



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Светлана Опрић

**ПТЕН ГЕНСКЕ МУТАЦИЈЕ У СУБТИПИЗАЦИЈИ
ХЕР2 ПОЗИТИВНЕ ПРОГНОСТИЧКЕ ГРУПЕ
ТУМОРА ДОЈКЕ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2012.година

САДРЖАЈ

1. Увод	1
2. Циљеви и хипотезе	36
3. Материјал и методе.....	36
4. Детаљан опис методологије	37
5. Статистичке методе	38
6. Очекивани резултати и значај студије	39
7. Дискусија	84
8. Закључак	91
9. Литература	92

ПТЕН генске мутације у субтипизацији Хер2 позитивне прогностичке групе тумора дојке

1. Увод

Карцином дојке је клинички хетерогена болест и постојећа хистолошка класификација не покрива комплетно клинички ток болести. Хистолошки тип, градус, величина тумора, захватање лимфних чворова, рецептори за естроген и Хер2 рецепторски статус утичу на прогнозу и вероватно на одговор на системску терапију. Ово се користи као комбинација у Ноттингхам прогностичком индексу (Пусзтаи Л ет ал., 2006). Уопштено је прихваћено да хистолошки идентични тумори имају различите клиничке токове и да је то резултат молекуларних разлика између карцинома. То значи да би детаљне молекуларне анализе побољшале предвиђање тока болести. Имунохистохемијске методе су омогућиле поделу карцинома дојке у ЕР позитивне и ЕР негативне туморе, даље је издвојена група Хер2 позитивних тумора. Треба нагласити да постоје разлике између лабораторија у проценту позитивности налаза, што зависи од фиксације ткива, ослобађања антигена и метода бојења.

Класификација карцинома дојке у ЕР позитивне и Хер2 позитивне категорије је корисна због таргет терапије. Молекуларне промене на основу којих се одређују посебне подгрупе довеле су до откривања нових терапијских таргета и нових метода лечења који су ефикасни у појединим подгрупама. На основу испитивања експресије гена сугерисано је постојање четири велике групе карцинома дојке: луминал-лајк, базал лајк, нормал-лајк и Хер2 позитивни тумори. Даље студије су указале да постоји велика скала експресије гена између ЕР позитивних тумора (који су углавном луминал лајк) и ЕР негативних тумора (који су углавном базал лајк) сугеришући и даље генске разлике између хистолошких типова. Прогноза и осетљивост на хемотерапију различитих молекуларних подгрупа је различита. Луминал лајк тумори имају најповољнију прогнозу и дуже преживљавање у поређењу са другим подтипovima док базал лајк и Хер2 позитивни тумори су осетљивији на хемотерапију. Луминал лајк тумори су ЕР позитивни и ниског градуса и зато осетљиви на хормонотерапију и имају повољнију прогнозу у односу на ЕР негативне туморе и високо градусне базал лајк туморе.

Фактори ризика код карцинома дојке

Фактори ризика су сви они фактори који повећавају ризик да се добије болест у конкретном случају карцином дојке. За различите карциноме постоје различити фактори ризика. Као на пример излагање дејству сунчеве светлости је ризик за карциноме коже, пушење је ризик за карцином плућа, усне дупље, ларинкса, мокраћне бешике, бубрега и неких других органа.

Само присуство фактора ризика за карциноме не значи обавезно да ће пацијент и добити карцином. Већина жена која има један или више фактора ризика никад не добија карцином, а са друге стране неке жене не показују присуство фактора ризика а добију карцином дојке.

Постоји више врста фактора ризика. Неки фактори као старост пацијенткиња или раса се не могу променити. Други су у вези са факторима спољне средине. Неки су у вези са понашањем особа, као што су пушење, конзумирање алкохола и дијета. Неки фактори показују већи ризик од других, а фактори ризика се мењају у току живота, као што су старост и животне навике.

Бројни молекуларни маркери су идентификовани као прогностички и предиктивни фактори код пацијенткиња са карциномом дојке. Ту се наводе хистолошки тип, градус, величина тумора, стање регионалних лимфних чворова, рецепторски статус, Хер2 статус, затим п53 мутације и Бцл2 амплификација. У новије време се истражују гени који су у вези са прогнозом (Тонини Г., 2008).

Фактори ризика које не можемо променити

Пол

Жене чешће добијају карцином дојке од мушкараца јер су ћелије дојке константно изложене деловању женских полних хормона, естрогена и прогестерона. Жене имају 100 x чешће карцином од мушкараца.

Старост

Ризик од појаве карцинома дојке расте са годинама старости. Код жена млађих од 45 година карцином дојке се јавља код сваке осме жене, а после 55 године живота много чешће.

Генетски фактори ризика

Мисли се да је 5-10% канцера изазвано херeditарним факторима због мутација у одређеним генима.

БРЦА1 и БРЦА2

Најчешће наследне мутације су у БРЦА1 и БРЦА2 генима. БРЦА1 мутације су строго удружене са базалним фенотипом тумора што указује на лошу прогнозу ових пацијената. БРЦА1 удружени тумори су високо пролиферативни и имају мутације у Тп53 а губи се експресија ЕРББ2 (Сорлие Т., 2003). У нормалним ћелијама ови гени спречавају појаву карцинома стварајући протеине који штите ћелије од абнормалности у расту. Ако дође до мутације гена код родитеља онда ћерке имају повећан ризик од појаве карцинома. Жене са наслеђеним мутацијама БРЦА1 и БРЦА2 имају до 80% шансе да добију карцином дојке у току живота, а када га добију углавном се ради о млађим женама у односу на нормалну популацију. Ове жене такође имају повећан ризик од развоја карцинома јајника.

Промене у другим генима

И промене у неким другим генима могу довести до појаве карцинома дојке. То су:

- 1. АТМ:** АТМ ген нормално помаже у обнови ДНА. Неке фамилије са високим постотком карцинома дојке имају заправо мутације у овом гену.
- 2. ЦХЕК2:** ЦХЕК2 ген повећава ризик за појаву карцинома дојке два пута. Код жена које носе ЦХЕК2 мутирани ген и имају позитивну фамилијарну анамнезу, ризик је знатно већи.
- 3. п53:** наслеђене мутације п53 тумор супресорног гена знатно повећавају ризик од развоја карцинома дојке, као и неких других малигнитета као што су леукемије, тумори

мозга и саркоми. Ли Фраумени синдром, назван по именима два истраживача који су први описали овај наследни синдром, је редак узрок појаве карцинома дојке.

4. ПТЕН: ПТЕН ген нормално учествује у регулацији раста ћелија. Наследне мутације овог гена изазивају Ковден синдром, редак поремећај где пацијенти имају повећан ризик за бенигне и малигне туморе дојке, дигестивног тракта, тироидеје, утеруса и оваријума.

Фамилијарна анамнеза код карцинома дојке

Ризик од појаве карцинома дојке је већи ако су блиски рођаци имали исти. Код рођака прве линије (мајка, сестра или ћерка) који су имали карцином дојке ризик је 5 x већи.

Мада прави ризик није тачно утврђен, жене са позитивном фамилијарном анамнезом о карциному дојке код оца или брата такође имају повећан ризик од појаве овог тумора. Око 20-30% жена са карциномом дојке има позитивну фамилијарну анамнезу.

Лична анамнеза о карциному дојке

Жене које су имале карцином једне дојке имају 3-4 пута већи ризик за развој карцинома у другој дојци или рецидив у истој, у односу на нормалну популацију.

Раса и етничка припадност

Белкиње имају нешто већу шансу да добију карцином дојке него црнкиње. Међутим црнкиње имају већу смртност од карцинома дојке, јер су код њих тумори агресивнији, за сада из непознатих разлога. Жене из Азије, Шпаније и рођене американке показују мањи ризик од развоја карцинома дојке.

Густина жлезданог ткива дојке

Жене са гушћим ткивом дојке (на мамографији) имају више жлезданог ткива и веће шансе да добију карцином дојке.

Нека бенигна стања у дојци

Жене са неким бенигним променама у дојци показују већи ризик од развоја карцинома дојке. Обично се бенигна стања деле у три главне групе, према ризику од појаве малигнитета.

I. Не пролиферативне лезије

Ова стања се карактеришу са прерастањем ткива дојке. Она не повећавају ризик од појаве карцинома, или га врло мало повећавају. Ту спадају:

- фиброцистична болест
- блага хиперплазија
- аденоза (несклерозирајућа)
- фиброаденом
- бенигни филодни тумор
- папилом
- некроза масног ткива
- маститис
- дуктектазија
- други бенигни тумори (липом, хамартом, хемангиом, неурофибром)

II. Пролиферативне лезије без атипичности

Ове лезије показују повећан раст ћелија у дуктусима и лобулусима дојке. Оне повећавају ризик од појаве карцинома 1-2 пута. Ту спадају:

- обична хиперплазија дуктусног епитела (без атипичности)
- комплексни фиброаденом
- склерозирајућа аденоза
- више папилома или папиломатоза
- радијарни ожиљак (радиал скар)

III. Проллиферативне лезије са атипичијом

У овим стањима се види повећан раст ћелија дојке, како дуктуса тако и лобулуса, и ћелије не изгледају нормално. Ово повећава ризик од настанка карцинома дојке 4-5 пута. Ту спадају:

-Атипична дуктална хиперплазија (АДХ)

-Атипична лобуларна хиперплазија (АЛХ)

Ове жене имају повећан ризик 8-10 пута за развој карцинома дојке.

Менструациони циклуси

Жене које су имале више менструационих циклуса, јер су рано добиле менструацију (пре 12 године) и/или је имале дуг период времена (после 55 године живота) имају лако повећани ризик од развоја карцинома дојке. То је у вези са дужим излагањем деловању естрогена и прогестерона.

Претходно зрачење грудног коша

Жене које су у детињству или младости примале радиотерапију на предео грудног коша имају већу склоност ка канцеру дојке. Ово је и у зависности од година старости кад је пацијенткиња зрачена. Ако је примењивана и хемиотерапија ризик је нешто мањи јер хемиотерапија смањује стварање оваријалних хормона. Међутим ако се ова комбинација лечења примењује у адолесценцији ризик се повећава.

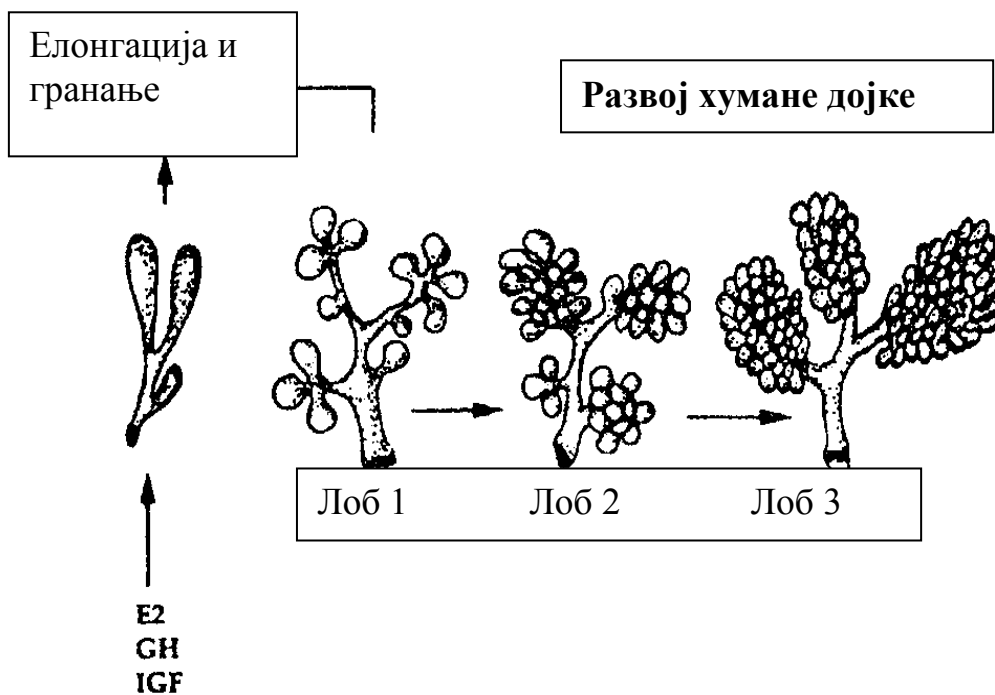
Примена диетилстилбестрола

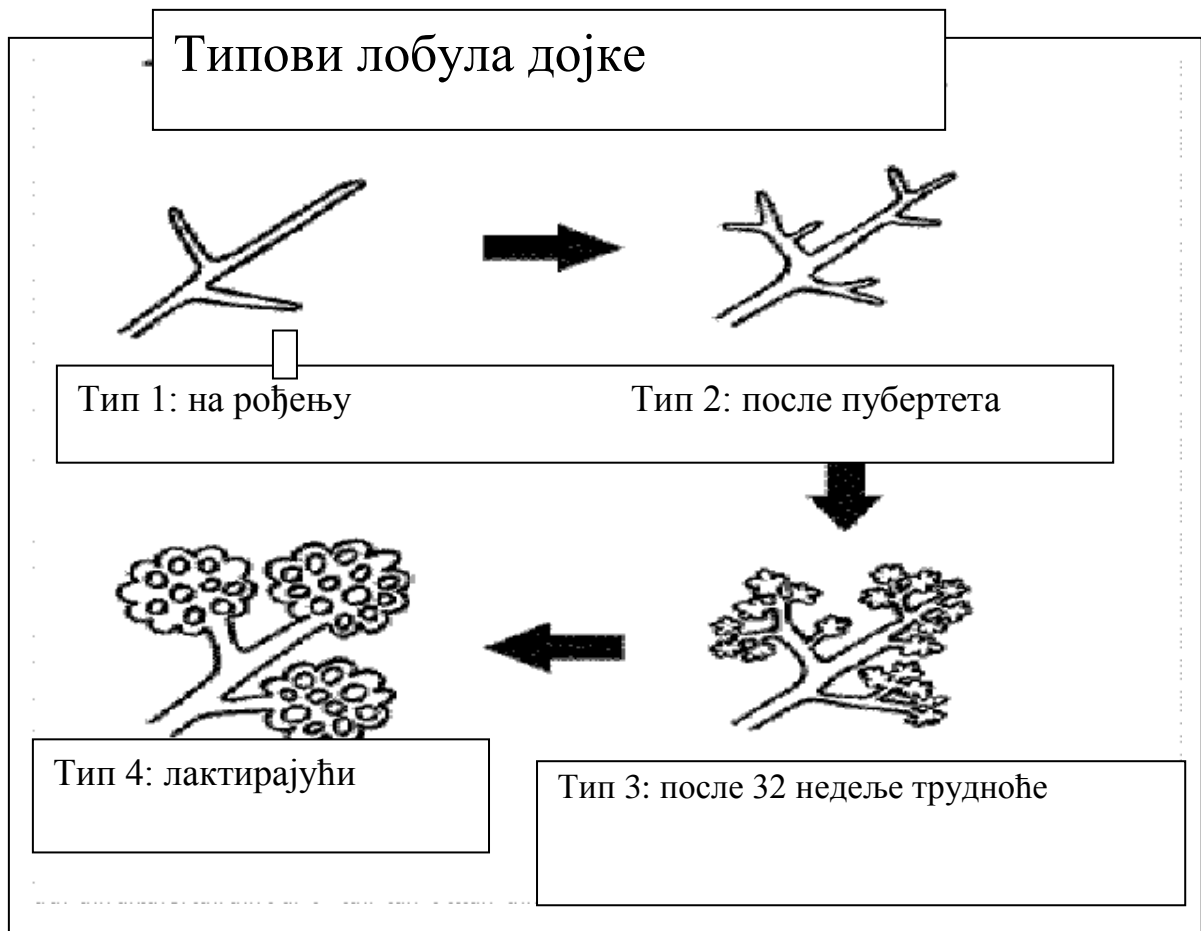
Између 1940. и 1960. године неке труднице су примале диетилстилбестрол (ДЕС) ради одржавања трудноће. Ове жене су имале лако повећан ризик од развоја карцинома дојке. Жене чије су мајке примале ДЕС у току трудноће такође имају повећан ризик од развоја карцинома дојке.

Животне навике и ризик за појаву карцинома дојке

Немање деце или добијена деца у каснијем животном добу. Жене које немају децу или су прво дете добиле након 30 године живота имају лако повећан ризик од појаве карцинома дојке. Више деце и рана прва трудноћа смањују ризик од појаве карцинома дојке. Трудноћа смањује број менструационих циклуса у току живота што је и разлог оваквог ефекта.

Шема 1. Лобулуси дојке





Скорија употреба контрацептивних средстава

Жене које су користиле орална контрацептивна средства имају лако повећан ризик од појаве карцинома дојке у односу на жене које их нису користиле. Жене које задњих 10 година не користе орална контрацептивна средства не показују повећани ризик.

Постменопаузна хормоно терапија

Постменопаузна хормоно терапија (ПХТ) позната и као субституциона хормонотерапија користи се више година да би се смањили постменопаузни симптоми и превенирала остеопороза. Ранија испитивања су сугерисала да можда има и других здравствених добитака, али то новијим студијама није потврђено.

Постоје два главна типа постменопаузне хормоно терапије. За жене које имају још увек утерус углавном се дају естроген и прогестерон (комбинована хормоно терапија). Пошто естроген сам по себи повећава ризик од карцинома утеруса, то се додаје прогестерон да спречи овај ефекат. За жене које немају утерус преписује се само естроген. Ово је познато као естроген субституциона терапија.

Комбинована постменопаузна хормонотерапија

Дуготрајна употреба (неколико година или још више) комбиноване постменопаузне хормоно терапије повећава ризик од појаве карцинома дојке. Велике клиничке студије су доказале везу између ове терапије и појаве карцинома дојке. Ризик нестаје ако се ова терапија није примењивала бар 5 година.

Субституциона терапија само естрогеном

Употреба само естрогена изгледа да не повећава ризик од појаве карцинома дојке. Међутим ако се естроген користи 10 и више година онда ризик од појаве канцера дојке и оваријума расте.

Комбинова субституциона хормонотерапија повећава ризик од срчаних болести, коагулационих поремећаја и шлога. Међутим иста смањује ризик од колоректалног карцинома и остеопорозе.

Недојење

Неке студије указују да дојење лако снижава ризик од појаве карцинома дојке, нарочито ако исто траје 1,5 до 2 године. Објашњење је да се смањује број менструационих циклуса.

Алкохол

Употреба алкохола је повезана са повећаним ризиком за карцином дојке. Ризик је у зависности од количине унетог алкохола.

Прекомерна тежина

Повећана тежина повећава ризик од канцера дојке нарочито код жена после менопаузе. Пре менопаузе јајници стварају много естрогена а масно ткиво ствара мало естрогена. После менопаузе највећи део естрогена код жена потиче из масног ткива и исти је одговоран за повећан ризик од појаве карцинома дојке.

Овај проблем је комплексан јер је ризик повећан код жена које су се угојиле у адултном периоду а не и код оних које су дебеле од детињства. Масне ћелије у разним деловима тела имају разлике у садржају естрогена.

Одсуство физичке активности

Физичка активност редукује ризике за појаву карцинома дојке. Једино се поставља питање како то физичка активност редукује ризик. Вежбање 1-3 сата недељно редукује ризик за 18%. Ходање 10 км недељно редукује ризик од појаве канцера за 20%. Америчко удружење за канцер препоручује једносатну физичку активност 5 дана у недељи.

Фактори са нејасним, контроверзним или недоказаним ефектом на ризик од појаве карцинома дојке

Јако масна храна

Није доказано да јако масна храна повећава ризик од појаве карцинома дојке. Карцином дојке је ређи у земљама са ниским садржајем масти у храни. Међутим има и супротних мишљења.

Антиперспиранти

Антиперспиранти се ресорбују преко коже, интерферишу са циркулацијом лимфе и доносе токсине до дојке и могу да изазову карцином.

Импланти у дојци

Није доказан повећан ризик за карцином дојке код силиконских протеза.

Досадашње класификације тумора дојке

Класификације тумора дојке

1. Клиничко патолошка класификација

- Карцином ин ситу (15%)
- Инвазивни карцином (75%)
- Локално унапредовали карцином (5%)
- Метастатски карцином дојке (5%)
- Инфламаторни карцином дојке (Т4д) (5%)

2. Хистолошка класификација

- Дуктални карцином (80%)
- Лобуларни карцином (15%)
- Медуларни карцином (редак)
- Други

3. Генетска класификација

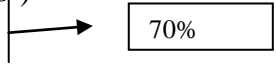
- Спорадични карцином дојке (95%)
- Херeditарни карцином дојке (5%) (укључује БРЦА1 карцином дојке, БРЦА2 карцином дојке и не БРЦА1/БРЦА2 карцином дојке).

4. Целуларна класификација/линијска

- луминално/гландуларна линија
- Миоепителна линија
- прогенитори, стем ћелије

5. Молекуларна класификација

Класификација у пет подтипова базирана на експресији гена (Пероу и сар., 2000; Сорлие и сар., 2003).

- Луминални А карцином дојке (ЕР+, ПР+, Хер2 -, ЦК8/18-)
- Луминални Б карцином дојке (ЕР+, ПР+, Хер2 +) 
- Базал лајк ћелијски карцином дојке (ЕР-,ПР-, Хер2-, ЦК5/6+)-15%
- Хер2 позитивни карцином дојке (Хер2 +, преко 30% ћелија)-15%
- Нормал лајк карцином дојке („нулти тип“; ЕР-, ПР-, Хер2-; базални маркери-)-15%

Карцином дојке се може такође класификовати на основу присутних генских алтерација, као што су амплификација 8p12, 11q13, 17q12 (Сотириоу Цх., 2003). Микроареј технике су омогућиле генетска испитивања тумора (Ху З., 2006).

Специјално врло ретки подтипови: секреторни карцином дојке показује t(12;15) са ЕТВ6-НТРК3 генском фузијом и повишеном химеричном киназом (Тогнон и сар, 2003).

6. Мешовите класификације

- инфламаторни карцином дојке садржи свих пет молекуларних подтипова (Бертуцци и сар, 2005).
- БРЦА1 карцином дојке (Фоулкес и сар, 2004; Лааксо и сар, 2005) и медуларни карцином дојке (Јаццуемиер и сар, 2005; Бертуцци и сар, 2006) су уствари базални карциноми дојке.

Задња класификација укључује претходне, удружене молекуларне алтерације и условљава селективно лечење. У раним стадијумима знања мали број типова се може макроскопски разликовати (Цхарафе-Јауффрет и сар, 2005; Симпсон и сар, 2005).

- **Луминални А**, хормон рецептор позитиван. Укључује диферентоване туморе, градус I са добром прогнозом. Маркери су хормонски рецептори, ЦК8/18. Циљно лечење: хормонотерапија. Ова група укључује и добар проценат лобуларних карцинома, који могу бити дефинисани као луминални А тумори са губитком ЦДГ1 експресије. Честа је амплификација: 11q13/ЦЦНД1. Луминални подтип се дели у три групе: луминал А, луминал Б и луминал Ц (Капп ВА, 2006).

Луминални тип карцинома корелира са лобуларним, тубуларним и крибриформним карциномом. Луминални тумори су добро диферентовани (ниског градуса), ЕР позитивни и имају бољи исход.

- Базални тумори су негативни на хормонске рецепторе. Често су пролиферативни, анеуплоидни, градус III тумори, прогноза је лоша. Укључују БРЦА1 туморе и медуларни тип. Маркери су: ЕГФР, ЦК5/6. За сада нема таргет терапије.

Базалоидни тип корелира са медуларним, аденоид цистичним и метапластичним (сквамозним) карциномом. НОС је базално/луминални. Базални тумори су слабо диферентовани, ЕР негативни, ХЕР2 негативни и имају лошију прогнозу.

- Молекуларно дефинисани, ХЕР2 позитивни тумори. Таргет лечење : трастузумаб.
- Молекуларно дефинисани, секреторни тип са ЕТВ6-НТРК3 фузијом. Идеално лечење би било анти-НТРК-киназа.

