C, Broglio K, Moulder S, Hsu L, Kau SW, Symmans WF, et al. Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. *Ann Oncol.* 2009;
 71. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Tashima R, Toyozumi Y, Arima N. Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: Discordance rates and prognosis. *World J Surg Oncol.* 2011;
 72. Liu J, Deng H, Jia W, Zeng Y, Rao N, Li S, et al. Comparison of ER/PR and HER2 statuses in primary and paired liver metastatic sites of breast carcinoma in patients with or without treatment. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(5):837–42.
 73. Niikura N, Liu J, Hayashi N, Mittendorf EA, Gong Y, Palla SL, et al. Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol.* 2012;
 74. Rossi S, Basso M, Strippoli A, Dadduzio V, Cerchiaro E, Barile R, et al. Hormone Receptor Status and HER2 Expression in Primary Breast Cancer Compared with Synchronous Axillary Metastases or Recurrent Metastatic Disease. *Clinical Breast Cancer.* 2015.
 75. Jensen JD, Knoop A, Ewertz M, Laenkholm AV. ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous axillary nodes, and asynchronous metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;
 76. Carlsson J, Nordgren H, Sjöström J, Wester K, Villman K, Bengtsson NO, et al. HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *British Journal of Cancer.* 2004.

77. D'Andrea MR, Limiti MR, Bari M, Zambenedetti P, Montagutti A, Ricci F, et al. Correlation between genetic and biological aspects in primary non-metastatic breast cancers and corresponding synchronous axillary lymph node metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;
78. Aitken SJ, Thomas JS, Langdon SP, Harrison DJ, Faratian D. Quantitative analysis of changes in ER , PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastases. 2010;(October 2009):1254–61.
79. Strien L, Leidenius M, von Smitten K, Heikkilä P. Concordance between HER-2 and steroid hormone receptor expression between primary breast cancer, sentinel node metastases, and isolated tumor cells. *Pathol Res Pract.* 2010;
80. Cardoso F, Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, Rouas G, Dolci S, et al. Evaluation of HER2, p53, bcl-2, topoisomerase II- α , heat shock proteins 27 and 70 in primary breast cancer and metastatic ipsilateral axillary lymph nodes. *Ann Oncol.* 2001;
81. Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, Rouas G, Pedrocchi M, Paesmans M, et al. Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol.* 2002;
82. Nahta R, Yu D, Hung M-C, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006 May 1;3:269.
83. Lewis JT, Ketterling RP, Halling KC, Reynolds C, Jenkins RB, Visscher DW. Analysis of intratumoral heterogeneity and amplification status in breast carcinomas with equivocal (2+) HER-2 immunostaining. *Am J Clin Pathol.* 2005;
84. Striebel JM, Bhargava R, Horbinski C, Surti U, Dabbs DJ. The equivocally amplified

- HER2 FISH result on breast core biopsy: Indications for further sampling do affect patient management. *Am J Clin Pathol.* 2008;
85. Seol H, Lee HJ, Choi Y, Lee HE, Kim YJ, Kim JH, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol.* 2012;25(7):938–48.
 86. Bernasconi B, Chiaravalli AM, Finzi G, Milani K, Tibiletti MG. Genetic heterogeneity in HER2 testing may influence therapy eligibility. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;
 87. Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, Jang MH, Suh KJ, Ryu HS, et al. HER2 heterogeneity affects trastuzumab responses and survival in patients with her2-positive metastatic breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2014;
 88. Kurozumi S, Padilla M, Kurosumi M, Matsumoto H, Inoue K, Horiguchi J, et al. HER2 intratumoral heterogeneity analyses by concurrent HER2 gene and protein assessment for the prognosis of HER2 negative invasive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;
 89. Aurilio G, Disalvatore D, Pruneri G, Bagnardi V, Viale G, Curigliano G, et al. A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer.* 2014;
 90. Zardavas D, Irrthum A, Swanton C, Piccart M. Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015 Apr 21;12:381.
 91. Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, Coudry RA, Dowsett M, Osamura RY, et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: Clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Modern Pathology.* 2014.
 92. Pekar G, Gere M, Tarjan M, Hellberg D, Tot T. Molecular phenotype of the foci in

- multifocal invasive breast carcinomas: Intertumoral heterogeneity is related to shorter survival and may influence the choice of therapy. *Cancer*. 2014;120(1):26–34.
93. Pakdel AF, Memar B, Anvari K, Shandiz FH, Ivani S. Comparison of Estrogen , Progesterone and Her2 Receptors in Primary Breast Cancer and Paired Metastatic Lymph Nodes : An Immunohistochemical Study. 2017;10(5).
 94. Cho EY, Han JJ, Choi Y, Kim K, Oh YL. Comparison of Her-2 , EGFR and Cyclin D1 in Primary Breast Cancer and Paired Metastatic Lymph Nodes : An Immunohistochemical and Chromogenic In Situ Hybridization Study. 2008;
 95. Harigopal M, Barlow WE, Tedeschi G, Porter PL, Yeh IT, Haskell C, et al. Multiplexed assessment of the Southwest Oncology Group-directed intergroup breast cancer trial S9313 by AQUA shows that both high and low levels of HER2 are associated with poor outcome. *Am J Pathol*. 2010;
 96. Pekar G, Kasselaki I, Lukacs AP, Dekany C, Hellberg D, Tot T. Equivocal (HER2 IHC 2+) breast carcinomas: gene-protein assay testing reveals association between genetic heterogeneity, individual cell amplification status and potential treatment benefits. *Histopathology*. 2018 Aug 16;0(ja).