Ограничења садашње молекуларне класификације

Упркос обећавајућим резултатима постоје и ограничења у новој класификацији. Иста су због одсуства стандардизације. Испитивања са панелом од 1753 гена довела су до класификације у четири групе карцинома дојке: Луминал лајк (експресија луминалних цитокератина 8/18), базал лајк (карактеришу их цитокератини 5/17), Хер2 позитивни (већина показује Хер2 амплификацију, не сви) и нормал лајк. Листа гена је затим скраћена на 476 гена, што је названо „унутрашњи сет гена“ који су омогућили да се луминал лајк категорија подели у луминални А, луминални Б и луминални Ц тип карцинома. Затим је унутрашња генска листа скраћена на 534 гена. Највећи проблем је у карактеризацији нормал лајк групе.

Карцином дојке није једна болест већ група различитих болести. Неопходна је стандардизација методологије.

Лиу (2007) је предложио нову прогностичку групу. Ова група се објашњава могућношћу да раст тумора зависи од плурипотентних ћелија које одговарају канцерским стем ћелијама (Лиу, 2007). Ова популација ћелија је најрезистентнија на терапију. Агресивни тумори су богати у туморским стем ћелијама. Класификација

тумора базирана на генској сигнатури PАС и других дерегулисаних путева описана је у задње време (Билд АХ, 2006). Деретулација Wнт/β-катенин пута који је активан и у стем или прогениторним ћелијама и Срц пута („проинвазивни“ пут) носе лошу прогнозу.

Анализа генома код канцера дојке омогућује идентификацију генског потписа који корелира са разним аспектима тумора дојке као што је прогресија, предикција исхода и сензитивитет на терапију (Науме Б, ет ал., 2007). Ово је такође омогућило боље разумевање биологије тумора и механизма туморигенезе и одређивање боље терапије. Присуство малигних ћелија у костној сржи је независтан прогностички фактор код пацијенткиња са канцером дојке које примају адјувантну системску терапију као и код нелечених пацијенткиња. Присуство малигних ћелија у костној сржи се сматра као касни догађај у еволуцији тумора.

Канцер предиспонирајући гени су: БРЦА1, БРЦА2, TP53, АТМ или ПТЕН. Тумори дојке показују молекуларну хетерогеност. Пероу и сарадници су указали на различитост фенотипова карцинома дојке која је условљена различитом експресијом гена (Пероу,2000).

Хумани киноме чини око 1,7% свих хуманих гена и представља део гена чије алтерације учествују у онкогенези (Гуедј, 2009).

Трипле негативни тумори

Теоретски трипл негативни тумори имају бољу прогнозу него тумори који показују експресију ЕР, ПР или Хер2 јер не примају сигнале раста од стране ових протеина. Међутим то није случај. Трипл негативни тумори, подтипови карцинома дојке не реагују на таргет терапије и нема специфичног лечења за ову групу тумора. Студије су показале да су ћелије трипл негативних тумора много агресивније него ћелије других подтипова али је разлог за сада непознат. Ова група се тешко лечи.

Карактеристике ћелија трипл негативних тумора

Нуклеарни градус: тумори су високог градуса што указује на тешке промене.

Митотски индекс: висок митотски индекс указује на брз раст.

Стање диферентованости: канцерске ћелије су слабо диферентоване што указује да немају функције нормалних ћелија дојке.

Карактеристике трипл негативних тумора дојке

Старост у време дијагностиковања: трипл негативни тумори се јављају код млађих пацијенткиња у односу на друге типове тумора (просечно 53 године версус 57).

Величина тумора: трипл негативни тумори су већи него други типови (3 цм вс 2,1).

Градус тумора: већина их је градус III него други типови (66% вс 28%).

Регионалне метастазе (Лн): лимфни чворови у близини тумора су чешће позитивни него код других типова (54,6 вс 45,6%).

Инфламаторни карцином дојке чини мање од 10% свих карцинома дојке (Хамида БА, 2008). Тумор се карактерише емболусима у дермалним лимфатицима и високим метастатским потенцијалом.

Варијације у транскрипционим програмима су основ за различитост хуманих ћелија и тумора (Ливасу Ц, 2006).

Миоепителне ћелије типично показују присуство цитокератина 5/6 и цитокератина 17 док луминалне ћелије су позитивне на цитокератине 8 и 18. Миоепителни маркери су и СМА, п63 и ЦД10 али није јасна дистрибуција у базал лајк карциномима.

Код тумора се анализирају хистолошки тип, присуство географске некрозе, број апоптотичних ћелија, изглед границе тумора, лимфоцитни инфилтрат у строми, једарца, изглед нуклеарног хроматина, апокрини знаци, метапластични знаци, централна ацелуларна зона и медуларни знаци (Ливасу АЦ, 2006).

Жлезде и дуктуси дојке се састоје од три типа ћелија: луминалне, базалне и миоепителијалне. Луминалне и базалне ћелије показују различите цитокератине. Миоепителне ћелије показују базални тип цитокератина а позитивне су и на глатко мишићни актин, калпонин и п63 (Тиен Уех И, 2007). Е кадхерин је маркер избора за разликовање дуктусног од лобуларног карцинома. Високо молекуларни кератини су чешће присутни у лобуларном карциному него дуктусном. Цитокератин 8 је позитиван на периферији ћелије код дуктусног карцинома а перинуклеарно код лобуларног (Тиен Уех И, 2007).

Мале групе туморских ћелија називају се изоловане туморске ћелије и дефинишу се као појединачне туморске ћелије или групице не веће од 0,2 мм обично

детектоване имунохистохемијским или молекуларним методама. Међутим не зна се степен преживљавања изолованих туморских ћелија. АЈЦЦ је за овај налаз препоручио да се стадира као (НО)(и+).

Опште прихваћено мишљење је да је прогресија тумора линеарна од нормалне ћелије па до метастатског тумора и да је то праћено прогресивном акумулацијом генетских, епигенетских алтерација и алтерација микросредине. Туморигенеза је еволуциони процес (Полуак К, 2008). У тумору једне прогностичке групе постоје различити подтипови (Полуак К, 2008). Ову хетерогеност подгрупа вероватно условљавају канцерске стем ћелије и клонална еволуција. Стем ћелије дају различите прогениторе туморских ћелија док клонални модел хетерогеност објашњава геномском нестабилношћу што резултира у континуираном задобијању нових соматских промена. Поставља се питање клиничког значења интратуморске различитости.

Стероидни рецептори

Ендокрина терапија тумора дојке је врло ефикасна ако исти показују присуство стероидних рецептора. Све ендокрине терапије су конципиране тако да блокирају функцију ЕР. Селективни ЕР модулатори (СЕРМс) као што је тамохифен вежу се за ЕР и парцијално блокирају његову активност. Аблација оваријума, агонисти лутеинизирајућих хормона и инхибитори ароматазе редукују нивое естрогена и инхибишу лиганд индукујућу активацију ЕР. Стероидни антиестрогени као што фулвестрант вежу ЕР, блокирају његову функцију и индукују деградацију рецептора.

Постоје три естроген рецептора који су продукти различитих гена, ЕР алфа, ЕР бета и ЕР гама. Ови рецептори припадају суперфамилији нуклеарних хормонских рецептора у које спадају рецептори за друге стероидне хормоне, тироидни хормон, витамин Д и рецептор за ретиноичну киселину. Класично, функција рецепторских протеина је да су они транскрипциони фактори у једру где се вежу за одговарајуће лиганде. ЕР алфа и ЕР бета имају сличну мада не и идентичну структуру. ЕР α има ДНА везујући домен, димеризациони домен, хормон везујући домен и неколико транскрипционих активирајућих домена. Везивање хормона са ЕР алфа активира протеине фосфорилацијом, дисоцира шаперонин протеине као што су хит шок протеин 90 и мења им конформацију. Више киназа може да активира ЕР и корегулаторне протеине, процес који се назива лиганд независна активација. Везивање хормона (активација) за ЕР доводи до димеризације са другим рецептором, а затим се димер

веже за естроген одговорне елементе (специфичне ДНА секвенце) који су присутни у промотеру естроген одговорних гена. Промотер се веже за ЕР димере и формира комплекс са корегулаторним протеинима као што је СРЦ3 који утиче на транскрипцију естроген одговорних гена. Транскрипција неких гена је повећана естрогеном а других је смањена. Бројни гени који су регулисани естрогеном су важни за пролиферацију, инхибицију апоптозе, стимулацију инвазије и метастазирање и промоцију ангиогенезе. Мање је познато шта ради ЕР бета и он има функције које се разликују од ЕР алфа и изгледа да супротно делује на раст тумора. Високе вредности ЕР бета инхибишу раст тумора када су рецептори везани за тамоксифен. Клиничке студије су указале да ЕР алфа позитивни тумори са ниским вредностима ЕР бета теже да буду тамоксифен резистентни (Осборне КЦ, 2005).

Корегулаторни протеини вежу се за ЕР на промотер таргет генима и они су исто важни као сами рецептори у посредовању транскрипционе активности. Неки од ових протеина појачавају транскрипциону активност а неки је инхибишу.

Суперфамилија нуклеарних рецептора

У овој суперфамилији постоје постоје четири класе према интеракцијама са хит шок протеинима, и њиховој тенденцији да формирају хомодимере или хетеродимере и специфичност везивања за ДНА.

Класу I рецептора чине стероидни рецептори са дужим А/Б доменима (естрогени-ЕР, глукокортикоиди-ГР, минералокортикоиди-МР, прогестини-ПР, андрогени-АР). После димеризације рецептори се вежу за таргет хормон респонсивне елементе у промотер регији таргет гена и модулирају степен транскрипције. У одсуству лиганда рецептор се креће између нуклеуса и цитоплазме.

Класа II рецептора (тироидни хормон-ТР, дихидроксивитамин Д3-ВДР, све-трансретиноичне киселине, 9-цис ретиноична киселина и већина орфан рецептора.). Они имају кратак А/Б домен и не удружују се са хит шок протеинима. Чврсто се вежу за ДНА елементе.

Класа III рецептора: стероидогени фактор (СФ-1).

Класа IV рецептора: ту спадају орфан рецептор-хепатоцитни нуклеарни фактор 4 (ХНФ-4) показују карактеристике класе I и класе II рецептора и вежу се за ДНА искључиво као мономери.

Нуклеарни рецептори

Нуклеарни рецептори играју важну улогу у развоју, диференцијацији и репродукцији еукариотичних ћелија као и у метаболичкој хомеостази. Протеини фамилије нуклеарних рецептора су појединачни полипептидни ланци са три велика домена (сегмента): варирајући аминотерминални домен, јако конзервирани ДНА везујући домен и мање конзервирани лиганд везујући домен. Суперфамилија нуклеарних рецептора се дели у три класе:

Класа I је фамилија стероидних рецептора и укључује прогестеронске рецепторе (ПР), естрогенске рецепторе (ЕР), глукокортикоидне рецепторе (ГР), андроген рецепторе (АР) и минерало кортикоидне рецепторе.

Класа II или тироид/ретиноид фамилија укључује тироидни рецептор (ТР), витамин Д рецептор (ВДР), рецептор ретиноичне киселине и пероксизом пролифератор активирани рецептор (ППАР).

Класа III нуклеарних рецептора је позната под именом орфан(сироче) рецептор фамилија. Ова класа нуклеарних рецептора подразумева протеин који има хомологију секвенци које су познате као нуклеарни рецептори али за које лиганд још није идентификован. Орфан нуклеарни рецептори има систем за откривање нових сигналних путева.

Нуклеарни рецептори модулирају генску транскрипцију. Лиганди за нуклеарне рецепторе циркулишу у телу и везују се за плазма протеине. Након дисоцијације од плазма протеина лиганди улазе у ћелије и вежу се за рецепторе. Стероиди и витамин Д највероватније у ћелије улазе пасивном дифузијом док тироидни хормони и ретиноична киселина улазе у ћелије преко специфичних транспортних механизма.

Након уласка у ћелију рецептори се транслоцирају у нуклеус и вежу за промотивна места.

Фамилија нуклеарних рецептора се састоји од око 50 структурално сличних лиганд активирајућих транскрипционих фактора од којих многи играју кључну улогу у регулацији развоја нормалних ткива и туморигенези. Међу њима су најважнији стероидни хормони који играју кључну улогу у развоју репродуктивних органа и у иницијацији и прогресији карцинома дојке (рецептори за естроген и прогестерон), карцинома простате (рецептори за андроген). Растући број нестероидних нуклеарних рецептора такође учествује у регулацији пролиферације ћелија, апоптози, регулисању

ћелијског циклуса и настанку разних канцера укључујући и леукемије, канцер колона и туморе костију.

Суперфамилија нуклеарних рецептора се дели у 6 субфамилија и 26 група рецептора. Нуклеарни хормонски рецептори су важни транскрипциони регулатори који учествују у разним функцијама као што су контрола хомеостазе, диференцијација ћелија, ембрионални развој. Неки нуклеарни рецептори делују као лиганд индуковани транскрипциони фактори док за друге није познат лиганд и зато се називају „орфан“ рецептори.

Субфамилија 1 садржи 11 група рецептора

Субфамилија 2 садржи 6 група рецептора

Субфамилија 3 садржи 3 групе рецептора

Субфамилија 4 садржи једну групу рецептора

Субфамилија 5 садржи две групе

Субфамилија 6 садржи једну групу рецептора

Субфамилија 0: то су нуклеарни рецептори који су изгубили конзервирани домен

Естрогени рецептори

Нуклеарну рецептор суперфамилију чине лиганд регулисани рецептори и велика група рецептора за коју нису потребни лиганди, а то су орфан рецептори. Функције лиганд регулисаних рецептора су добро познате и они играју улогу у развоју и хомеостазе адолтних организама. Насупрот биолошке функције орфан рецептора су мање јасне и сазнања су у зачетку. Орфан нуклеарни рецептори се могу поделити у четири групе на основу реакције са ДНА.

Група 1 рецептори захтевају хетеродимеризацију са ретиноид X рецептором. Рецептори групе 2 вежу ДНА као хомодимери. Група 3 рецептора веже се као мономери. Група 4 рецептора су они рецептори који имају необичну структуру где се губи ДНА везујући домен или лиганд везујући домен.

ЕР-естроген сигнални систем игра кључну улогу у развоју нормалних функција женског репродуктивног тракта, секундарних сексуалних карактеристика и репродуктивног понашања (Роллерова Е,2000). Естроген-ЕР систем учествује у функционисању ЦНС-а, скелетног и кардиоваскуларног система и штити постменопаузне жене од остеопорозе, коронарне болести и Алцхајмерове болести. С 'друге стране естрадиол и ЕР играју улогу у развоју раста разних тумора, најчешће

карцинома дојке. Постоје два основна типа естрогена: естроген рецептор алфа и естроген рецептор бета. Хумани ЕР је лоциран на хромозому 6q субјединица 25.1. Молекуларни механизми деловања естрогена су релативно јасни. Неколико таргет гена са консензусом ЕРЕ (примарно одговорни гени) су такође познати: прогестерон рецептор, пролактин, лактоферин, овалалбумин, вителогенин, катхепсин Д1, пС2. Постоји више гена који су активирани естрогеном без стварања ЕРЕ: епидермални фактор раста, РГФ рецептор, циклин Д1, БРЦА1 и други који се називају секундарни Е2 одговорни гени.

ЕР алфа

ЕР алфа је присутан у женским полним органима као што су оваријуми, утерус, вагина, дојка и неки делови централног нервног система као што је хипоталамус.

ЕР је солубилни термолабилни протеин кога лако разарају протеазе. Молекуларна тежина ЕР је 66 кДа. Естрогени рецептори подлежу процесу нуклеоцитоплазматског преливања са нуклеарном локализацијом у одсуству лиганда. Две форме ЕР у нуклеусној фракцији су изоловане. Два специфична места везивања естрогена у једру су идентификована у нормалним и малигним ткивима. Тип I место представља класични ЕР са високим афинитетом за естрадиол у релативно малим количинама, док тип II место је присутно у већим количинама и има редуковани афинитет за естрадиол (Ролленова Е, 2000). Оптимално везивање Е2 за тип I је при pH 7,4 а за тип II pH 7,8-8,2.

ЕР показују 6 функционалних домена: А/Б, Ц, Д, Е и Ф који показују четири важне функције: везивање за лиганд, димеризација, ДНА везивање и активација транскрипције. Н-терминал А/Б домена варира по дужини, садржи трансактивациону функцију АФ-1 која активира таргет гене.

Хидрофилни Ц домен са ДНА везујућим доменом је најконзервиранији регион. Д регион дозвољава рецептор протеину да мења конформацију. Релативно велики Ц терминал домен садржи лиганд везујући домен који одредјује лиганд везујућу специфичност.

EP бета

EP бета је лоциран на хуманом хромозому 14. Он је јако хомологан са EP алфа. Ткивна дистрибуција EP алфа и EP бета је различита код пацова и хумане популације. Имунолокализација EP бета у једрима хуманих ткива показује убиквитарно присуство у ЦНС-у, кардиоваскуларном и имуном систему, урогениталном тракту, гастроинтестиналном тракту, бубрезима и плућима и то указује да има главну функцију у посредовању естрогене функције. Новији подаци указују да има важну улогу у функционисању оваријума, развоју тестиса и сперматогенези. У остеобластима је присутна висока експресија у току остеобластичне диференцијације што указује на значајну улогу “коштаног EP“ у процесу остеопорозе. EP бета смањује општу целуларну сензитивност на E2 као модулятора EP алфа медијирајућег гена. Разлика у ткивној дистрибуцији је врло важна са фармаколошког гледишта због субституционе хормонске терапије. EP бета је указао на могућност постојања других типова рецептора за естроген.

EP гама

Године 1998 изолован је и прочишћен естроген рецептор гама из јетре миша (Рао 1998). Он се много не разликује од EP алфа и EP бета. Овај рецептор је присутан у разним феталним и адултним ткивима укључујући плаценту, мозак, бубреге, панкреас као ткивно специфичне изоформе протеина. Активација EP гама је одговорна за резистенцију на тамохифен. У току лечења тамохифеном малигне ћелије дојке губе EP алфа а задобијају EP гама.

Рецептори се могу везати за ДНА као мономери и активирају транскрипцију. EP гама има 77% секвенци као EP бета. Он је присутан у адултним ткивима укључујући мозак, скелетне мишиће, срце, бубреге и ретину. Овај рецептор је такође присутан у феталним ткивима укључујући плаценту, мозак, срце, скелетне мишиће, бубреге и плућа. Ови налази указују на могућу улогу EP гама у диференцијацији и одржавању ових ткива.

Естроген је важан за патогенезу карцинома дојке јер стимулише пролиферацију епитела преко рецептора за естроген. Повећање броја EP+ ћелија са годинама старости је праћено снижењем концентрације естрогена у плазми.

ER је састављен од 6 региона. Централни Ц регион кодира за ДНА везујући домен и он је окружен са два независна домена (АФ-1 и АФ-2). АФ-1 и АФ-2 имају различите активности. Други члан фамилије естроген рецептора је естроген рецептор бета. ER бета је лоциран на 14q22-24 док је ER алфа на хромозому 6q25.1 Мада су продукти независних гена, они деле извесну хомологију ДНА и везујући домен. Оба рецепторска подтипа вежу естрогене са сличним афинитетом. Дистрибуција ER алфа и бета у ткивима је различита. Постоје и разлике у везујућој способности ова два рецептора. То указује на различиту акцију ER агониста и антагониста у разним ткивима.

Естрогени су неопходни за развој и сазревање дојке. Имунохистохемијским методама је доказано у ткиву дојке код пременопаузних жена да мање од 20% луминалних ћелија показује ER алфа. Разним техникама је доказано да имунопозитивне ћелије на ER алфа ретко подлежу пролиферацији. Пролиферација ER алфа негативних ћелија је под контролом паракриних фактора које ослобађају ER алфа позитивне ћелије (Дунвалд КЛ, 2007). Открићем ER бета ћелија отворена је могућност да ћелије које су сматране ER алфа негативне могу бити ER бета позитивне.

- ER алфа је ограничен на једра епителних ћелија које облажу дуктусе и лобулусе
- ER бета је такође присутан у овим ћелијама али се доказује и у једрима миоепителних ћелија и понекад у околним стромалним ћелијама, једрима ендотелних ћелија и лимфоцитима.
- Према томе подтипови ER имају различиту дистрибуцију у нормалној дојци
- Широка дистрибуција ER бета сугерише да они су доминантни ER у дојци где могу деловати као активни супресор.

Естроген стимулише пролиферацију ћелија које показују експресију ER. Естроген слободно дифундује кроз ћелијску мембрану и веже се за ER, доводи до димеризације ER и чврсто се веже за ДНА, естроген респонсиве елеменат (ере). Након везивања за естроген респонсиве елеменат (ERE) активира се транскрипција нове мРНА. Неки естрогеном индуковани протеини, као ПсР, важни су за специфичне метаболичке процесе у ћелији, док су други одговорни за пролиферацију ћелија. Када се за рецепторе вежу антиестрогени као тамохифен, онда се блокирају гени за транскрипцију раста, док други гени могу бити и активирани.

И ER и ПсР су нуклеарни протеини који се могу мерити у интактним ћелијама или екстрактима туморских ћелија. Имунохистохемијске технике указују на хетерогеност туморских ћелија у експресији ER.

Рецептори за естроген (ER) се детектују у 60-80% тумора дојке. Они су важни у патогенези карцинома дојке стимулишући пролиферацију епитела преко ER. Они су удружени са већином епидемиолошких фактора ризика као што су менарха, прва комплетна трудноћа, и менопауза и са употребом оралних контрацептивних средстава а као и субституционом хормонотерапијом. Постоји негативна удруженост између експресије ER и пролиферационог маркера Ки-67, што указује да ER + ћелије се не деле а да се ER супримира када ћелија уђе у деобни циклус. Због тога се у канцерским ћелијама откривају ER позитивне ћелије које се деле. Тако се губи негативна удруженост ER+/Ки-67 + ћелија. Високе концентрације естрогена у серуму као код пременопаузних и лактирајућих жена су удружене са ниским бројем ER+ ћелија док ниске концентрације естрогена као код постменопаузних жена и код мушкараца су удружене са већим бројем ER+ ћелија. Концентрација ER варира од тумора до тумора. Веће вредности ER се виде код постменопаузних пацијенткиња. Садржај ER се разликује између примарног тумора и метастатских депозита, нарочито висцералних метастаза. Ово указује на већу способност ER негативних тумора да метастазирају у висцера. ER позитивност такође корелира са хистолошким степеном диференцијације, ниским нуклеарним градусом, са диплоидним ДНА садржајем, са ниским пролиферативним индикаторима (Ки-67). ER хиперекспресија инверзно корелира са ХЕ-ом и ЕГФР експресијом. Све ово указује на прогностичко значење ER статуса.

Процент ER алфа позитивних ћелија се повећава са годинама старости, док је проценат ER бета позитивних ћелија исти код пре и постменопаузних жена. У нормалном ткиву дојке рецептори за естроген и антигени који прате пролиферацију (Ки-67) су негативно удружени. Тако ER+ ћелије се не деле. Овај однос се губи у многим ER+ туморима дојке па се често налази и коекспресија ова два маркера. У фиброаденомима и филодним туморима је повећан број ER + ћелија. Процент ER + ћелија се повећава са годинама старости у свим лезијама са изузетком у фиброаденомима.

ЕР/ПР скоринг систем и критеријуми

Скоринг систем

0	Негативни рецептори
1+	Бордерлине – корелација са ДЦЦ* метод варира
2+ то 3+	Позитивни рецептори

Критеријуми

0	0% нуклеарно бојење
1+	<10% нуклеарно бојење
2+	10% до 75% нуклеарно бојење
3+	>75% нуклеарно бојење

На основу одређивања стероидних рецептора карциноми дојке се класификују у четири групе на основу имунохистохемијског профила ЕР/ПР . Те групе су:

- ЕР/ПР+, Хер2+ = ЕР+/ПР+, Хер2+; ЕР-/ПР+, Хер2+; ЕР+/ПР-, Хер2+
- ЕР/ПР+, Хер2- = ЕР+/ПР+, Хер2-; ЕР-/ПР+, Хер2-; ЕР+/ПР-, Хер2-
- ЕР/ПР-, Хер2+ = ЕР-/ПР-, Хер2+
- ЕР/ПР-, Хер2- = ЕР-/ПР-, Хер2-

Хер рецептори

Постоје четири класе ЕГФР: Хер1, Хер2, Хер3 и Хер 4. Ови рецептори регулишу раст и диференцијацију ћелија и преживљавање. Амплификација Хер2 гена се јавља у 20-25% карцинома дојке. Она је удружена са резистенцијом на терапију, високим степеном рецидивирања, већом инциденцом метастаза у мозгу и слабо диферентованим високо градусним туморима (Толанеу С., 2008). Трастузумаб или Херцептин је рекомбинантно, хуманизирано, моноклонско антитело које напада екстрацелуларни домен Хер2 и представља револуционарни начин лечења Хер позитивних тумора. Овај лек је побољшао дужину периода без болести и опште

преживљавање након примене овог лека. Високе вредности ц-ЕрбБ2 су удружене са негативним налазом ЕР и ПР (Ферреро Поус М., 2000) и високим вредностима п53.

Лапатиниб је орална, мала молекула која је инхибитор тирозин киназе у ЕГФР и ХЕР2 сигналним путевима. Комбинована терапија лапатиниб-а са капецитабине-ом код пацијената са ХЕР2+ туморима показује побољшање.

Међутим, нажалост не реагују сви пацијенти који су Хер2+ на Херцептин или лапатиниб. Постоје неки маркери који би могли предвидети одговор пацијента на таргет терапију. ПТЕН је важан тумор супресивни ген који супримира ефекат фосфоинозитид 3 киназе (ПИЗК) негативном регулацијом АКТ активности. Око 50% пацијенткиња са карциномом дојке има мутације или губитак једне копије ПТЕН гена. Код карцинома који показују експресију ПТЕН-а долази до клиничке резистенције на трастузумаб.

Хер 2 статус се одређује следећим методама:

- Имунохистохемијски
- ФИШ (флуоресцентна ин-ситу хибридизација)
- ЦИШ (хромогена ин-ситу хибридизација)
- Полимеразе чејн реакција
- Друге методе

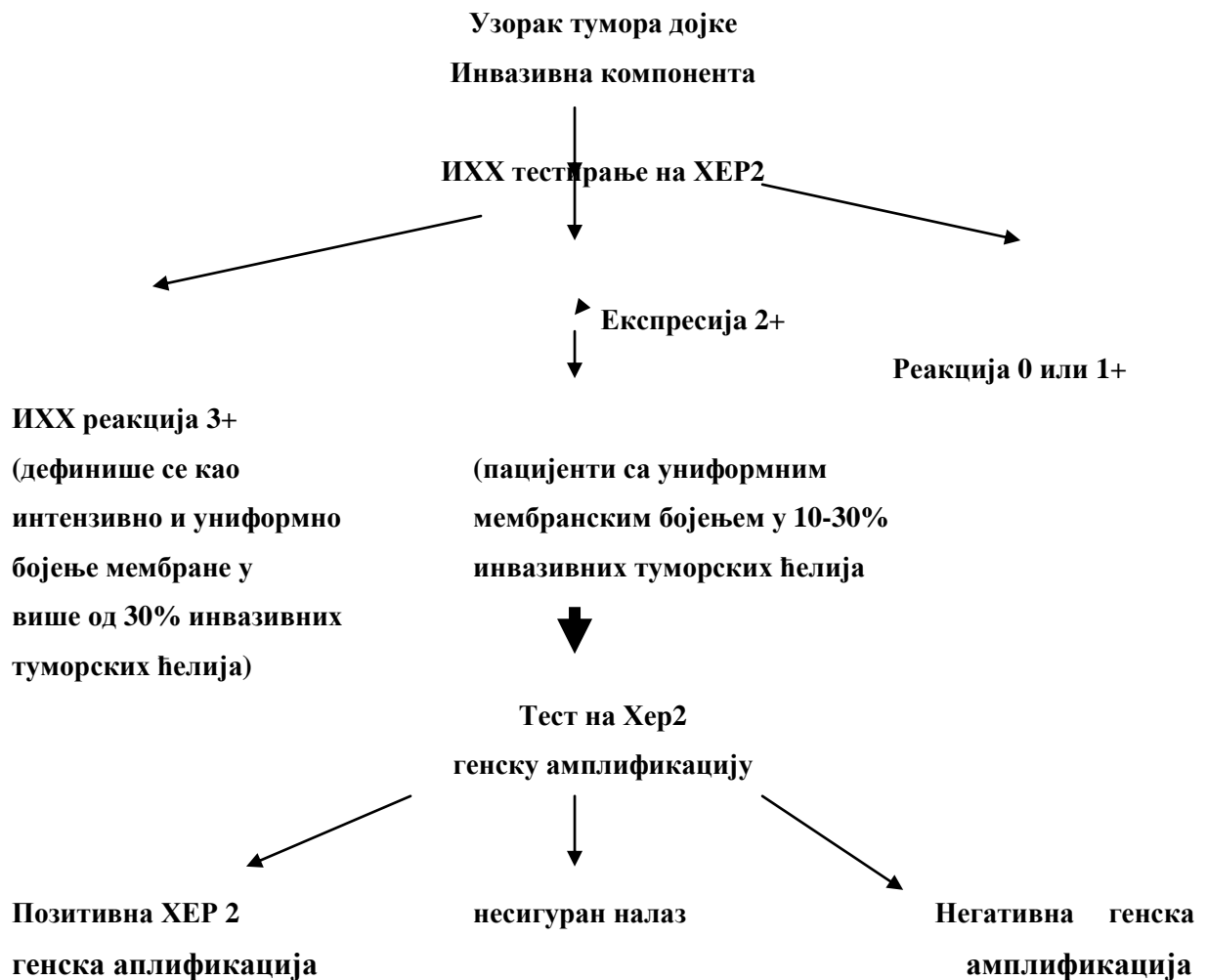
Хер2 скоринг систем и критеријуми

Скоринг систем

- 0 Негативан: нема мембранског бојења или је исто у мање од 10% туморских ћелија
- 1+ Негативан: слабо мембранско или парцијално бојење у мање од 10% ћелија
- 2+ Слабо позитиван: Слабо бојење. Слабо до умерено комплетно мембранско бојење у више од 10% туморских ћелија
- 3+ Позитиван: позитивно, интензивно мембранско бојење у више од 10% туморских ћелија

Хер2 = хумани епидермални фактор раста рецептор 2

Шема 2. Алгоритам ИХХ реакције за ХЕР2



Пролиферативни целуларни нуклеарни антиген (ПЦНА)

Пролиферативни целуларни нуклеарни антиген (ПЦНА) је помоћни протеин ДНА полимеразе делта и налази се у једру. Ниво ПЦНА у мирујућим ћелијама је врло низак, али се стварање овог протеина јавља пре ДНА репликације. Овај протеин је присутан у Г1, С и Г2 фази ћелијског циклуса и зато је сензитиван индекс пролиферације. ПЦНА је познат и као циклин и то је нехистонски нуклеарни протеин (молекуларне тежине око 36 000) чији ниво или количина синтезе директно корелира са целуларном пролиферацијом и ДНА синтезом. Експресија ПЦНА је у непосредној вези са ћелијским циклусом. Игра улогу у регулацији ДНА синтезе и ћелијске

пролиферације. Нема бојења у мирујућим ћелијама као што су хепатоцити, реналне тубуларне ћелије и гломеруларне ћелије. ПЦНА се не детектује у периферним лимфоцитима али се види у бластној трансформацији индукованог митогенима. Данас постоји 11 типова моноклонских антитела на ПЦНА који препознају различите антигеничне форме ПЦНА и различите компоненте.

Ниво ПЦНА се повећава 2-3 пута између Г1 и ране С фазе а плато достиже у Г2 фази. ПЦНА ниво нагло расте у средини Г1 фазе, остаје повишен кроз С фазу и почиње да се смањује од Г2/М до Г1 фазе.

За време ћелијског циклуса се разликују две популације ПЦНА. Једна популација је нуклеоплазмична и одговара ПЦНА који је присутан у малим количинама, као што се види у мирујућим ћелијама које су способне да се деле. Овај облик је солубилан, лако се екстрахује детерџентима и не детектује се у фиксираним ћелијама. Други облик ПЦНА је несолубилан и удружен је са специјалним нуклеарним структурама које су у вези са ДНА репликацијом и игра важну улогу у синтези ДНА код еукариотичних ћелија. Овај облик се не екстрахује органским растварачима и може се доказати у фиксираним ћелијама као грануларно нуклеарно бојење. Описано је више нуклеарних протеина који су експримирани у пролиферишућим или трансформисаним ћелијама а одсутни су у мирујућим ћелијама. Ту спадају ПЦНА/циклин, Ки-67, p53 трансформацион релатед протеин и продукти муц-онкогена. ПЦНА је користан у евалуацији процента пролиферишућих ћелија у малигним лезијама. Просечан број ПЦНА позитивних ћелија је већи од просечног броја Ки-67 позитивних ћелија. Полуживот ПЦНА је 20 сати.

ПЦНА експресија је регулисана на транскрипционом и посттранскрипционом нивоу и зависи од РНА стабилности. Процент туморских ћелија преко 25% указује на могућност појаве удаљених метастаза. ПЦНА и Ки-67 су корисни за евалуацију стромалне пролиферације код филодних тумора (Барвијук-Мацхата М, 2004).

Процент ПЦНА позитивних ћелија је много већи код карцинома него код фиброаденома, што указује да карциноми имају много већи пролиферативни индекс од фиброаденома

П53

П53 ген је лоциран на кратком краку хромозома 17. Он интерферише развој карцинома (Ванг Ј, 2005). Он кодира нуклеарни протеин (p53) који се у нормалним

ткивима налази у малој количини. То је тумор супресорни ген, и његове мутације су честе у спорадичним туморима дојке и налазе се у 15-50% инвазивних карцинома. Код карцинома дојке хиперекспресија p53 протеина у једру је индикатор лоше прогнозе. Описују се два хомолога p53, p73 и p63. Они имају различите функционалне активности. p53 је негативан у свим фиброаденомима.

p53 супримира ћелијски раст контролом уласка у С фазу ћелијског циклуса. Мутације или делеције p53 гена резултирају у неконтролисаном пролиферацији ћелија. Већина p53 мутација резултира у стабилизацији протеина. Тако насупрот кратком полуживоту дивљег типа p53, мутантни облик показује дужи полуживот и може се доказати имунохистохемијским техникама. Мутације p53 гена се окривљују за појаву великог броја тумора. p53 показује исту мутациону учесталост као ПТЕН (Хлобилкова А, 2003).

Ки-67

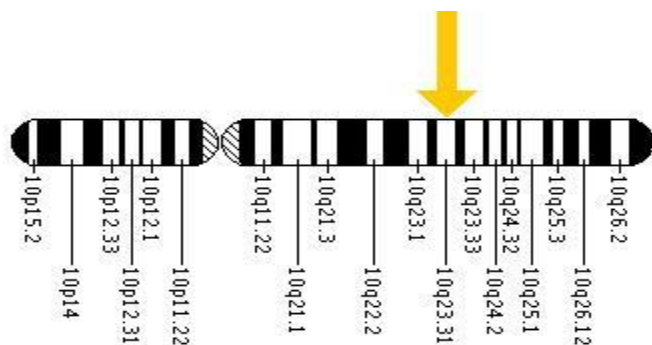
Постоји корелација између Ки-67 експресије и малигнитета. Ки-67 је антиген који је у вези са пролиферацијом и испољава се у касној G1, S, G2 и M фази ћелијског циклуса. Ки-67 има прогностички значај.

Већина аутора је закључила да експресија p53 и Ки-67 корелира са морфолошким градусима (Цхан YJ, 2004)

ПТЕН

Хомолог фосфатазе и тензина (мутиран у узрапредовалим канцерима) или ПТЕН, лоциран је на 10q23.3 (шема 3) и кодира дуално специфичну фосфатазу која има липидну и протеин фосфатазну активност. ПТЕН класично конвертује фосфатидил-3,4,5, трифосфат (ПИП3) у цитоплазми у ПИП2 који директно антагонизује ПИ3 киназу (ПИ3К). Његова инактивација резултира у конститутивној активацији ПИ3К/АКТ пута што пак резултира у појачаној синтези протеина, прогресији ћелијског циклуса, миграцији и преживљавању. Мада се у ПТЕН гену дешавају бројне мутације, оне су присутне у малом броју тумора, што указује на алтернативне механизме, како генетске тако и негенетске инактивације ПТЕН-а. Један такав механизам је регулација субцелуларне локализације .

Шема 3. Локализација ПТЕН у хромозому 10q23.3



Генске алтерације које су захватиле ПТЕН (фосфатазе и тенсин хомолог-хромозом 10) или ММАЦ1 (мутатед ин мултипле адвансед канцер-1/ТЕП) супресорни ген су најчешће соматске мутације у хуманим канцерима (Сансал И,2004). Ове промене су описане у карциномима простате, ендометријума и у глиобластома мултиформе. Герминативне мутације у ПТЕН гену доводе до развоја херeditарних синдрома са предиспозицијом за канцерске као што су Ковден-ова болест и Бантуан-Зонана синдрома у којима је учесталост карцинома дојке и тироидеје повећана. Код Ковден синдрома се развијају хамартоми у фоликулима длака (Трихилемома), мукокутанним мембранама, дојци, тироидеји и интестиналном тракту. Око 25-50% пацијената са Ковденовом болешћу развија карцином дојке (Варролл Б, 1999). У Бантуан-Рилеу-Рувалкаба синдрому се јавља микроцефалија, липоматоза, хемангиоматоза и пегав пенис. Код њега је повећан ризик за развој карцинома дојке и тироидне жлезде, ендометријума и генитоуринарног тракта. ПТЕН је способан да индукује апоптозу или застој ћелијског циклуса а губитак ПТЕН-а у примарним ћелијама доводи до ексцесивне пролиферације или дефекта апоптозе и супримира миграцију разних ћелија укључујући и хумане фибробласте (Гил.А,2006). ПТЕН је способан да ауторегулише своју експресију кроз стабилизацију p53. ПТЕН појачава p53 транскрипцију. ПТЕН штити p53 од деградације, док p53 појачава транскрипцију ПТЕН-а. То је најчешће инактивирани или мутирани ген у хуманим канцерима. ПТЕН је откривен 1997 године као тумор супресорни ген који је лоциран на 10q23 и има централну улогу у

супримирању тумора. Пацијенти са ПТЕН дефицитним карциномом дојке имају знатно лошији одговор на терапију Херцептином него пацијенти са нормалним ПТЕН-ом (Нагата У, 2004). ПТЕН се губи у карциногенези дојке (Петроцели Т, 2001, Уеда К, 2005). Дерегулација функције ПТЕН-а учествује и у другим хуманим болестима поред карцинома, као у дијабетесу и аутизму. ПТЕН такође учествује у одржавању стем ћелија и стратификацији тумора који ће реаговати на таргет терапије (Тамагунуе Т, 2007). ПТЕН између осталог регулише и процес апоптозе (Дупонт Ј, 2002). ПТЕН модулира тумор-промовишући сигнални пут унутар канцерских ћелија, назван ПИЗ киназа. Такође ПТЕН напада Акт- зависне сигнале преживљавања, тако да у одсуству активног ПТЕН-а туморске ћелије измичу апоптози. (Гори.С, 2009). ПТЕН делује као сигнална трансдукциона молекула која повезује цитоскелет са интрацелуларним сигналним трансдукционим путем (Хлобилкова А, 2003).

Протеински продукт ПТЕН-а је липидна фосфатаза, која служи да одстрани фосфатну групу из интрацелуларне фосфоинозитид сигналне молекуле. Ова активност контролише раст и сигнале преживљавања преко ограничавања активности фосфоинозитид-3 киназе (ПИЗК) пута (Миагусцхи Т, 2006). Ова функција је критична способност ПТЕН-а да одржава ћелијску хомеостазу. ПТЕН супресија изазива застој у Г1 фази (Евнг ПЛ, 1999). Због тога одсуство функционалног ПТЕН-а у канцерским ћелијама доводи до конститутивне активације смањујуће активације ПИЗК пута. Промене у овом гену су сличне као код p53 по учесталости. ПТЕН је локализован предоминантно у цитоплазми, међутим може бити локализован и у једру где регулише ниво протеина p53 и транскрипциону активност (Цханг ЈЦ, 2008). Инактивирајуће мутације или делеције ПТЕН гена резултирају у хиперактивацији ПИЗ/Акт сигналног пута и знак је лоше прогнозе и резистенције на хемотерапију и хормонотерапију. Фармаколошка инхибиција овог пута резултира у инхибицији раста тумора (де Графенриед АЛ, 2004). Бројни механизми могу инактивирати ПТЕН у туморима дојке и туморима тироидеје (Гимм.О, 2000; Перрен А.,1999). Ова инактивација може настати преко делеција и мутација (Муттер ЛГ,2001). Герминативне мутације се виде у Ковден-овој болести. Око 25-50% ових пацијената у току живота добија карцином дојке (Царролл ТБ, 1999). ПТЕН и Хер2 учествују у биохемијском путу који медијира самообнављање стем ћелија (Царролл ТБ,1999). Дерегулација било ПТЕН-а било Хер2 повећава популацију стем ћелија са карактеристикама самообнављања.

Герминативне мутације чине мали проценат алтерација у тумор супресорним генима које доводе до појаве тумора (Лунцх ДЕ, 1979). Соматске мутације у

спорадичним нефамилијарним туморима су чешће. Соматске мутације су биалеличне мутације и често су присутне у глиобласту, меланому, карциномима простате и ендометријума. Молекуларна дијагноза се може поставити и са сетом од 47 гена (Цханрион М, 2007).

Биалелна инактивација ПТЕН-а јавља се у 30-40% глиобластома мултиформе а нешто ређе код анапластичног астроцитома. Тумори који имају било коју ПТЕН алтерацију су удружени са скраћеним средњим преживљавањем. Хер2 хиперекспресија је добар прогностички индикатор код Н+ пацијенткиња. Хер2 позитивни карциноми представљају посебну групу тумора дојке са посебним клиничким и патолошким понашањем (Менард С, 2002). Ниске вредности ПТЕН-а корелирају са нереаговањем на лечење трастузумаб-ом (Пандолфи ПП, 2004). Одређивање ПТЕН статуса је важно јер ПТЕН дефицит представља снажан предиктор за трастузумаб одговор. Губитак ПТЕН-а служи као предиктор резистенције на трастузумаб терапију.

Код карцинома ендометријума ПТЕН мутације су присутне у око 50% случајева, а овај проценат иде и на 80-90% случајева. Ове мутације се виде и код прекурсора као што су хиперплазија ендометријума, атипична хиперплазија што сугерише да је најранији догађај губитак ПТЕН-а. ПТЕН мутације се такође налазе код тумора бешике, плућа, оваријума, колоне и лимфног система.

ПТЕН ген кодира за протеин фосфатазу, који је ензим који убрзава одстрањивање фосфатних група из макромолекула (дефосфорилација). ПТЕН дефосфорилише протеине а главна његова мета су липиди плазма мембране. Ови липиди, фосфатидилинозитол-3-4-5 трифосфат (ПИП3) и фосфатидил-3-4-бисфосфат се стварају у току ћелијских сигналних догађаја деловањем липидне киназе фосфоинозитид-3-киназе (ПИЗК).

Фосфоинозитид 3-киназа /Акт пут

Сигнализирање преко ПИЗК пута почине примањем сигнала за раст и преживљавање који делује на унутрашњу ћелијску средину преко рецептор тирозин киназе поштеђујући плазма мембрану. Акт регулише критичне ћелијске функције као што су пролиферација, апоптоза, глукозна хомеостаза, величина ћелије, одговор на нутрицију и ДНА оштећење.

Целуларни тумор супресорни пут, ПИЗК/Акт је нападнут и дисрегулисан бројним ретровирусним или ДНА тумор вирусним онкогеним продуктима.

Тумор супресорни гени: као тумор супресорни ген туберозна склероза 1 и туберозна склероза 2 (ТСЦ1 и ТСЦ2) су познати као мТОР пут и смањују активност ПИЗК пута. ПТЕН-ПИЗК/Акт пут регулише основне ћелијске процесе који су у вези са туморигенезом.

Сигнали који иду преко ПИЗК пута, преко Акт и других ефектора доводе до поремећаја бројних ћелијских процеса укључујући регулацију ћелијског циклуса, преживљавање ћелија, адхезију ћелија и мотилитет, ангиогенезу, глукоза хомеостазу, и величину ћелија и контролу величине органа.

а. Регулација прогресије ћелијског циклуса

Показано је да је ПТЕН кључни регулатор прогресије кроз ћелијски циклус. Акт је главни регулатор задржавања ћелија у G1 фази.

б. Регулација преживљавања ћелија

Губитак ПТЕН функције или активација Акт резултира у нарушеном преживљавању ћелија.

ц. Регулација ширења и мотилитета ћелија

ПИЗК преноси сигнале не само на Акт већ и на друге ефекторе који доводе до борања, мотилитета ћелија и њиховог ширења. Као резултат губитак једне генске копије ПТЕН повећава мотилитет и инвазивност канцерских ћелија док реекспресија ПТЕН-а елиминише овај ефекат.

д. Регулација ангиогенезе

ПТЕН супримира хипоксијом посредовану стабилизацију и индукује хипоксични транскрипциони фактор 1 (ХИГ-1) и појачава регулацију васкуларног ендотелног фактора раста и стварање нових крвних судова. Зато губитак ПТЕН-а или активација ПИЗК/Акт ствара тумор са ангиогеним особинама.

Тумор супресор ген ПТЕН је други најчешће мутирани ген након p53 у бројним спорадичним и хередитарним карциномима. За тумор супресорну активност одговорна је липидна фосфатазна активност.

ПТЕН кодира за велики тумор супресорни протеин који је дуал специфична фосфатаза. Инактивација ПТЕН-а учествује у хередитарним и спорадичним карциномима. Мутације или делеције ПТЕН-а историјски најчешће идентификовани механизми инактивације тумор супресорних гена налазе се у малом броју спорадичних

примарних карцинома. Упркос одсуству класичних нуклеарних сигнала, ПТЕН улази у једро преко неколико механизма, укључујући просту дифузију, активни транспорт, експорт зависан од цитоплазматских сигнала, моноубиквитациони зависни импорт. Цитоплазматски ПТЕН има добро познату улогу као негативни регулатор ПИЗК/Акт пута. Јасно је да цитосолни ПТЕН није исто што и нуклеарни ПТЕН. Нуклеарни ПТЕН игра улогу у стабилизацији хромозома, обнови ДНА, заустављању ћелијског циклуса и стабилности ћелија. Баланс између ових функција је важан фактор да ли ће ћелија остати бенигна или постати малигна (Тамгунеу Т, 2007). ПТЕН је неопходан за п53 посредовану апоптозу. ПТЕН може пасивно да дифундује кроз нуклеарне поре. Функције нуклеарног и цитоплазматског ПТЕН-а су различите. У ћелијама које немају ПТЕН, ниво п53 је знатно редукован због смањене стабилности. Експресија дивљег типа ПТЕН повећава стабилност п53. ПТЕН учествује у одржавању стем ћелија (Тамгунеу Т, 2007).

Нуклеарни ПТЕН

Инактивација ПТЕН-а је присутна код наследних и спорадичних канцера. Мутације или делеције ПТЕН-а су најчешће идентификовани механизми инактивације тумор супресора и налазе се у малом броју спорадичних тумора што указује да постоје други механизми инактивације. Упркос одсуству класичне нуклеарне локализације сигнала, ПТЕН улази у једро на неколико механизма укључујући просту дифузију, активно кроз поре, преко цитоплазматског сигналног експорта и моноубиквитарног зависног импорта (Планцхон МС, 2008). Цитоплазматски ПТЕН има добро познату улогу као негативни регулатор ПИЗК/АКТ пута. Јасно је да цитосолни ПТЕН није исти као нуклеарни ПТЕН. Нуклеарни ПТЕН игра улогу у одржавању стабилности хромозома, обнови ДНА, заустављању ћелијског циклуса и целуларној стабилности. Баланс између наведених функција је важан фактор да ли ће процес бити бенигни или неопластични.

Раније студије су указале да се ПТЕН налази у цитоплазми, међутим сада је доказано да се ПТЕН налази и у једру, нормалних неурона, ендотелних ћелија, миоепителних ћелија дојке, у фоликуларним ћелијама тироидеје, у ћелијама острваца панкреаса. Губитак нуклеарног ПТЕН-а се види у неким спорадичним туморима, као код меланома. Нуклеарни ПТЕН се губи и смањује се митотски индекс. Нуклеарни ПТЕН је евидентан у мирујућим ћелијама али не и у активно делећим ћелијама где се

углавном налази у цитоплазми. Сада се верује да у нормалним и мирујућим ткивима ПТЕН је примарно локализован у једру, док у неопластичним ткивима предминира ПТЕН у цитоплазми. ПТЕН у једру је потребан за тумор супресорну активност. Многи су мислили да је налаз ПТЕН-а у нуклеусу артефакт, међутим показано је да је локализација ПТЕН-а зависна од ћелијског циклуса, када се веће вредности ПТЕН-а у једру налазе у G0-G1 фази, а ниже вредности се налазе у S фази. Ово је конзистентно са дистрибуцијом ПТЕН-а у нормалним и туморским ткивима. Нормално, мирујућа ткива се састоје углавном од ћелија у G0-G1 фази и показују предоминантно нуклеарну локализацију ПТЕН-а, док активно делеће канцерске ћелије имају већи проценат ћелија у S фази и зато показују повећане вредности цитоплазматског ПТЕН-а. Промене у интрацелуларној локализацији ПТЕН-а изгледа да су захваћене у неопластичној трансформацији и могу модулирати своју активност

Нуклеоцитоплазматско кретање ПТЕН-а

ПТЕН нема типичан нуклеарни импорт (нуклеарно локализовани сигнал; НЛС) или нуклеарни експорт (нуклеарни експортни сигнал, НЕС). Онда се поставља питање како ПТЕН улази и излази из једра. Неколико механизма нуклеоцитоплазматског кретања ПТЕН-а је постулирано укључујући просту дифузију, експорт који зависи од цитоплазматских сигнала, активно кретање од стране РанГТП-азе или великог сводног протеина, кретање које зависи од фосфорилације или моноубиквитилационог импорта.

Већина указује да ПТЕН у једро улази простом дифузијом. Дифузија кроз нуклеарне поре је ограничена на протеине који имају протеинску масу мању од 60 000 Да, што омогућује дифузију ПТЕН-а који има око 47 000 Да. ПТЕН улази у једро пасивном дифузијом и цитоплазматском секвестрацијом која утиче на нуклеоцитоплазматску дистрибуцију.

За МВП се претпоставља да је носећа молекула за нуклеоцитоплазматски транспорт који зависи од калцијума. Док p53 има релативно кратак полуживот дотле ПТЕН је релативно стабилан протеин и његови ниво могу бити модулирани акцелерацијом деградације.

Функције нуклеарног ПТЕН-а

Липид фосфатазна активност ПТЕН-а регулише АКТ фосфорилацију и p27 ниво експресије док фосфатазна активност регулише МАПК фосфорилацију и експресију Д1 циклина. Нуклеарни ПТЕН индукује G0-G1 арест у ћелијама. Ћелије које показују експресију дивљег типа ПТЕН-протеина показују спорији раст и већи однос G1:C него ћелије које показују експресију нуклеарног ПТЕН-а. ПТЕН такође напада апоптозу. Цитоплазматски ПТЕН је проапоптотичан. Експресија дивљег типа или смањена нуклерна локализација повећава активност каспазе 3/7 у поређењу са не трансформисаним ћелијама. Еквилибријум између нуклеарног и цитоплазматског ПТЕН-а важан је за регулацију апоптозе. И цитоплазматски и нуклеарни ПТЕН играју улогу у регулацији карциногенезе. Важно је напоменути да липидна фосфатазна активност ПТЕН-а доминира у цитоплазматском сегменту док протеин фосфатазна активност је генерално нуклеарна.

Досадашња сазнања сугеришу да постоје бројни механизми уласка ПТЕН-а у једра и да то зависи од типа ћелија, околне средине. Јасно је да нуклерани ПТЕН нема исте функције као цитоплазматски. Нуклеарни ПТЕН игра строгу улогу у регулацији целуларне хомеостазе и стабилности. Он доприноси стабилности хромозома, обнови ДНА и заустављању ћелијског циклуса. Постоје и алтернативни механизми дисрегулације ПТЕН-а. ПТЕН регулише деловање цитоскелета који учествује у кретању неких ћелија и важан је за метастазирање. ПТЕН ензим делује као део хемијског пута који сигнализира ћелијама да престану са деобом и да подлегну апоптози. Ове функције превенирају неконтролисани раст ћелија које доводе до стварања тумора. ПТЕН контролише миграцију, адхезију и стварање нових крвних судова-ангиогенезу. Такође учествује у одржавању стабилности генских информација. До данас је дијагностиковано око 100 мутација у ПТЕН гену који изазивају Ковден синдром.

ПТЕН хамартома тумор синдроми: Ковден синдром, Бантуан-Рилеу-Рувалкада синдром, протеус синдром, протеус лајк синдром.

2. Циљеви и хипотезе

- A. Главни циљ је анализирати имунохистохемијски туморе дојке обрађене у периоду од октобра 1998 до краја 2008, на начин како то предлаже Ниелсен Торстен. Овако добијене прогностичке подгрупе анализирати на остале стандардне параметре који се одређују код тумора дојке: године старости, величина тумора, хистолошки и нуклеарни градус, лимфонодални статус и друге пратеће пролиферативне промене у дојци. Издвојити прогностичку групу Хер2 позитивних тумора и код свих урадити додатна имунохистохемијска испитивања на Ки-67, п53 и ПТЕН. Код ове групе одредити проценат позитивних Хер2 ћелија, и код оних тумора који показују Хер2 позитивну реакцију 2 и 3+ урадити ПТЕН. На овај начин ће се видети да ли је дошло до мутације ПТЕН-а и у ком степену.
- B. Радна хипотеза је да прогностичка група Хер2 позитивних тумора неће показивати промене у ПТЕН супресорном гену или ће исте бити присутне. Ако су промене у ПТЕН супресор гену присутне одредити степен промена и субцелуларну локализацију ПТЕН-а и исту корелирати са горе наведеним параметрима.

3. Материјал и метод

Као материјал би се користили подаци и ткивни материјал пацијенткиња оперисаних од малигнух тумора дојке у периоду од октобра 1998 до јануара 2009 године, који је обрађиван у Служби патологије КБЦ Бежанијска коса.

Из архиве би били извађени сви парафински калупи малигнух тумора код којих су одређивани стероидни рецептори и Хер2. Претходно би подаци били сређени према ВХО хистолошкој класификацији. Код већине пацијенткиња су одређивани рецептори за естроген и прогестерон као и Хер2. Тамо где није одређен Хер2 исти би био накнадно одређен. Тако би се издвојила прогностичка група Хер2 + тумора. На одговарајућим парафинским блоковима би били имунохистохемијски одређени Ки-67, п53, ПЦНА и ПТЕН. Овако добијен имунохистохемијски профил би био обрађен статистичким методама. Посебно би се упоређивао проценат позитивности ПЦНА, Ки-

67, p53 и ПТЕН-а, јер се ова два задња супресора међусобно преплићу биолошки. Што се тиче ПТЕН-а одређивали би смо субцелуларну локализацију: нуклеарну (Н+) и цитоплазматску (Ц+). Цитоплазматска локализација би била градирана на следећи начин: одсутна (0), слабо позитивна (1,2), позитивна (3). Позитивна локализација у цитоплазми би значила да има ПТЕН мутације. Што се локализације у једру тиче иста би била означена са позитивна (Н+) и негативна (Н-). Позитивна једарна локализација је карактеристика нормалних ћелија.

У методологији би биле коришћене имунохистохемијске методе а користила би се моноклонска антитела форме ДАКО, следећих каталожких карактеристика:

1. ПТЕН-клон 6X2,1,М3627
2. ХЕР2-А0485
3. ЕР-клон 1Д5, М7047 (1 мл)
4. ПР-клон ПгР636, М3569 (1мл)
5. p53-клон-ДО-7, М7001 (1мл)
6. Ки-67, клон МИБ-1,М7240 (1мл)
7. Протеиназа К С2019

За визуализацију би био коришћен ЛСАБ кит фирме ДАКО, К0690

Сви микроскопски препарати би били анализирани под микроскопом фирме Леитз (ДМЛС) снабдевеним видео камером и програмом за анализу слике (кју-вин).Препарати би били сликани ради илустрација.

Статистичке анализе би биле рађене у СПСС програму 16.0

4. Детаљан опис методологије

Материјал који се користи су укалупљена ткива тумора дојке код пацијенткиња које су већ оперисане. Користили би се парафински блокови само оних пацијенткиња код којих је одређиван рецепторски статус и Хер2. Препарати би били сечени на 4 микрона, адекватно сушени и припремљени за имунохистолошка испитивања. Након третирања у лабораторијској микроталасној пећници и хидрирања била би аплицирана моноклонска антитела према препоруци самог произвођача. Визуализација реакције се

одређује ЛСАБ+ китом, препарати прекривају пластичним материјалом и анализирају под микроскопом.

Претходно би била направљена нова статистичка табела у СПСС програму 16,0. У њу би се уносили следећи подаци: број биопсије, страна: лева-десна, старост пацијенткиње, хистолошка дијагноза, статус лимфних чворова, статус стероидних рецептора, Хер2 статус (0,1,2,3), ПТЕН (0,1,2,3), p53, ПЦНА (%), Ки-67 (%). Група Хер2 са реакцијом 3+ била би анализирана на присуство наведених параметара. У статистици би се одређивао проценат ПТЕН позитивних и негативних у овој групи, те би се иста поделила на ПТЕН позитивне и негативне туморе. Остали параметри би били упоређивани са ове две подгрупе. Све би ово било статистички документовано дијаграмима и одређеним параметрима и илустровано микрофотографијама, добијеним и обрађеним у кју-вин програму.

5. Статистичке методе

У обради и анализи добијених података коришћене су следеће статистичке методе:

- **Методе униваријантне статистичке анализе**
 - Дескриптивна статистика за опис података
 - Експлораторна анализа за међугрупну анализу
 - Колмогоров-Смирнов тест за тестирање постојања нормалне расподеле
 - Хи квадрат тест за једнакост расподеле параметара
 - Пирсонов Хи квадрат тест за утврђивање постојања везе између параметара
 - Хи квадрат Ликелихуд Ратио тест за утврђивање постојања везе између параметара у случају мањих група
 - Манн Вхитнеи тест за разлику између група
 - Спearман-ов коефицијент корелације за одређивање степена везе између посматраних параметара

- РОЦ крива за одређивање тачке превоја код анализе сензитивности и специфичности
- АУЦ однос као мера сензитивности параметра и степена значајности
- **Методе мултиваријационе анализе**
 - Мултиваријациона биномна логистичка регресиона анализа (форвард метод) за одређивање параметара од значаја за предикцију појаве смртног исхода.

У циљу обраде података коришћен је статистички пакет СПСС. Анализе су рађене са вероватноћом од 95% ($p \leq 0.050$). Обрађени подаци и добијени резултати су приказани графички.

6. Очекивани резултати и значај студије

Очекујемо да докажемо да Хер2 прогностичка група није хомогена, већ да има најмање две подгрупе на шта указују нека клиничка искуства, јер једна група пацијенткиња показује одличан терапијски одговор на циљну терапију а друга нема повољног одговора. На овај начин би се показало код којих пацијенткиња треба очекивати повољан терапијски одговор на терапију моноклонским антителима, а код којих се такав одговор не очекује и не треба применити овај вид терапије. С обзиром на цену лечења и на очекиване ефекте добит за пацијенткиње би била адекватна.

Анализа материјала

Табела 1. Пацијенткиње са ХЕР2, 3+

рб	бб	с т а р	Д	Л	Д ц и с	Н о с	м е д	Л Ц	ЛН	Л Н +	ЕР	ПР	Неу	п5 з	П ЦН А	Ки 67	П Т Е Н
1	3992-0	52	+	-	+	+	-	-	-	-	70	30	3	0	70	0	0
2	1262-0	51	-	+		+			1	0	40	20	3	0	30	5	2
3	3621-0	40	-	+		+			1	0	50	50	3	30	90	10	2
4	4593-0	62	+			+					70	70	3	5	90	5	2
5	5097-0	40		+		+					00	00	3	10	90	70	1
6	5336-0	52	+				+				60	10	3	30	90	50	0
7	5342-0	75	+					+			70	50	3	00	00	00	0
8	5362-0	43	+			+					30	10	3	5	90	10	1
9	5583-0	79		+		+			12	1	0	0	3	5	70	10	1
10	5631-0	50		+		+					0	0	3	50	90	5	0
11	5795-0	67		+			+				10	10	3	50	70	5	1
12	5938-0	48	+			+					50	50	3	5	90	0	1
13	6417-0	52		+		+					30	50	3	0	70	0	1
14	6488-0	70		+				+			100	70	3	10	90	5	1
15	6722-0	59	+					+			30	10	3	50	50	5	1
16	137-07	68	+			+					30	30	3	5	50	5	1
17	172-07	60	+			+			3	1	30	10	3	5	70	5	1
18	211-07	41		+				+	11	2	30	19	3	5	70	5	0
19	369-07	53	+					+			0	0	3	0	70	0	0
20	667-07	68	+			+					70	70	3	5	70	5	1
21	1006-0	58	+			+					60	30	3	3	70	5	0
22	1418-0	51	+			+					20	20	3	0	70	5	0
23	1606-0	55		+				+			30	50	3	0	70	5	0
24	1927-0	72	+			+					0	0	3	0	70	5	0
25	2053-0	52		+		+					30	30	3	5	90	5	2
26	2974-0	72	+			+					60	90	3	20	70	0	2
27	3127-0	52		+							90	70	3	0	30	30	1
28	3347-0	65	+			+			3	3	80	80	3	0	70	0	3
29	3417-0	65		+				+			0	0	3	50	30	0	0
30	4176-0	45	+			+					0	0	3	30	50	0	0
31	4214-0	70	+					+			90	70	3	50	30	0	0
32	4458-0	77	+			+					30	30	3	30	70	10	0
33	4814-0	64	+			+					10	10	3	30	50	0	0
34	5041-0	56		+		+					10	10	3	5	50	0	0
35	5263-0	49		+				+			70	80	3	70	50	0	0
36	5263-0	77	+					+			10	10	3	90	70	0	0
37	6019-0	57	+					+			0	0	3	70	90	70	0
38	5759-0	71		+		+					0	0	3	0	70	0	0
39	5598-0	63	+			+					0	0	3	10	50	0	0
40	6048-0	43		+		+					0	0	3	30	90	0	0
41	6053-0	70	+					+			70	20	3	10	70	5	0
42	6199-0	39	+					+			0	0	3	10	70	5	0
43	6318-0	55		+							0	0	3	30	90	30	2
44	6365-0	53	+			+					0	0	3	10	70	0	2
45	5985-0	44		+				+			80	80	3	30	90	0	2

46	7123-0	55	+			+					0	0	3	10	90	30	3
47	7376-0	64		+				+			90	90	3	5	90	5	0
48	7419-0	63		+							90	90	3	0	70	0	0
49	7425-0	54		+							90	80	3	70	90	15	1
50	7493-0	58		+		+					90	70	3	50	90	10	1
51	6883-0	50		+				+			20	90	3	70	90	10	2
52	146-08	46	+								90	90	3	70	90	70	1
53	537-08	48		+		+					0	0	3	30	70	5	0
54	568-08	73	+			+					0	0	3	30	70	5	0
55	1399-0	37	+			+					0	0	3	0	70	0	1
56	1606-0	47	+					+			70	10	3	30	90	0	1
57	2192-0	54	+					+			70	70	3	30	90	10	3
58	4186-0	69	+			+					0	0	3	70	90	50	3
59	4334-0	53		+							0	0	3	70	90	5	1
60	4578-0	56		+		+					0	0	3	70	70	5	3
61	4764-0	78		+		+					0	0	3	50	70	5	0
62	4842-0	84		+		+					0	0	3	5	70	0	3
63	6439-0	48		+		+					70	70	3	5	90	10	3
64	5914-0	70		+				+			0	0	3	30	90	70	2
65	6075-0	51	+			+					0	0	3	70	70	5	3
66	4819-0	60	+			+					0	0	3	70	70	5	3
67	6697-0	77		+		+					20	0	3	30	90	10	2
68	6861-0	52	+			+					0	0	3	10	70	5	2
69	19-08	53	+			+					70	70	3	5	70	5	2
70	23-08	47	+			+			25	1	70	90	3	5	90	5	3
71	8-09*	58		+				+	12	0	30	0	3	5	90	5	2
72	22-09	55		+		+	+		25	6	70	90	3	5	90	3	2
73	23-09	54	+						16	0	0	0	3	5	90	30	2
74	41-09	63		+		+			3	0	70	5	3	5	90	30	3
75	48-09	34		+		+			20	0	70	5	3	5	90	0	2
76	82-09	53	+					+	0	0	60	0	3	60	90	30	0
77	136-09	62		+		+					0	0	3	50	90	20	2
78	153-09	35	+			+					70	70	3	0	90	10	1
79	163-09	57		+		+					70	70	3	0	90	20	0
80	168-09	47		+		+					20	70	3	0	70	30	1
81	170-09	63		+							30	20	3	5	70	5	0
82	204-09	63	+						21	1	0	0	3	5	90	5	1
83	218-09	53		+		+					90	0	3	0	90	40	3
84	736-09	55		+		+					30	25	3	0	70	5	3
85	590-09	65	+			+			10	1	15	0	3	15	90	15	3
86	170-09	55	+			+					0	0	3	60	70	40	3
87	671-09	67	+			+					0	0	3	0	70	5	3
88	1332-0	56	+			+			6	3	50	10	3	0	90	30	1
89	1323-0	43	+			+					0	0	3	90	90	5	3
90	1212-0	75	+			+					0	0	3	5	90	10	2
91	950-06	41	+			+					50	30	3	10	70	5	1

Табела 2. Пацијенткиње са Хер 2, 2+

рб	бб	с т а р	Д	Л	И С	н о с	м	Л Ц	Лн	ЛН +	Ер	ПР	н е у	п53	п ц на	Ки 67	п т е н
1	20-05	43	+					+	14	1	70	70	2	5	90	10	2
2	23-05	68		+				+	15	6	90	30	2	10	70	0	2
3	292-05	49		+	+	+			10	0	50	30	2	0	70	0	1
4	772-05	45	+						1	0	70	90	2	0	90	0	2
5	4377-05	67		+				+			70	50	2	5	70	70	0
6	3401-06	30	+			+					50	30	2	70	70	0	2
7	5478-06	79	+			+					50	30	2	30	70	15	0
8	5572-06	55		+		+					70	50	2	30	70	30	3
9	5607-06	51	+					+			50	30	2	30	90	0	0
10	5791-06	72	+					+			50	30	2	30	90	0	0
11	6109-06	67		+		+					70	50	2	50	90	5	3
12	6158-06	55		+				+			30	30	2	70	90	30	3
13	6223-06	42		+				+			50	50	2	50	70	5	2
14	6224-06	41	+					+			50	30	2	30	90	0	2
15	6254-06	66		+				+			70	50	2	50	90	0	2
16	6419-06	46	+			+					70	50	2	50	70	0	2
17	6547-06	75	+					+			70	30	2	90	90	5	3
18	6620-06	65	+			+					30	30	2	0	70	0	0
19	6665-06	73		+		+					30	20	2	0	70	0	0
20	6827-06	55		+							90	50	2	5	70	0	3
21	6938-06	60		+				+			30	10	2	0	90	0	0
22	6973-06	83		+				+	7	1	30	10	2	0	90	0	0
23	7056-06	49	+			+			7	1	90	70	2	5	90	0	0
24	7083-06	40	+			+			6	5	40	30	2	30	70	30	0
25	7119-06	54		+		+			2	1	50	30	2	50	70	0	3
26	210-07	79		+				+			90	70	2	30	80	0	0
27	566-07	54		+							70	40	2	30	70	10	1
28	1030-07	67	+					+			70	10	2	70	70	0	3
29	1266-07	53		+				+			90	60	2	30	90	0	0
30	1228-07	74		+				+			90	60	2	50	70	10	3
31	1420-07	52	+			+			13	12	50	50	2	70	90	0	2
32	1611-07	43		+		+					70	70	2	30	70	10	3
33	1720-07	53	+			+					50	60	2	30	90	0	0
34	1753-07	60	+			+					30	60	2	30	70	0	0
35	1842-07	64		+				+			35	50	2	5	70	5	0
36	2142-07	60	+			+					30	30	2	10	70	30	2
37	2548-07	52	+			+					30	30	2	15	70	15	0
38	2774-07	49	+			+					10	10	2	15	70	0	0
39	2775-07	50	+			+					70	80	2	5	90	0	0
40	3090-07	51		+		+					10	10	2	90	90	0	0
41	3093-07	72		+							70	80	2	30	70	0	0
42	3514-07	57	+					+			90	70	2	30	90	0	0
43	3757-07	60		+		+					0	0	2	30	90	0	0
44	4339-07	55		+		+					70	80	2	30	70	0	0
45	5123-07	43	+			+					60	70	2	10	90	0	0
46	5137-07	49		+		+					90	90	2	15	70	0	0
47	5164-07	59		+		+					80	80	2	0	70	0	0
48	5992-07	67	+			+					80	20	2	0	70	0	0

49	7378-07	57		+		+					90	70	2	15	90	0	0
50	6635-07	47	+			+					0	0	2	50	70	0	2
51	171-08	50	+		+						0	0	2	30	90	10	0
52	243-08	48	+		+						50	60	2	10	90	0	0
53	971-08	57	+			+					0	0	2	15	70	0	0
54	1994-08	66	+			+					90	10	2	50	90	0	0
55	2035-08	58	+			+					90	70	2	10	70	0	0
56	2249-08	66		+		+					10	0	2	10	90	0	0
57	2278-08	44	+			+					80	20	2	15	70	0	0
58	2436-08	74	+			+					90	90	2	5	90	0	0
59	2849-08	60	+		+						0	0	2	0	70	0	0
60	3145-08	50	+								35	75	2	20	90	10	0
61	3886-08	46		+		+					20	10	2	5	70	0	2
62	4151-08	51		+		+					00	0	2	5	70	0	0
63	4847-08	57	+		+						0	0	2	15	90	0	1
64	4992-08	58		+	+						0	0	2	50	70	0	1
65	5316-08	37	+			+					90	90	2	5	70	0	0
66	6142-08	56		+	+						90	90	2	50	90	0	1
67	6572-08	48	+		+						0	0	2	50	70	5	2
68	6975-08	68	+		+						80	20	2	50	90	0	2

Табела 3. На основу датих података добијени су резултати за медијану и интерквартилни ранг ($Me \pm IQR$)

		Медијана	интерквартални ранг
Старост	Хер 2+	55	17
	Хер 3+	55	15
Естроген %	Хер 2+	50.0	50
	Хер 3+	30.0	70
Прогестерон %	Хер 2+	30.0	60
	Хер 3+	10.0	70
п53	Хер 2+	30.0	45
	Хер 3+	10.0	25
ПЦНА	Хер 2+	70.0	20
	Хер 3+	70.0	20
Ки-67	Хер 2+	.0	5
	Хер 3+	5.0	10
Број лимфних чворова	Хер 2+	7	11
	Хер 3+	11	15
Број метастаза	Хер 2+	1	5
	Хер 3+	1	2

Из табеле 3 се види да је старост пацијенткиња са Хер2,2+ и 3+ иста и да старост нема утицаја на налаз (дијаграм 1). Сличан налаз је код рецептора за естроген и прогестерон. Налаз ПЦНА је исти у обе групе Хер-а. Ки-67 је чешће био позитиван у групи Хер2,3+. Број лимфних чворова са метастатским депозитима је сличан.

Упоредном анализом између група Хер2,2+ и Хер2,3+ добијени су следеће статистичке значајности (Табела 4.)

Табела 4.

Тест Статистика Манн-Вхитнеи								
	Старост	Естроген %	Прогестерон %	п53	ПЦНА	Ки67	Број лимфних чворова	Број метастаза
З	-.338	-3.526	-2.867	-	-.711	-	-.635	-.832
п.	.735	.000	.004	1.694	.477	5.023	.526	.405
				.090		.000		

На основу добијених резултата утврђено је да постоји статистички значајна разлика у оквиру естроген, прогестерон и Ки-67 параметра. Група Хер2,2+ је имала значано више вредности естрогена и прогестерона док су биле значајно снижене вредности Ки-67. Остали параметри се нису разликовали у међусобним вредностима. Ово указује да подгрупа са ХЕР 2,2+ има неке карактеристике луминалног Б типа. Даља промена генотипа би водила у чисту подгрупу ХЕР2,3+.

Поређење група Хер и стране дојке показало је да нема статистички значајне разлике (Табела 5.). Ово је очекивани налаз с обзиром да је ткиво обе дојке једна врста ткива (таргета).

Табела 5. Однос параметара у односу на страну дојке (лева, десна)

			Страна дојке		Укупно
			Десно	Лево	
ХЕР Група	Хер2, 2+	Број	37	31	68
		% унутар ХЕР Групе	54.4%	45.6%	100.0%
	Хер2, 3+	Број	47	44	91
		% унутар ХЕР Групе	51.6%	48.4%	100.0%
Укупно		Број	84	75	159
		% унутар ХЕР Групе	52.8%	47.2%	100.0%

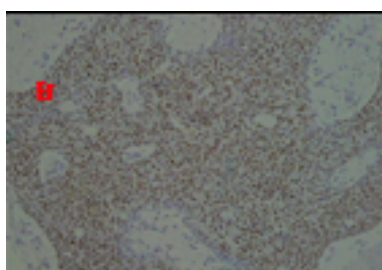
п=0.730

Тип тумора по групама (табела 6) је на граници значајности ($p=0.053$) па се може рећи да је у случају Хер 2, 3+ било више НОС типова тумора (74.7% према 60.3%).

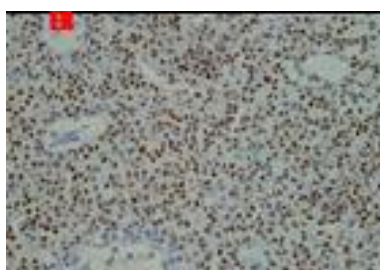
Табела 6. Типови тумора и ХЕР2

			Тип тумора		Укупно
			Нос	Лобуларни	
ХЕР Група	Хер2, 2+	Број	41	27	68
		% унутар ХЕР Групе	60.3%	39.7%	100.0%
	Хер2, 3+	Број	68	23	91
		% унутар ХЕР Групе	74.7%	25.3%	100.0%
Укупно		Број	109	50	159
		% унутар ХЕР Групе	68.6%	31.4%	100.0%

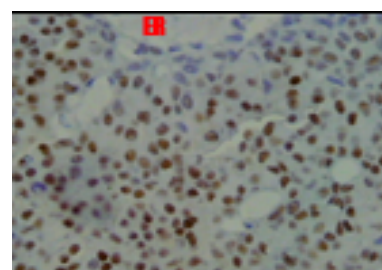
$p=0.053$



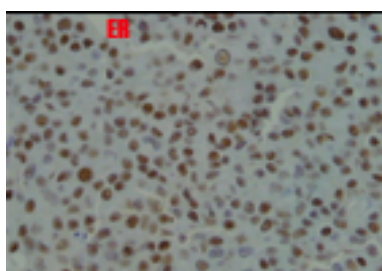
Слика 1. (Ер, 100x) Аллред скор 4



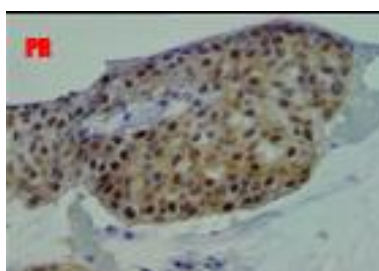
Слика 2. (Ер, 100x) Аллред скор 7



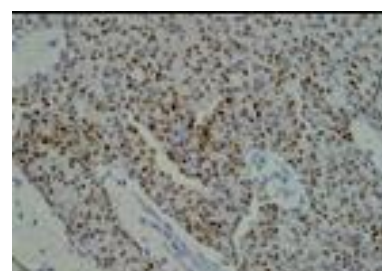
Слика 3. (Ер, 200x) Аллред скор 7



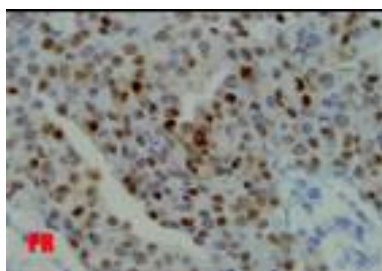
Слика 4. (Ер, 200x) Аллред скор 7



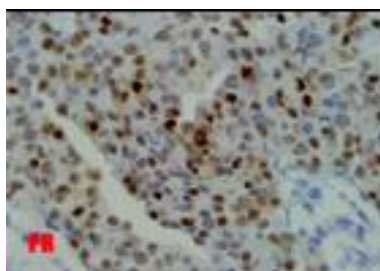
Слика 5. (Ер, 200x) Аллред скор 7



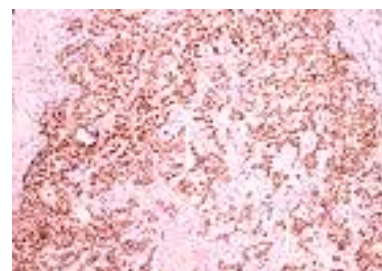
Слика 6. (Ер, 100x) Аллред скор 6



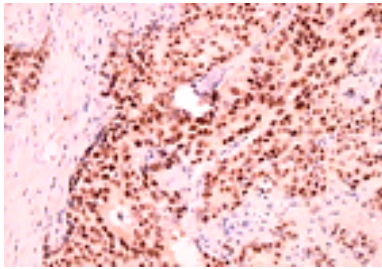
Слика 7. (Пр, 200x) Аллред скор 6



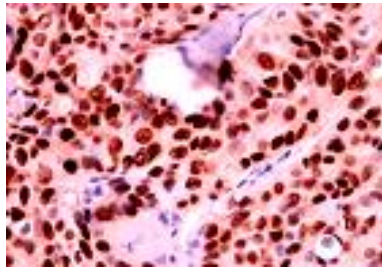
Слика 8. (Пр, 200x) Аллред скор 6



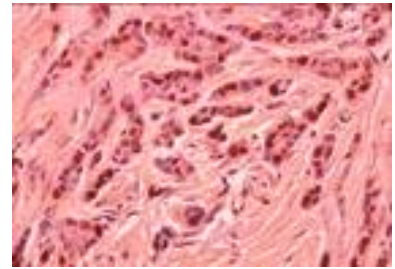
Слика 9. (Пр, 100x) Аллред скор 6



Слика 10. (Пр, 200x) Аллред скор 6



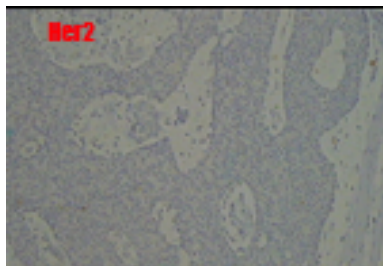
Слика 11. (Пр, 400x) Аллред скор 7



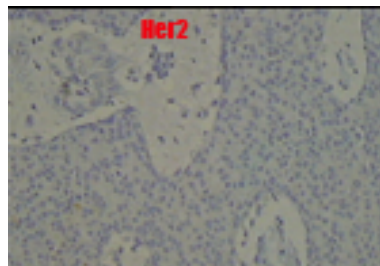
Слика 12. (Пр, 200x) Аллред скор 6

Рецептори за естроген

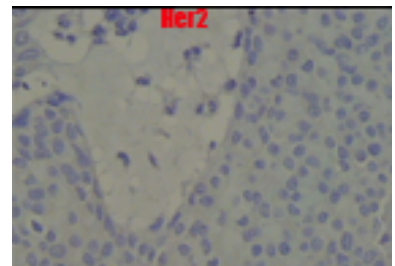
Бојењем препарата на рецепторе за естроген види се да интензитет реакције није исти у свим позитивним ћелијама, тј. виде се ћелије чија су једра интензивније обојена од других ћелија (Слике 1,2,3,4,5,6). На већем увећању рецептори за прогестерон (Слике 7,8 и 9) имунохистохемијска реакција у једрима није хомогена. Виде се једра која су интензивније обојена хомогено (Слике 10,11 и 12) као и једра која су слабије обојена. Негде се види да је реакција у једарцу негативна (Слика 11).



Слика 13. (Хер2, 0+; 100x)



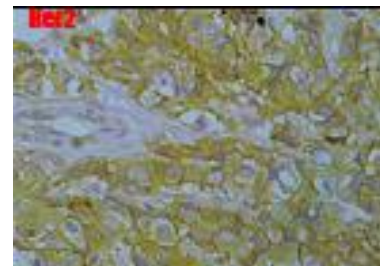
Слика 14. (Хер2, 0+; 200x)



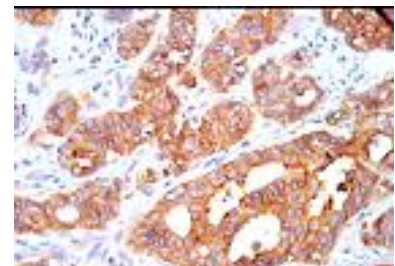
Слика 15. (Хер2, 0+; 400x)



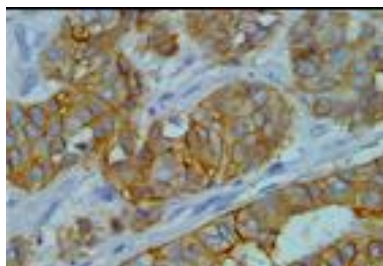
Слика 16. (Хер2,3+;100x)



Слика 17. (Хер2,3+;400x)



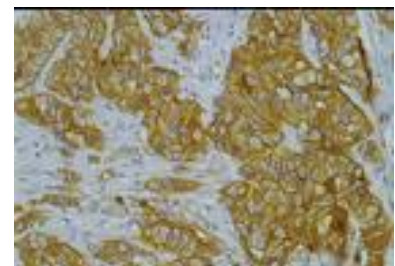
Слика 18. (Хер2,3+;100x)



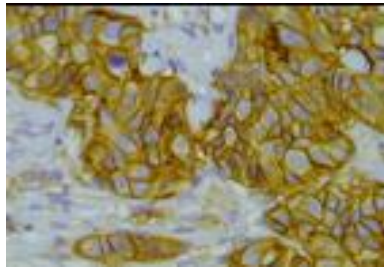
Слика 19. (Хер2,3+;200x)



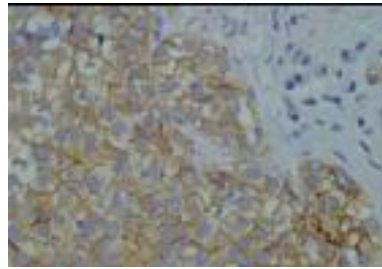
Слика 20. (Хер2,3+;100x)



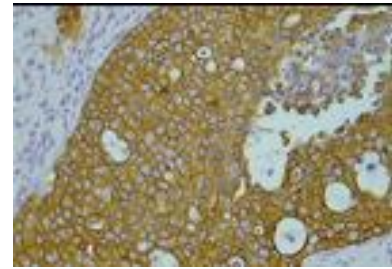
Слика 21. (Хер2,3+;100x)



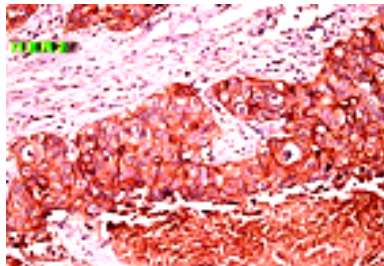
Слика 22. (170/09,Хер2,3+)



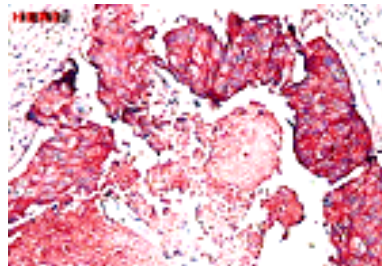
Слика 23. (176/09,Хер2,3+)



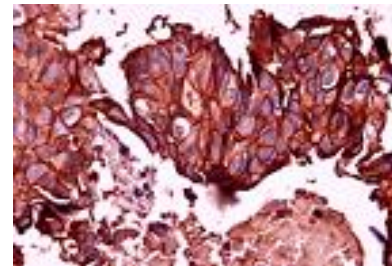
Слика 24. (590/09, Хер2,3+)



Слика 25. (Хер2, 3+)



Слика 26. (Хер2, 3+)



Слика 27. (Хер2,3+)

ХЕР2

Код негативних случајева, најчешће све ћелије показују негативну реакцију са антителима на Хер2 (Слике 13,14 и 15). У случајевима када је реакција 3+, иста је у пределу ћелијске мембране, тако да ова изгледа као прстен, униформне и хомогене дебљине (Слике 16 и 17). Међутим у ретким случајевима поред мембранске реакције иста је мрљаста и у цитоплазми непосредно испод мембране (Слика 18). Реакција је позитивна у групама ћелија а не у изолованим малигним ћелијама (Слике 19,20,21,22,23,24,25,26 и 27). Овакав налаз указује на присуство две популације ћелија у туморском ткиву: Хер2 позитивне и Хер2 негативне популације.

Табела 7. Налаз ПТЕН код Групе Хер2,2+ и групе Хер2,3+

		ПТЕН				Укупно
		Без	I	II	III	
ХЕР Група	Хер2, 2+ Број	40	5	14	9	68
	% унутар ХЕР Групе	58.8%	7.4%	20.6%	13.2%	100.0%
Хер2, 3+ Број	Хер2, 3+ Број	33	22	19	17	91
	% унутар ХЕР Групе	36.3%	24.2%	20.9%	18.7%	100.0%
Укупно	Број	73	27	33	26	159
	% унутар ХЕР Групе	45.9%	17.0%	20.8%	16.4%	100.0%

$P=0.009$

Поређење ПТЕН према степену изражености по групама (Табела 7). Хер је статистички значајно изражен пре свега у односу на ниво без ПТЕН-а (58.8% према 36.3%). Ознака "без" значи да није било мутације ПТЕН гена. У подгрупи Хер2, 2+ је

било 40 случајева а у подгрупи Хер2, 3+ 33 случаја. ПТЕН I, II и III значи интензитет мутације.

Однос постојања ПТЕН-а и Хер групе (Табела 8) показује статистички значајну повезаност где се види да је Хер2, 3+ чешће имао позитиван ПТЕН 63.7% , док у случају Хер2, 2+, 41.2% је било позитивних ПТЕН-а. Ово указује да је код 41,2% има смисла радити даља ИХХ испитивања тј. ЦИШ или ФИШ. У групи Хер2,2+ без мутације ПТЕН-а било је 40 пацијенткиња или 58,8%, што указује да та подгрупа тражи даљу имунохистохемијску анализу. Процент пацијенткиња у групи ХЕР2,3+ без мутације је 36,3%, што се може протумачити да у овој групацији постоје и друге генске промене које на основу садашњег ИХХ профила не могу бити разјашњене.

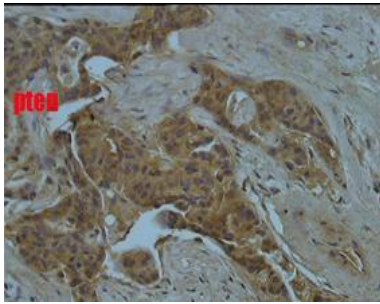
Табела 8. Однос пацијенткиња са ПТЕН 0 и са позитивним налазом

		ПТЕН 0 и остало		Укупно
		Без	Позитиван	
ХЕР Група	Хер2, 2+ број	40	28	68
	% унутар ХЕР Групе	58.8%	41.2%	100.0%
	Хер2, 3+ број	33	58	91
	% унутар ХЕР Групе	36.3%	63.7%	100.0%
Укупно	број	73	86	159
	% унутар ХЕР Групе	45.9%	54.1%	100.0%

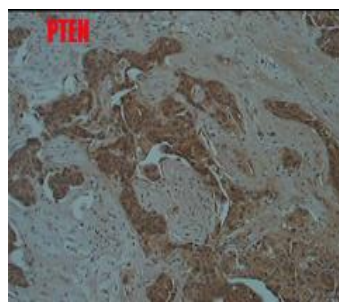
$P=0.005$

Од 68 пацијенткиња са налазом ХЕР2,2+, без мутације ПТЕН-а било је 40 пацијенткиња и ту групу можемо даље тестирати са ФИШ-ом или ЦИШ-ом на амплификацију и у случају амплификације је превести у ХЕР2,3+ и тако пацијенте третирати. Међутим пацијенткиње са позитивном реакцијом на ПТЕН, њих 28 или 41,2% не треба тестирати јер се сигурно не могу сврстати у већу групу, тј ХЕР2,3+. Треба рећи да се подгрупе ПТЕН-а одређују на основу интензитета реакције у цитоплазми, што може да варира од лабораторије до лабораторије, зависно од хромогена, и варијације постоје у зависности од анализатора. Зато је пожељно да се реакције означавају као одсутне или позитивне у односу на цитоплазму. Нуклеарне реакције се само нотирају као присутне или одсутне.

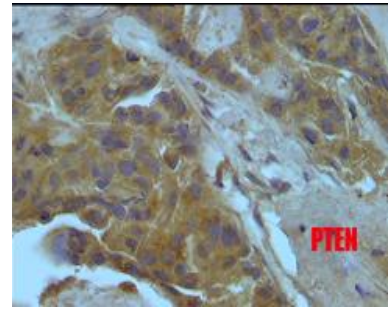
Ако се степен ПТЕН разврста на ниже и више вредности не показује статистички значајну везу између Хер група. Ако се реакција на ПТЕН подели у две групе, негативна (0 и 1) и позитивна (2 и 3) онда не постоје значајне вредности између ХЕР2, 2+ и ХЕР2, 3+.



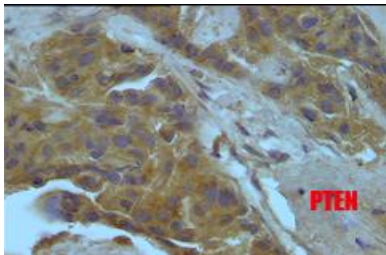
Слика 28. (ПТЕН, 3+, 200x)



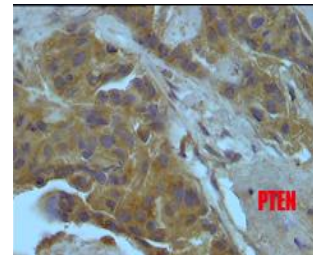
Слика 29. (ПТЕН, 3+, 100x)



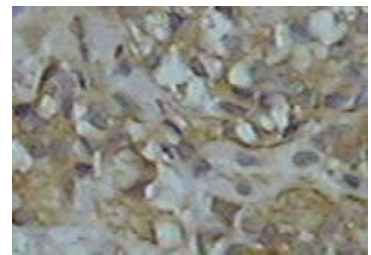
Слика 30. (ПТЕН, 3+, 400x)



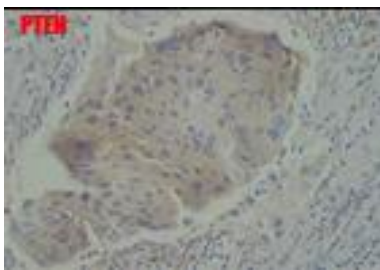
Слика 31. (ПТЕН, 3+, 200x)



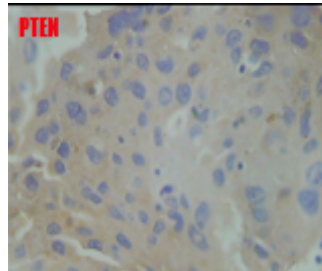
Слика 32. (ПТЕН, 3+, 200x)



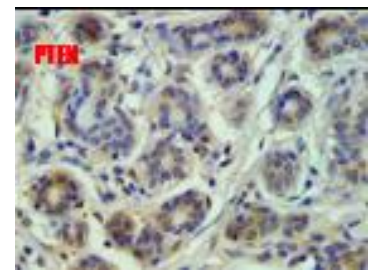
Слика 33. (ПТЕН, 2+, 400x)



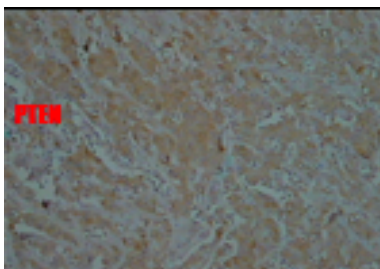
Слика 34. (ПТЕН, 1+, 200x)



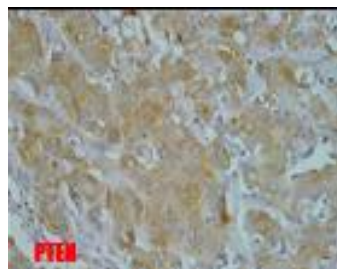
Слика 35. (ПТЕН, 1+, 400x)



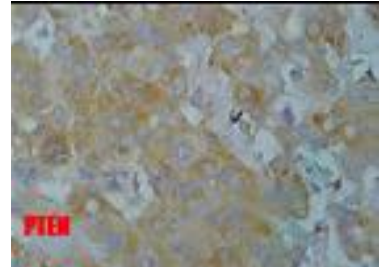
Слика 36. (ПТЕН, 3+, 100x)



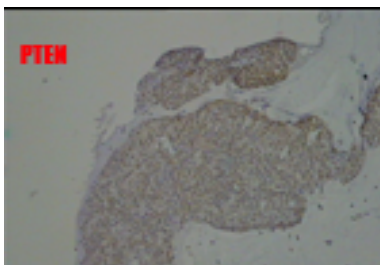
Слика 37. (ПТЕН, 2+, 200x)



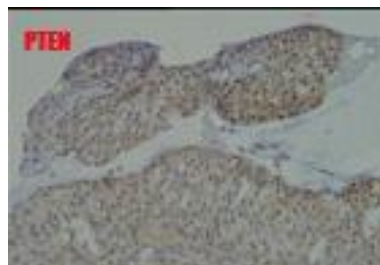
Слика 38. (ПТЕН, 2+, 200x)



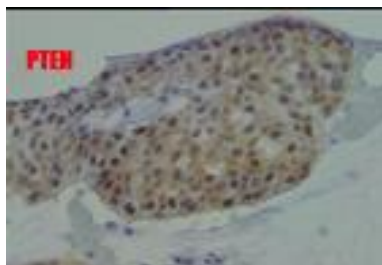
Слика 39. (ПТЕН, 3+, 400x)



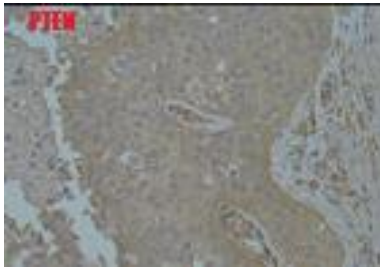
Слика 40. (ПТЕН, 1+, 100x)



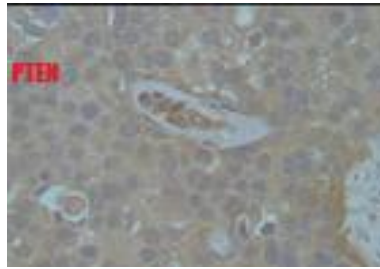
Слика 41. (ПТЕН, 1+, 200x)



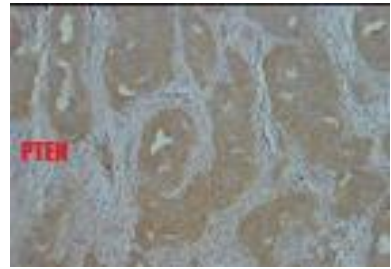
Слика 42. (ПТЕН, 3+, 400x)



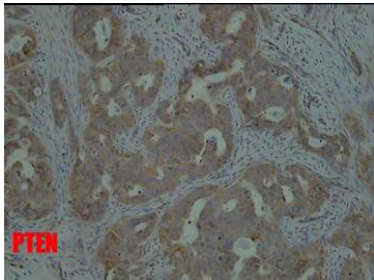
Слика 43. (ПТЕН, 1+, 200x)



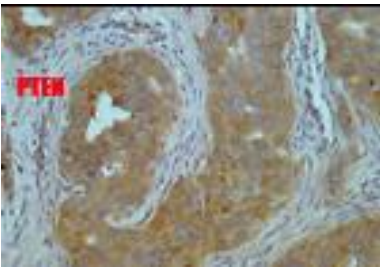
Слика 44. (ПТЕН, 1+, 400x)



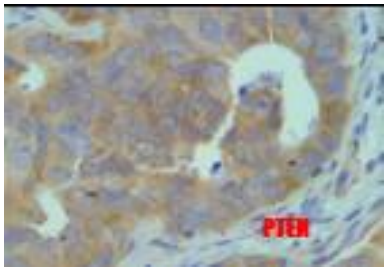
Слика 45. (ПТЕН, 3+, 200x)



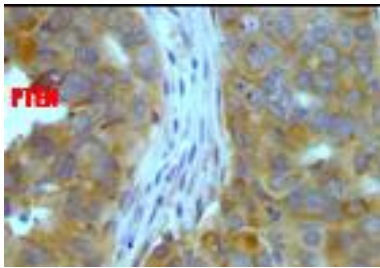
Слика 46. (ПТЕН, 2+, 100x)



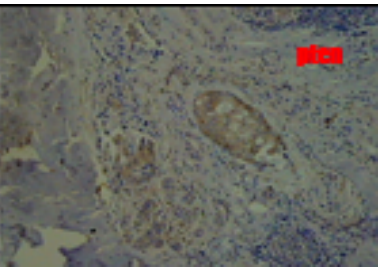
Слика 47. (ПТЕН, 3+, 200x)



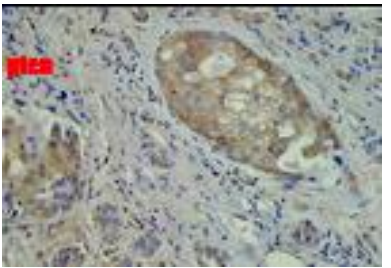
Слика 48. (ПТЕН, 3+, 400x)



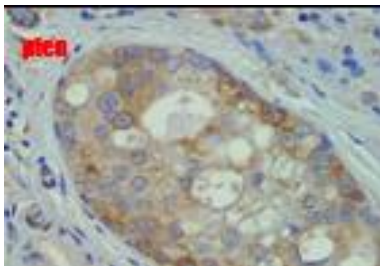
Слика 49. (ПТЕН, 3+, 400x)



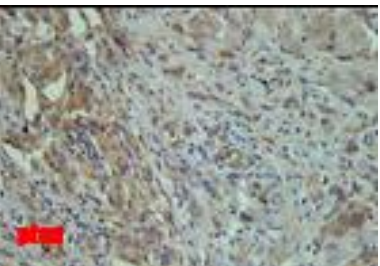
Слика 50. (ПТЕН, 3+, 100x)



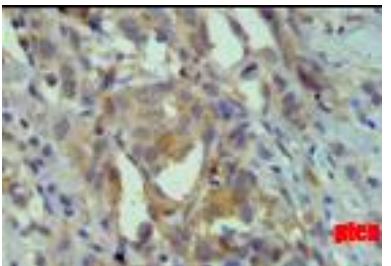
Слика 51. (ПТЕН, 3+, 200x)



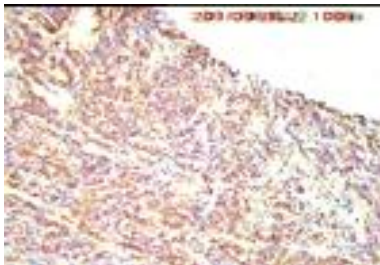
Слика 52. (ПТЕН, 2+, 400x)



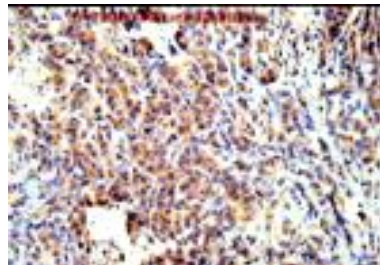
Слика 53. (ПТЕН, 1+, 100x)



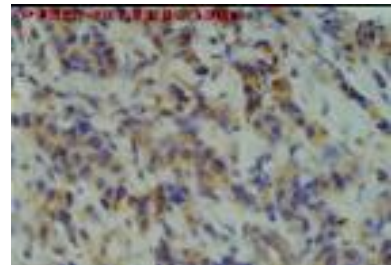
Слика 54. (ПТЕН, 2+, 400x)



Слика 55. (ПТЕН, 2+, 100x)



Слика 56. (ПТЕН, 2+, 100x)



Слика 57. (ПТЕН, 2+, 200x)

ПТЕН

ПТЕН показује двоструку локализацију: у цитоплазми и једру. Реакција у цитоплазми може да буде блага, умерена или изражена (Слике 28,29,30,31,32,33). Реакција у цитоплазми је најчешће хомогена а ређе зрнаста (Слике 31, 32). Блага реакција је такође интрацитоплазматска (Слике 34, 35). Реакција може бити присутна у околним ацинусима (Слика 36). Реакција у једрима је углавном негативна али у неким случајевима у перинуклеарној локализацији је интензивнија (Слике 37, 38, 39). Некада реакција није истог интензитета у свим ћелија. Може се видети слаба реакција (Слика 40) као и фокуси интензивније реакције у једрима (Слике 41,42). Реакција је углавном хомогена у цитоплазми (Слике 43,44). Ћелије у васкуларним просторима такође показују позитивну реакцију (Слика 44). У неким случајевима реакција је и у једрима и у цитоплазми (Слике 45,46,47,48,49). Метастатски депозити такође показују позитивну реакцију на ПТЕН (Слике 50,51,52,53,54). Ћелије са контракционим артефактима због дехидратације такође показују позитивну реакцију (Слике 55,56,57).

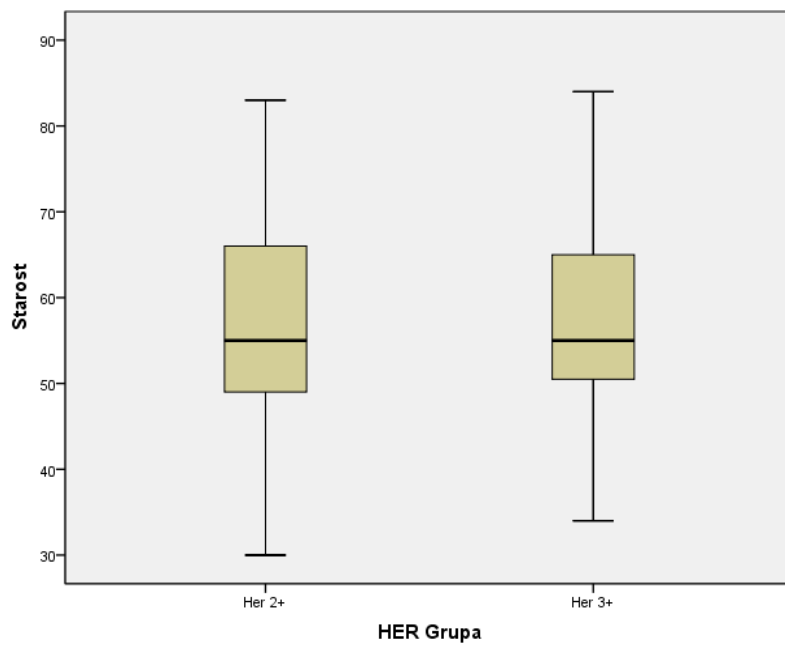
Табела 9. ПТЕН до 1 и преко 1

			ПТЕН до 1 и преко 1		укупно
			ПТЕН 0 и 1	ПТЕН 2 и 3	
ХЕР Група	Хер2, 2+ број	45	23	68	
	% унутар ХЕР Групе	66.2%	33.8%	100.0%	
	Хер2, 3+ број	55	36	91	
	% унутар ХЕР Групе	60.4%	39.6%	100.0%	
Укупно	број	100	59	159	
	% унутар ХЕР Групе	62.9%	37.1%	100.0%	

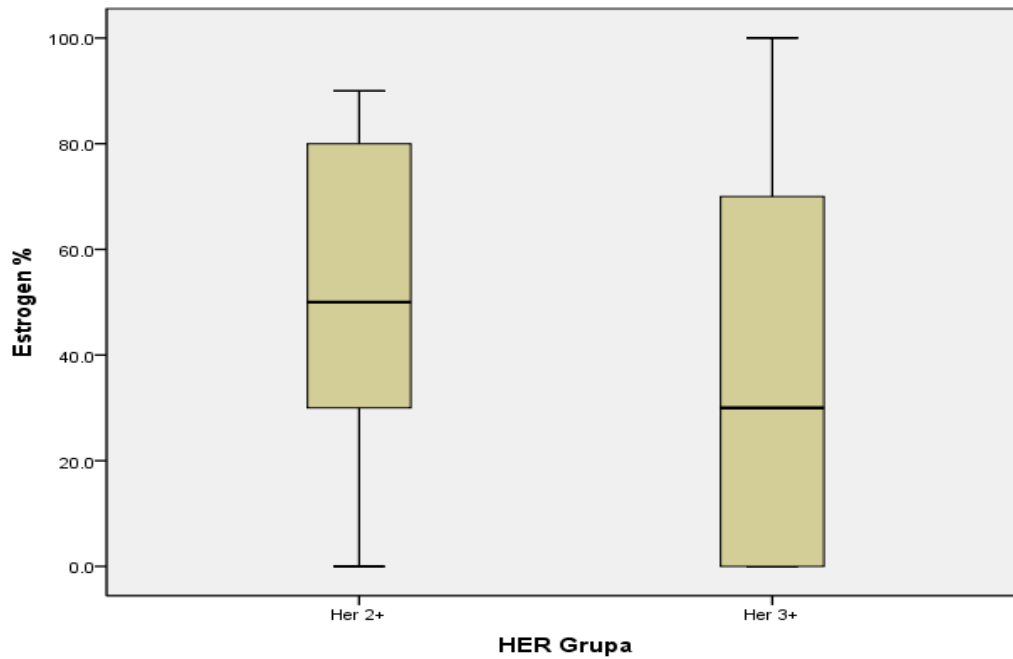
$P=0.459$

Ако се изврши прегруписање позитивних и негативних налаза ПТЕН-а (табела 9), па се под негативан налаз сврстају реакције 0 и 1, а под позитивни сврстају 2 и 3, онда се види да су негативни налази ПТЕН-а у групи 2+ и 3+ врло приближних вредности, што јасно указује на постојање две подгрупе унутар Хер2 позитивне групе (66,2% према 60,4%).

Дијаграм 1. Вредности Хер2, 2+ и 3+ у односу на старост пацијенткиња

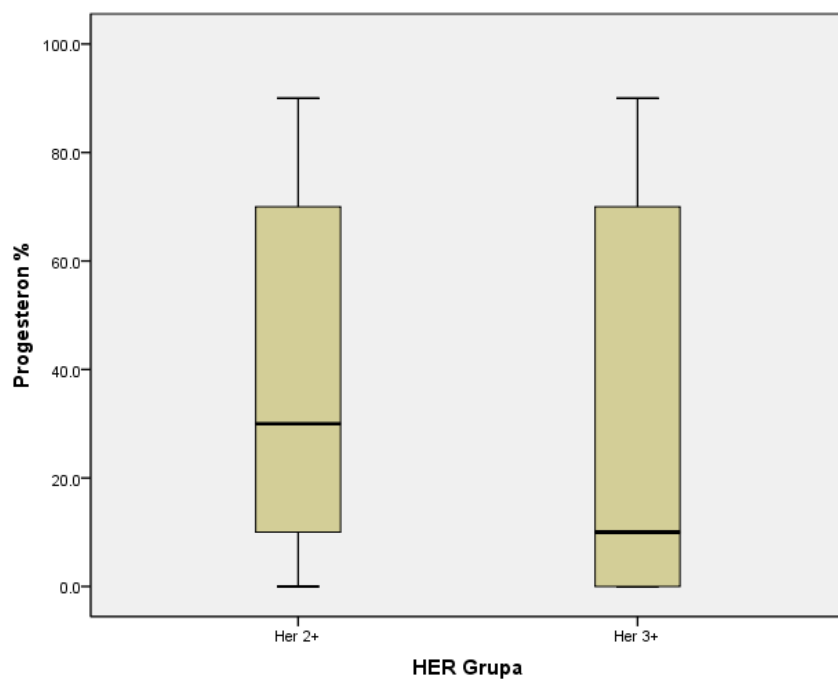


Дијаграм 2. Однос естроген позитивних налаза унутар Хер2,2+ и 3+ подгрупе

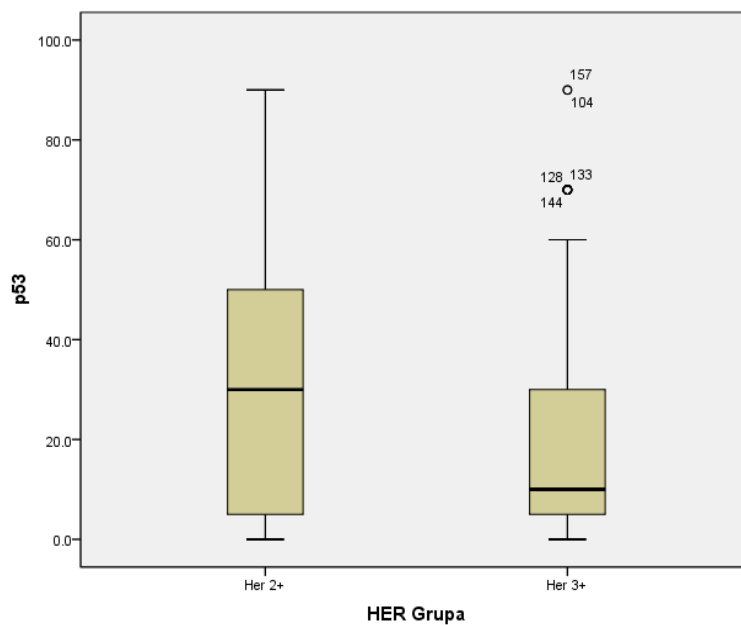


Налаз позитивних рецептора за естроген и прогестерон је приближно исти у обе групе ХЕР2 позитивних пацијенткиња (дијаграм 2, дијаграм 3).

Дијаграм 3. Однос прогестерон позитивних налаза унутар групе Хер2, 2+ и 3+

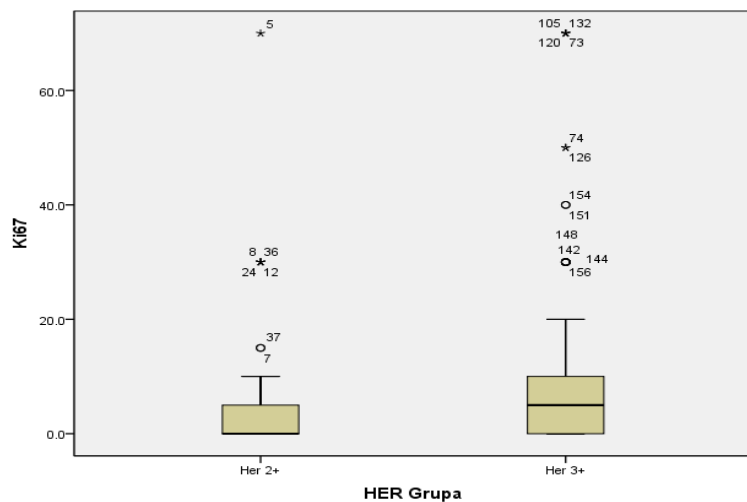


Дијаграм 4. Однос п53 и Хер2, 2+ и 3+

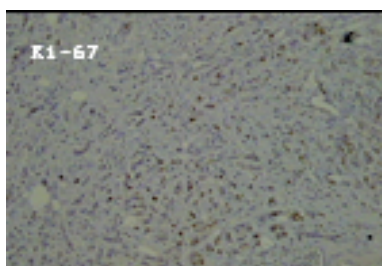


п53 као независан прогностички фактор чешће је био позитиван у ХЕР2, 3+ подгрупи што додатно указује на лошу прогнозу (дијаграм 4).

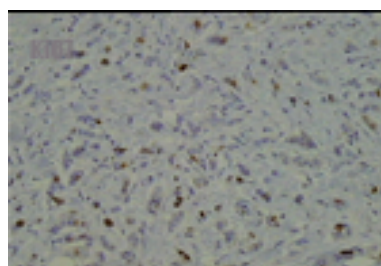
Дијаграм 5. Однос Ки-67 и ХЕР2, 2+ и 3+ погрупе



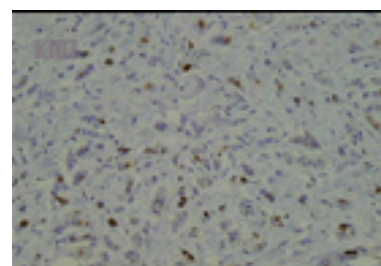
Ки-67 је био негативан у подгрупи Хер2, 2+, док је код половине пацијенткиња са Хер2, 3+ био позитиван а код половине негативан (дијаграм 5). Ово захтева даља истраживања у правцу субгруписања групе Хер2, 3+.



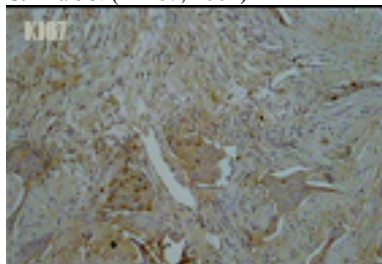
Слика 58. (Ки-67, 100x)



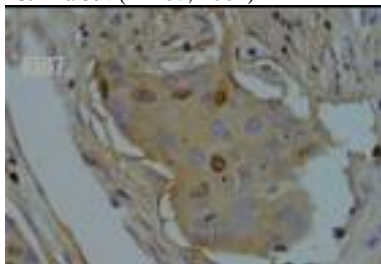
Слика 59. (Ки-67, 200x)



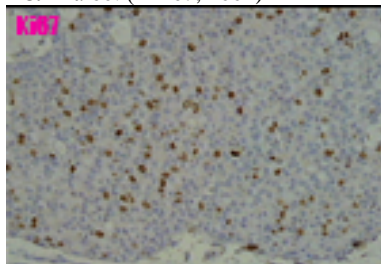
Слика 60. (Ки-67, 200x)



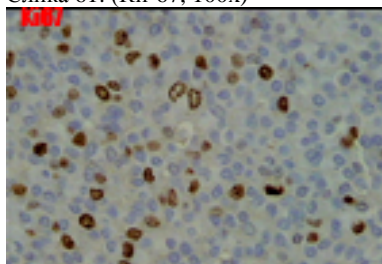
Слика 61. (Ки-67, 100x)



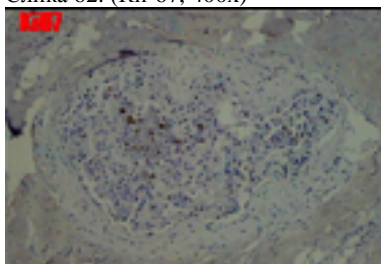
Слика 62. (Ки-67, 400x)



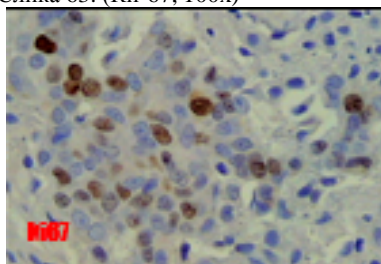
Слика 63. (Ки-67, 100x)



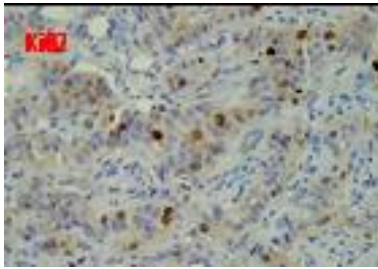
Слика 64. (Ки-67, 400x)



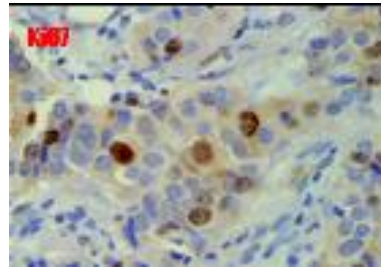
Слика 65. (Ки-67, 100x)



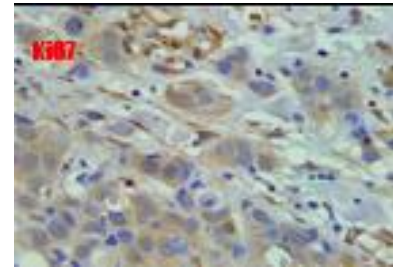
Слика 66. (Ки-67, 400x)



Слика 67. (Ки-67, 200x)



Слика 68. (Ки-67, 400x)



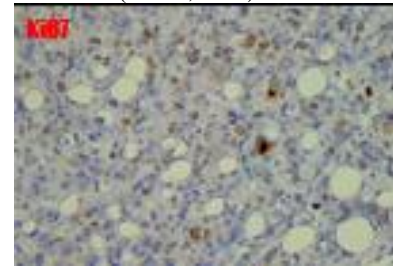
Слика 69. (Ки-67, 400x)



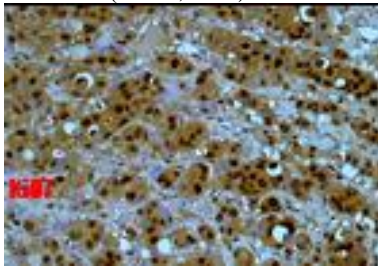
Слика 70. (Ки-67, 100x)



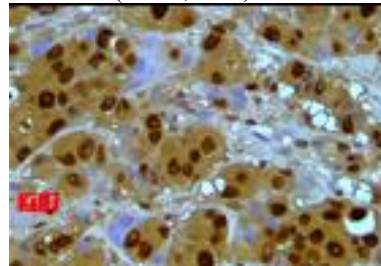
Слика 71. (Ки-67, 100x)



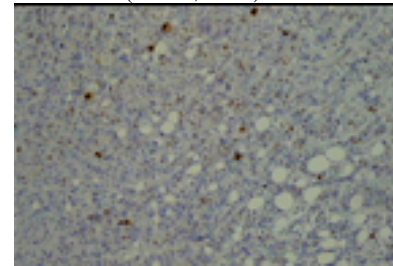
Слика 72. (Ки-67, 200x)



Слика 73. (Ки-67, 200x)



Слика 74. (Ки-67, 400x)



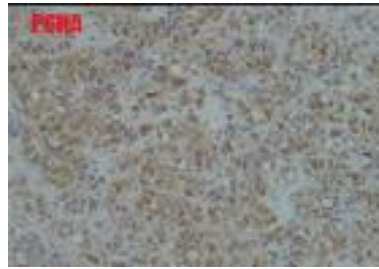
Слика 75. (Ки-67, 100x)

Ки-67

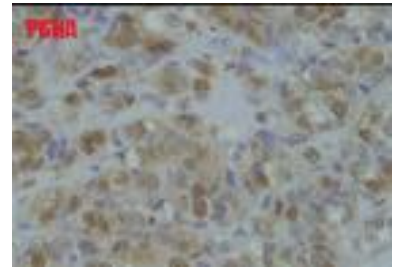
Ки-67 је добар прогностички фактор који указује на степен пролиферативности туморских ћелија. Прегледом препарата види се број позитивних једара, који представља индекс пролиферативности (Слике 58,59,60). Дистрибуција ових ћелија (Ки-67 позитивне) је у туморским ћелијама (Слике 61,62,63). Реакција је у нуклеоплазми док једарца остају негативна (Слика 64). Реакција је присутна и у метастатским ћелијама (Слика 65,66,67,68). Реакција је позитивна и у ендотелним ћелијама (Слика 69). Некада је Ки-67 индекс врло висок (Слика 70,71) што указује на висок пролиферативни потенцијал тумора а некад низак (Слика 72,75). Једарца такође не показују позитивну реакцију (Слике 73,74).



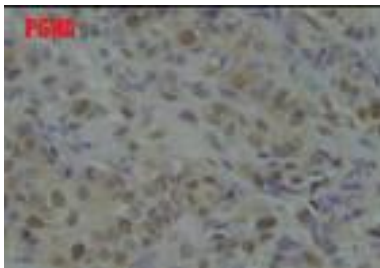
Слика 76. (ПЦНА, 100x)



Слика 77. (ПЦНА, 200x)



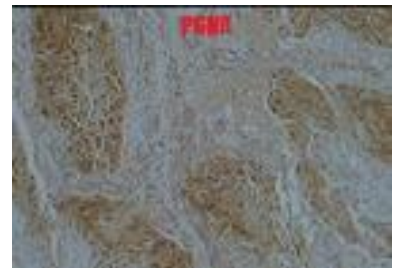
Слика 78. (ПЦНА, 400x)



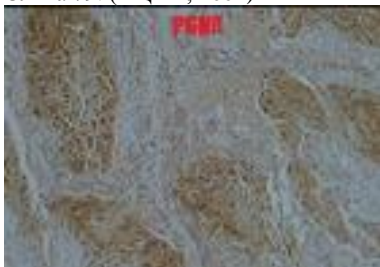
Слика 79. (ПЦНА, 400x)



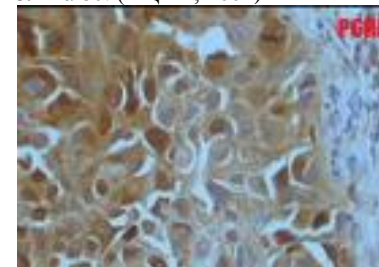
Слика 80. (ПЦНА, 100x)



Слика 81. (ПЦНА, 100x)



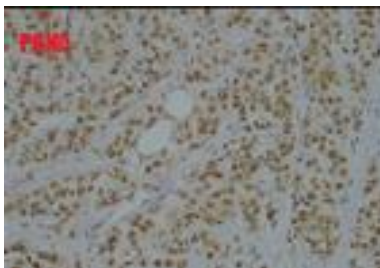
Слика 82. (ПЦНА, 100x)



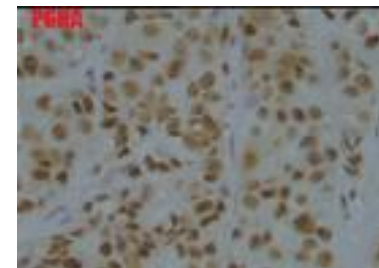
Слика 83. (ПЦНА, 400x)



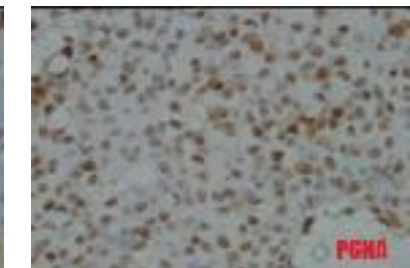
Слика 84. (ПЦНА, 100x)



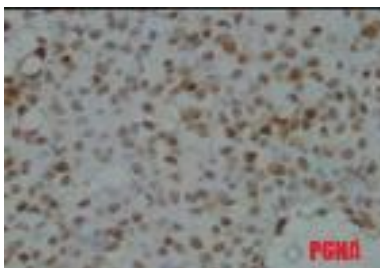
Слика 85. (ПЦНА, 100x)



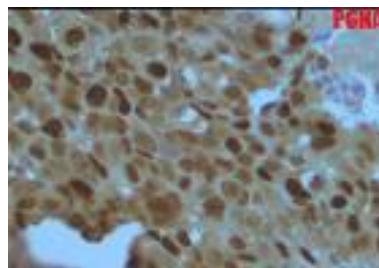
Слика 86. (ПЦНА, 400x)



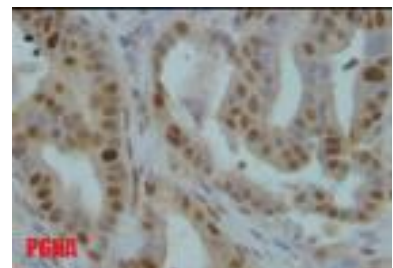
Слика 87. (ПЦНА, 200x)



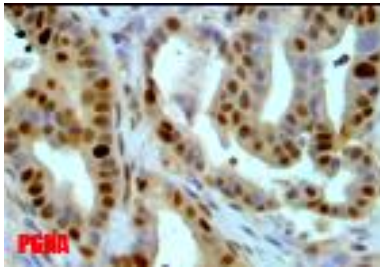
Слика 88. (ПЦНА, 200x)



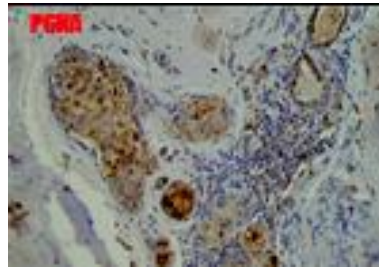
Слика 89. (ПЦНА, 400x)



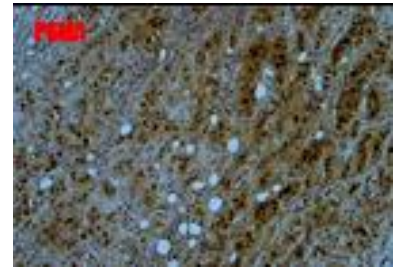
Слика 90. (ПЦНА, 200x)



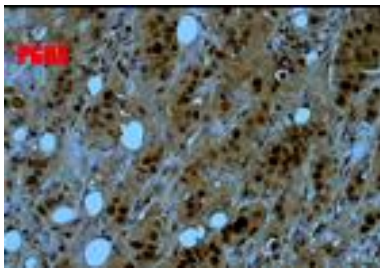
Слика 91. (ПЦНА, 400x)



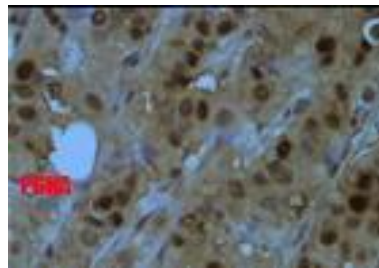
Слика 92. (ПЦНА, 100x)



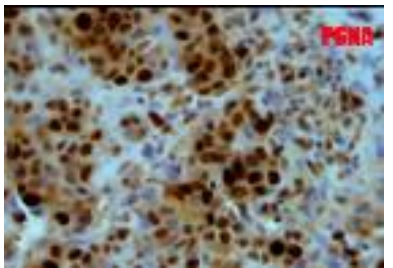
Слика 93. (ПЦНА, 200x)



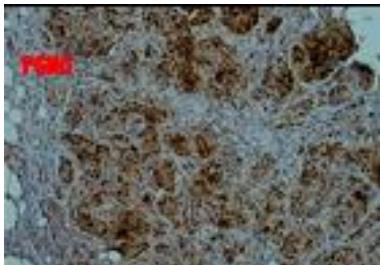
Слика 94. (ПЦНА, 200x)



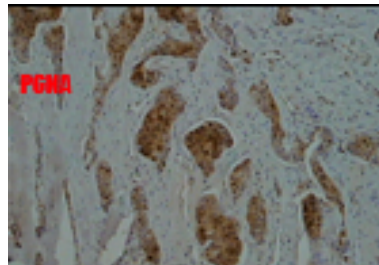
Слика 95. (ПЦНА, 400x)



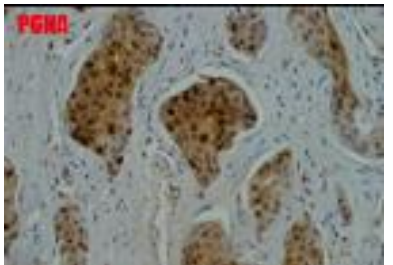
Слика 96. (ПЦНА, 400x)



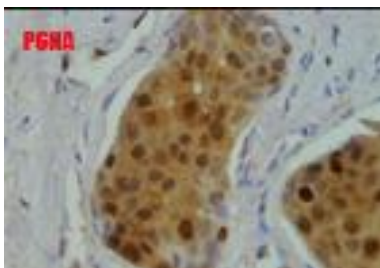
Слика 97. (ПЦНА, 100x)



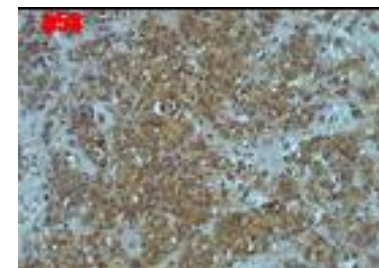
Слика 98. (ПЦНА, 100x)



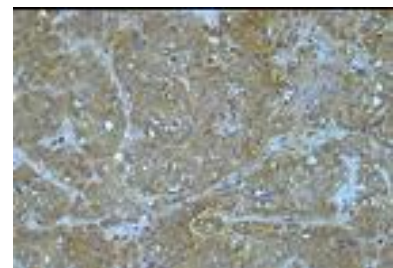
Слика 99. (ПЦНА, 200x)



Слика 100. (ПЦНА, 400x)

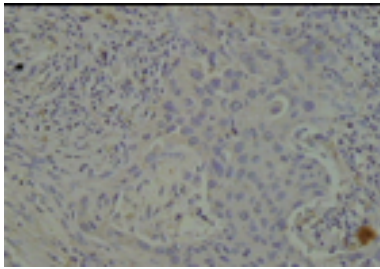


Слика 101. (p53, 100x)

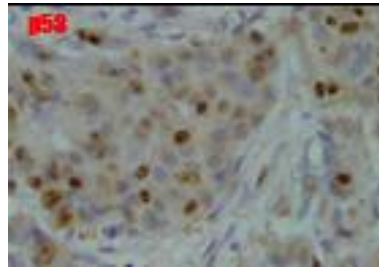


Слика 102. (p53, 100x)

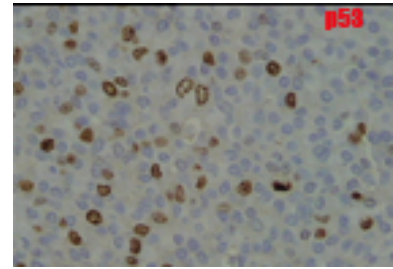
ПЦНА реакција такође показује једра али нормалних ћелија. По интензитету може бити блага до изражена (Слике 76,77,78,79,80,81,82). Реакција је некад позитивна и у цитоплазми (Слике 83) што указује на механизам „цурења“. Реакција у једрима није увек хомогена (Слике 84,85,86,87,88,89). Аденоматозне структуре чешће показују неједнак интензитет нуклеарне реакције (Слике 90,91). Реакција је позитивна и у метастатским депозитима (Слика 92). Интензитет реакције варира од случаја до случаја (Слике 93,94,95,96,97,98,99,100).



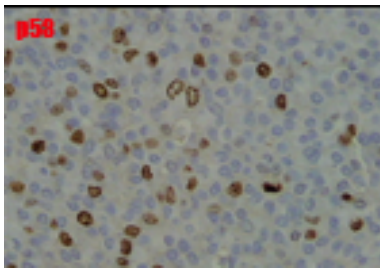
Слика 103. (п53, 100х)



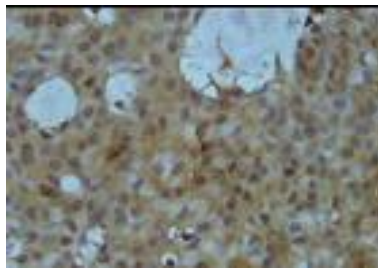
Слика 104. (п53, 400х)



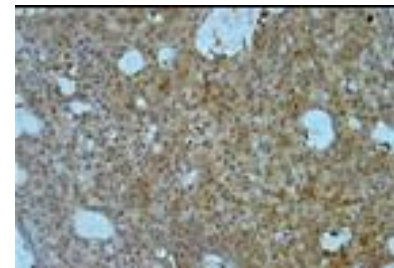
Слика 105. (п53, 400х)



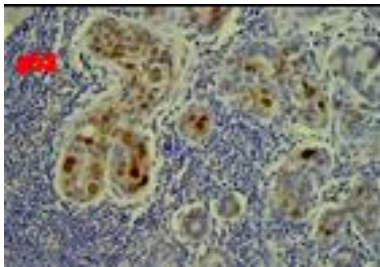
Слика 106. (п53, 400х)



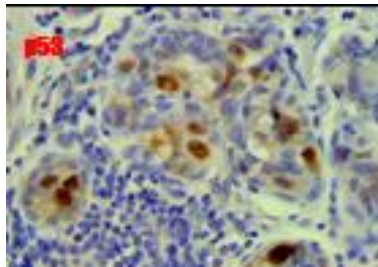
Слика 107. (п53, 200х)



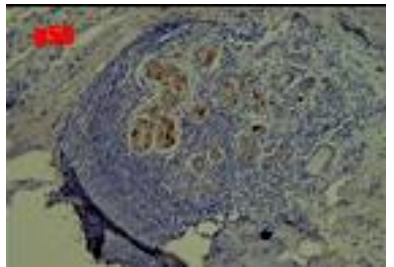
Слика 108. (п53, 100х)



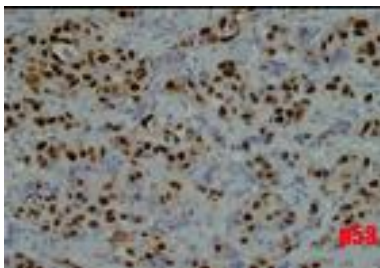
Слика 109. (п53, 100х)



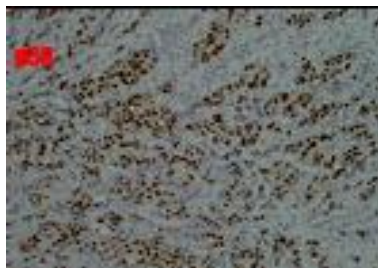
Слика 110. (п53, 200х)



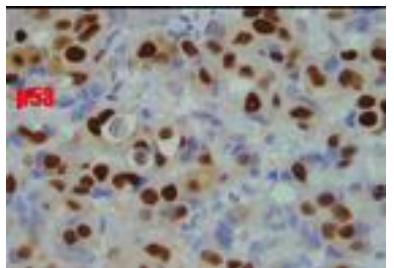
Слика 111. (п53, 63х)



Слика 112. (п53, 200х)



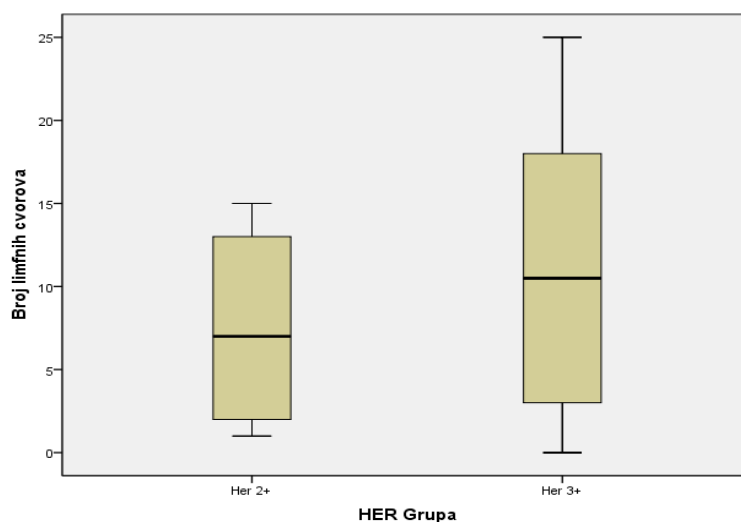
Слика 113. (п53, 100х)



Слика 114. (п53, 400х)

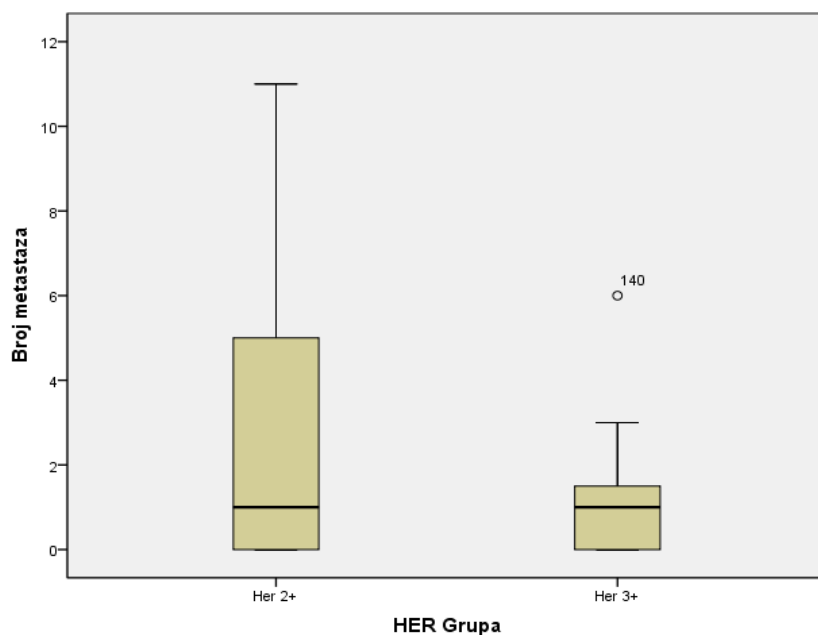
Реакција на п53 је нуклеарна. п53 представља сам за себе лош прогностички фактор. Реакција може бити одсутна до блага (Слике 101,102,103) или процентуално висока (Слике 104,105,106). Некада је реакција хетерогена (Слике 107,108). Реакција може бити позитивна и у метастатским депозитима (Слике 109,110,111), што указује да би било корисно одређивати овај параметар и у метастатским депозитима. У случајевима када је проценат позитивних ћелија висок (Слике 112,113,114) исти треба схватити да ће имати агресивније понашање.

Дијаграм 6. Однос броја одстрањених лимфних чворова и Хер2 групе



Дистрибуција позитивних и негативних лимфних чворова је приближно иста у у Хер2,2+ и Хер2,3+ (дијаграм 6). Позитиван налаз Хер2 је лош прогностички знак и указује на предиспозицију јављања метастаза у регионалним лимфним чворовима. Позитиван налаз Хер2, свеједно да ли се ради о 2+ или 3+ код присутних метастаза потврђује овај значај.

Дијаграм 7. Однос броја метастатских лимфних чворова у Хер2, 2+ и 3+



У подгрупи Хер2,2+ било је више метастатских чворова него у подгрупи Хер2,3+ (дијаграм 7).

Преглед вредности посматраних параметара према ПТЕН групама изражени путем медијане и интерквartilног ранга (Me±IQR)

Табела 10. ПТЕН групе и интерквartilни ранг

		Медијана	интерквartilни ранг
Старост	Без	57	15
	I	54	12
	II	52	16
	III	55	13
Естроген %	Без	35.0	60
	I	50.0	60
	II	50.0	70
	III	60.0	70
Прогестерон %	Без	20.0	70
	I	30.0	60
	II	30.0	70
	III	17.5	50
p53	Без	15.0	25
	I	10.0	50
	II	20.0	45
	III	30.0	65
ПЦНА	Без	70.0	20
	I	90.0	20
	II	90.0	20
	III	70.0	20
Ки67	Без	.0	5
	I	5.0	10
	II	5.0	10
	III	5.0	25
Број лимфних чворова	Без	6	6
	I	11	9
	II	14	15
	III	3	7
Број метастаза	Без	1	2
	I	1	1
	II	0	6
	III	1	0

На основу Крускал-Валисовог теста разлика у групама ПТЕН постоји једино у случају Ки67 и то да је медијана значајно нижа код групе ПТЕН 0 (без птена) у односу на остале групе (табела 10, табела 11).

Табела 11. Однос горе наведених параметара

	Старост	Естроген %	Прогестерон %	p53	ПЦНА	Ки67	Број лимфних цворова	Број метастаза
Цхи-сquares	7.297	.495	1.601	5.534	6.564	20.481	4.013	.447
df	3	3	3	3	3	3	3	3
p	.063	.920	.659	.137	.087	.000	.260	.930

Нема статистички значајне разлике у страни дојке (табела 12)

Табела 12. Налаз у односу на страну дојке

			Страна дојке		укупно
			Десно	Лево	
ПТЕН	Без	Број	41	32	73
		% унутар ПТЕН	56.2%	43.8%	100.0%
I		Број	13	14	27
		% унутар ПТЕН	48.1%	51.9%	100.0%
II		Број	17	16	33
		% унутар ПТЕН	51.5%	48.5%	100.0%
III		Број	13	13	26
		% унутар ПТЕН	50.0%	50.0%	100.0%
Укупно		Број	84	75	159
		% унутар ПТЕН	52.8%	47.2%	100.0%

$P=0.880$

Тип тумора и групе ПТЕН исказује статистички значајну разлику, с тим да је израженији НОС у случајевима категорија ПТЕН I и III (табела 13). Лобуларни тип тумора је израженији у групама ПТЕН 0 и II.

Табела 13. Однос хистолошког типа тумора и налаза ПТЕН-а

Кростаб

			Тип тумора		Укупно
			НОС	лобуларни	
ПТЕН	Без	Број	44	29	73
		% унутар ПТЕН	60.3%	39.7%	100.0%
I	Број	Број	22	5	27
		% унутар ПТЕН	81.5%	18.5%	100.0%
II	Број	Број	21	12	33
		% унутар ПТЕН	63.6%	36.4%	100.0%
III	Број	Број	22	4	26
		% унутар ПТЕН	84.6%	15.4%	100.0%
Укупно	Број	Број	109	50	159
		% унутар ПТЕН	68.6%	31.4%	100.0%

$P=0.048$

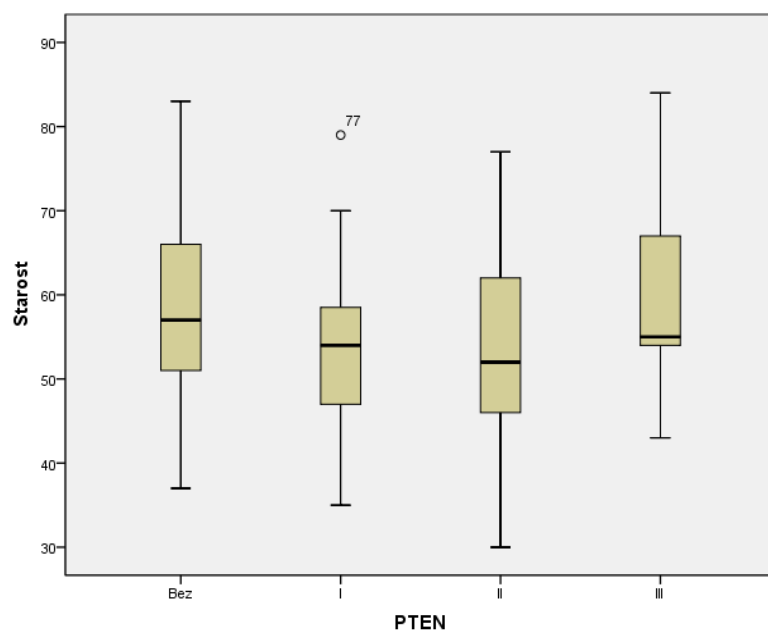
Однос ПТЕН категорије и Хер2 група уочава се да је у случајевима без ПТЕН-а чешћа израженост Хер2, 2+ групе док Хер2, 3+ група је се занчајно повећавала са повећањем категорије ПТЕН (табела 14).

Табела 14. Однос ПТЕН-а и Хер2 (2+ и 3+)

			ХЕР Група		укупно
			Хер 2+	Хер 3+	
ПТЕН	Без	Број	40	33	73
		% унутар ПТЕН	54.8%	45.2%	100.0%
I	број	број	5	22	27
		% унутар ПТЕН	18.5%	81.5%	100.0%
II	број	број	14	19	33
		% унутар ПТЕН	42.4%	57.6%	100.0%
III	број	број	9	17	26
		% унутар ПТЕН	34.6%	65.4%	100.0%
Укупно	Број	Број	68	91	159
		% унутар ПТЕН	42.8%	57.2%	100.0%

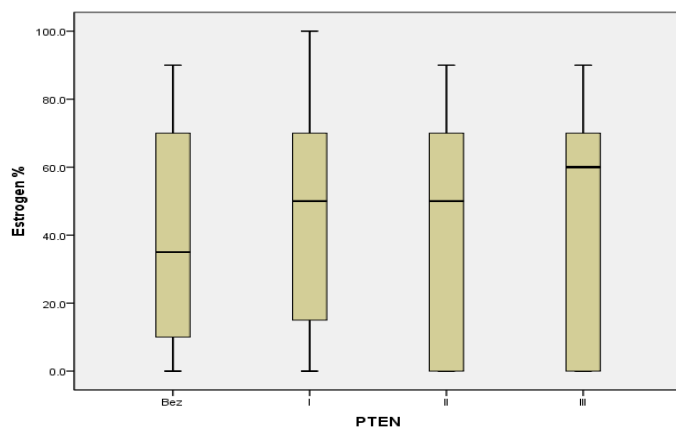
$P=0.009$

Дијаграм 8. Однос година пацијенткиња (старост) и ПТЕН-а



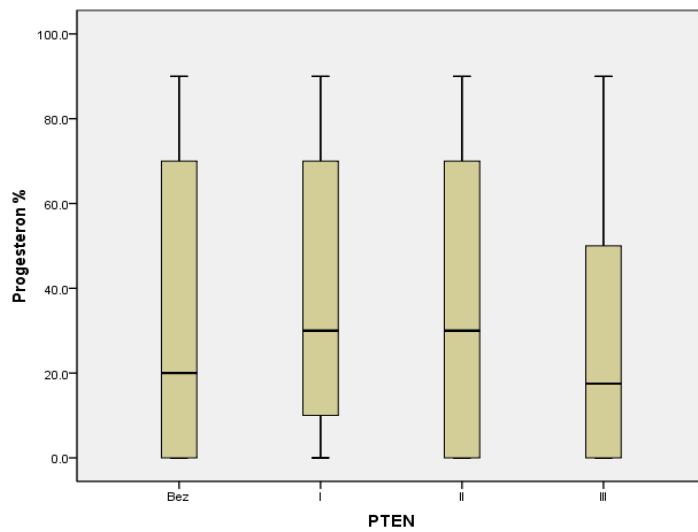
Позитивност ПТЕН-а је иста у свим старосним групама (дијаграм 8).

Дијаграм 9. Однос рецептора за естроген и ПТЕН-а



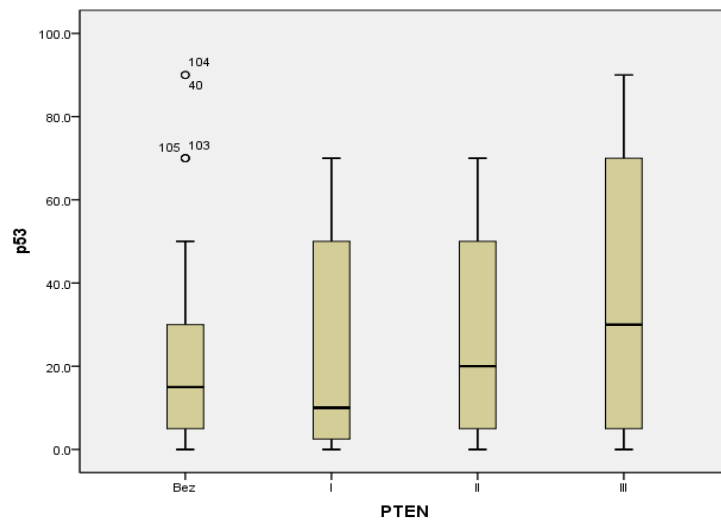
Учесталост ПТЕН-а је иста код свих естроген рецептор позитивних група (дијаграм 9).

Дијаграм 10. Однос рецептора за прогестерон и ПТЕН-а



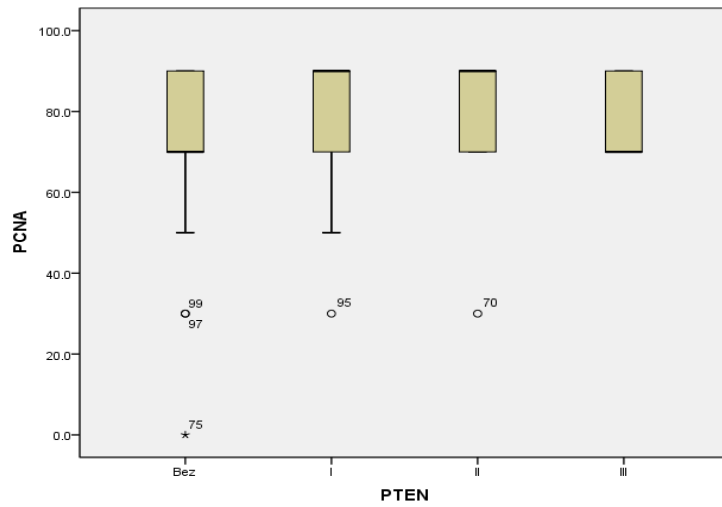
Учесталост ПТЕН-а је иста код свих прогестерон позитивних група (дијаграм 10).

Дијаграм 11. Однос p53 и ПТЕН



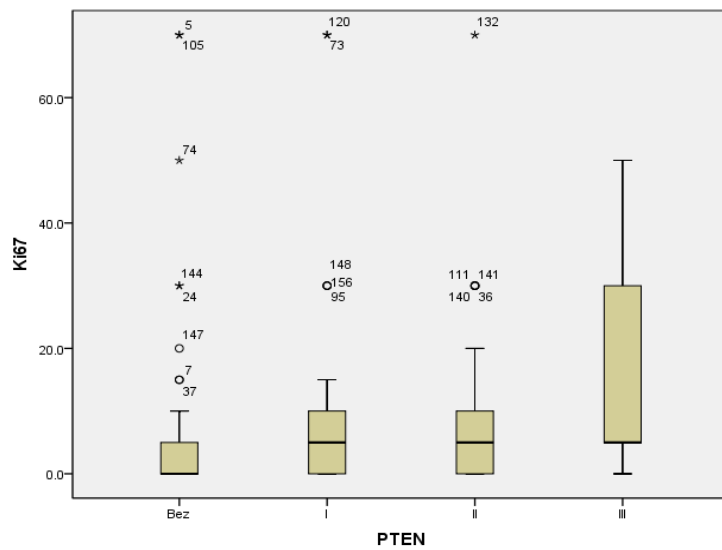
p53 је процентуално чешћи код ПТЕН II и III. Ово указује на паралелну позитивност ова два фактора (дијаграм 11).

Дијаграм 12. Однос ПЦНА и ПТЕН



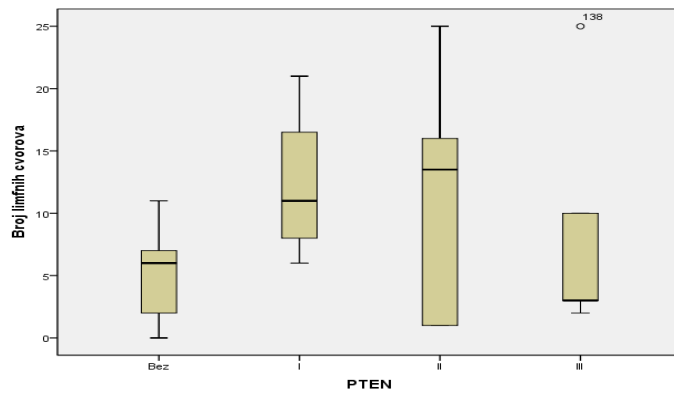
ПЦНА је позитиван код свих група позитивног ПТЕН-а (дијаграм 12).

Дијаграм 13. Однос Ки-67 и ПТЕН



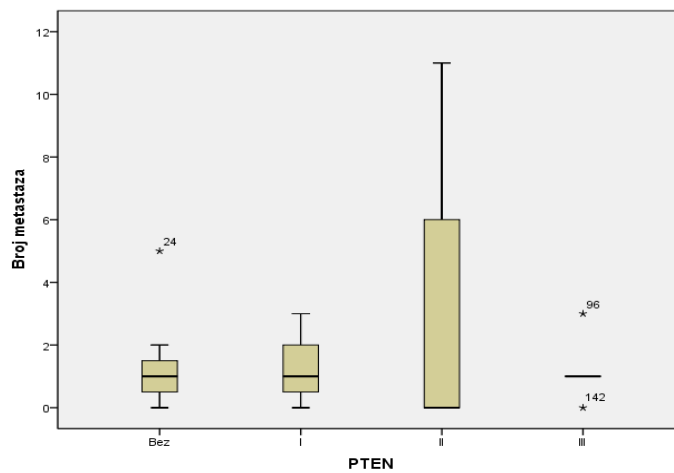
Ки-67 показује једнаку учесталост код све три групе ПТЕН-а (дијаграм 13).

Дијаграм 14. Однос броја анализираних лимфних чворова и ПТЕН-а



ПТЕН је био позитиван у анализираним лимфним чворовима са и без метастаза (дијаграм 14, дијаграм 15).

Дијаграм 15. Однос броја метастатских лимфних чворова и ПТЕН-а



Резултати добијени посматрањем група без ПТЕН-а и са било којом категоријом ПТЕН тј. са појавом ПТЕН-а дат је путем медијане и интеркварталног ранга ($Me \pm IQR$) (табела 15).

Табела 15. Однос ПТЕН-а и других параметара

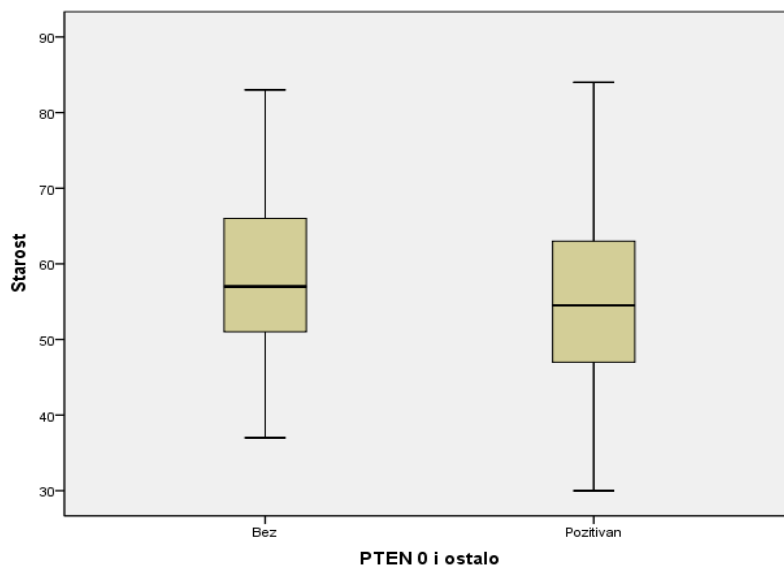
		ПТЕН 0 и остало	
		Медијана	интерквартални ранг
Старост	Без	57	15
	Позитиван	55	16
Естроген %	Без	35.0	60
	Позитиван	50.0	70
Прогестерон %	Без	20.0	70
	Позитиван	30.0	70
p53	Без	15.0	25
	Позитиван	15.0	45
ПЦНА	Без	70.0	20
	Позитиван	90.0	20
Ки67	Без	.0	5
	Позитиван	5.0	10
Број лимфних чворова	Без	6	6
	Позитиван	12	13
Број метастаза	Без	1	2
	Позитиван	1	3

Упоредњујући посматране групе у односу на дате променљиве (табела 16), закључује се да постоји статистички значајна разлика без и са ПТЕН-ом код варијабли ПЦНА и Ки-67 ($p=0.019$ и $p=0.000$) (дијаграм 20, дијаграм 21), где је исказано повећање резултата са позитивним стањем ПТЕН-а. Друге променљиве нису се значајно међусобно разликовале (дијаграм 16, дијаграм 17, дијаграм 18, дијаграм 19, дијаграм 22, дијаграм 23).

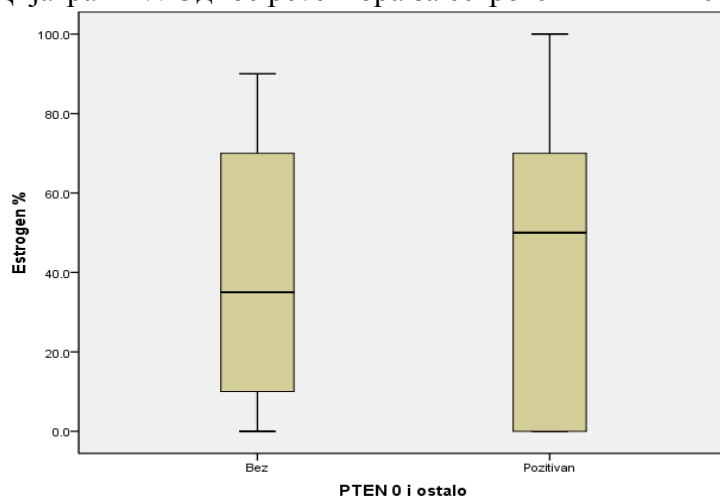
Табела 16. Однос свих варијабли у односу на ПТЕН

	Старост	Естроген %	Прогестерон %	п53	ПЦНА	Ки67	Број лимфних цворова	Број метастаза
З	-1.804	-.135	-.026	-1.505	-2.340	-4.167	-1.769	-.274
п	.071	.892	.979	.132	.019	.000	.077	.784

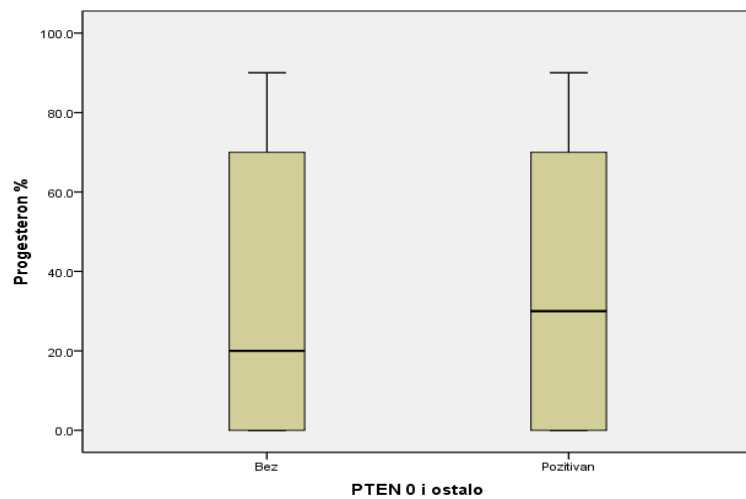
Дијаграм 16. Однос година старости и ПТЕН-а



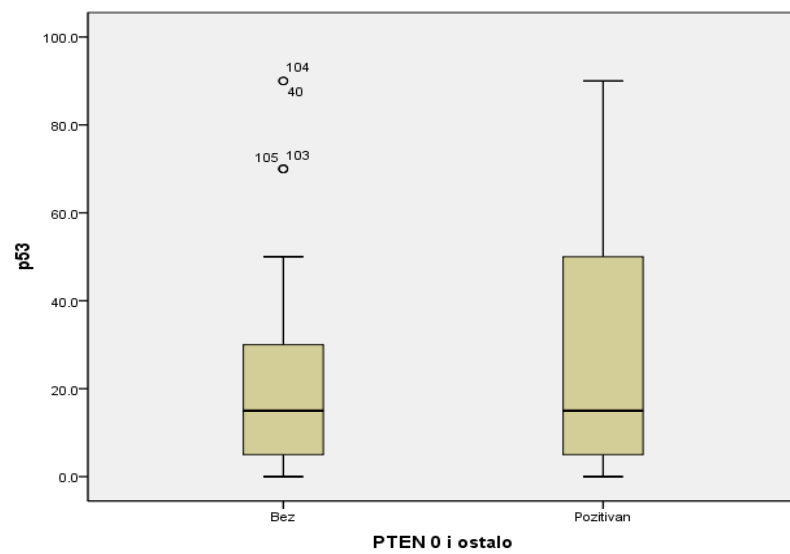
Дијаграм 17. Однос ресептора за естроген и ПТЕН 0



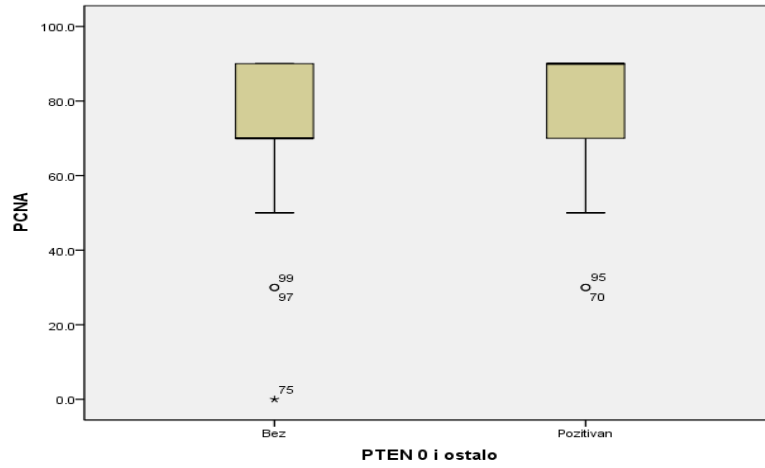
Дијаграм 18. Однос рецептора за прогестерон и ПТЕН 0 и остало



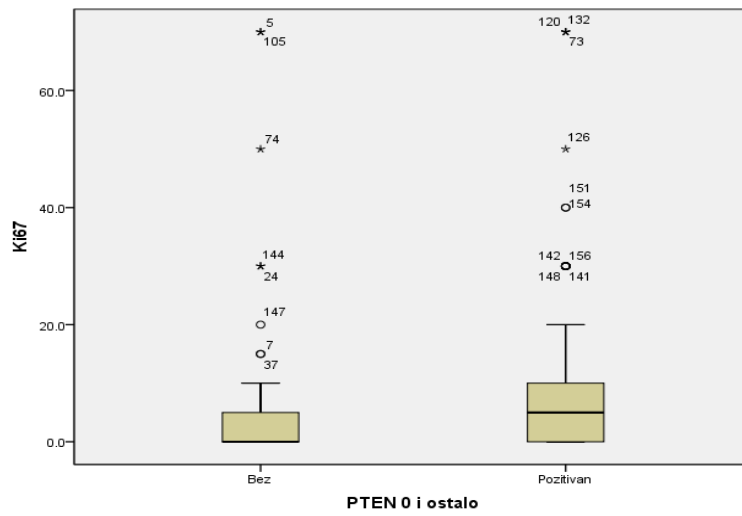
Дијаграм 19. Однос p53 и ПТЕН 0 и остало



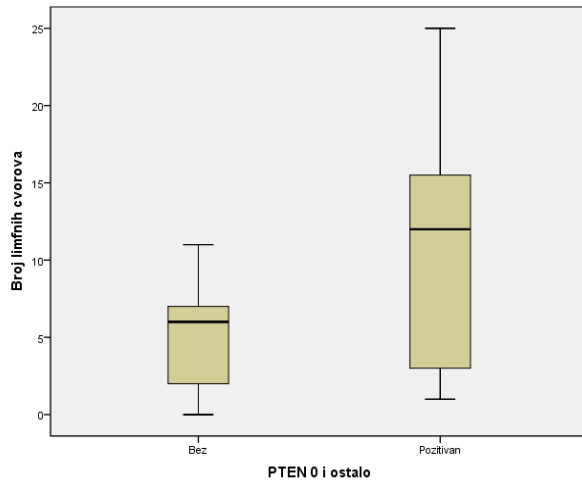
Дијаграм 20. Однос ПЦНА и ПТЕН 0



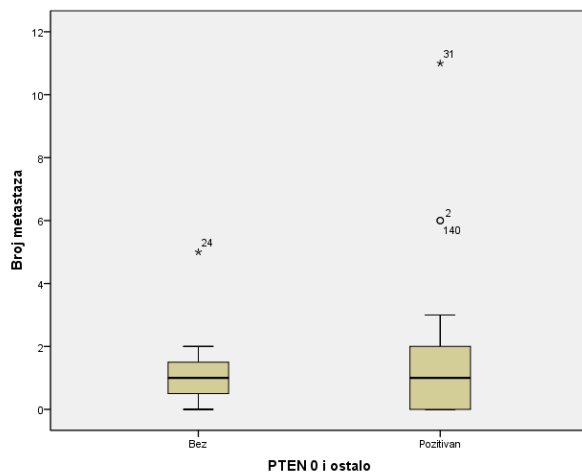
Дијаграм 21. Однос КИ67 и ПТЕН 0 и остало



Дијаграм 22. Однос броја лимфних чворова и ПТЕН 0 и остало



Дијаграм 23. Однос броја метастаза и ПТЕН 0



Повезаност стране дојке и појаве ПТЕН-а није статистички значајно утврђена веза (табела 17).

Табела 17. Однос ПТЕН-а и стране дојке

			Страна дојке		укупно
			Десно	Лево	
ПТЕН 0 и остало	Без	Број	41	32	73
		% унутар ПТЕН 0 и остало	56.2%	43.8%	100.0%
	Позитиван	Број	43	43	86
		% унутар ПТЕН 0 и остало	50.0%	50.0%	100.0%
Укупно		Број	84	75	159
		% унутар ПТЕН 0 и остало	52.8%	47.2%	100.0%

$p=0.438$

Појава ПТЕН-а у односу на тип тумора показује статистички значајну разлику тј. више је лобуларних у случајевима без ПТЕН-а док код позитивног резултата ПТЕН-а више је изражен НОС тип тумора (табела 18).

Табела 18. Однос ПТЕН-а и типа тумора

			Тип тумора		Укупно
			НОС	лобуларни	
ПТЕН 0 и остало	Без	Број	44	29	73
		% унутар ПТЕН 0 и остало	60.3%	39.7%	100.0%
	Позитиван	Број	65	21	86
		% унутар ПТЕН 0 и остало	75.6%	24.4%	100.0%
Укупно		Број	109	50	159
		% унутар ПТЕН 0 и остало	68.6%	31.4%	100.0%

$P=0.038$

Повезаност постојања ПТЕН-а и типа групе Хер2 указује да постоји статистички значајна повезаност и то тако што је у случајевима када је ПТЕН позитиван биће више Хер2, 3+ и обрнуто без ПТЕН-а биће више Хер2, 2+ (табела 19). ПТЕН је чешће био позитиван код Хер2, 3+ (67,4%), док је код Хер2, 2+ био ређи (32,6%). Код Хер2, 2+ ПТЕН је био негативан у 54,8%, што значи да би код ове групе треба радити додатна ИХХ испитивања на ЦИШ И ФИШ да се види има ли амплификације. Посматрајући обе групе може се рећи да ХЕР2,2+ и ХЕР2,3+ имају подгрупе које су ПТЕН негативне.

Табела 19. Однос Хер2 подгрупа и ПТЕН-а

			ХЕР Група		укупно
			Хер2, 2+	Хер2, 3+	
ПТЕН 0 и остало	Без	Број	40	33	73
		% унутар ПТЕН 0 и остало	54.8%	45.2%	100.0%
	Позитиван	Број	28	58	86
		% унутар ПТЕН 0 и остало	32.6%	67.4%	100.0%
Укупно		Број	68	91	159
		% унутар ПТЕН 0 и остало	42.8%	57.2%	100.0%

$P=0.005$

Корелације у групи Хер2, 2+ су биле исказане само између параметара прогестерона и естрогена $r=0.648$; $p=0.000$. У групи Хер2, 3+ била је исказана повезаност старости и ПЦНА параметра и то кроз негативну корелацију $r=-0.233$; $p=0.026$ тако да са старашћу у групи Хер2, 3+ долази до смањења вредности ПЦНА. Хер2, 3+ група такође исказује значајне линеарне везе између естрогена са једне стране и прогестерона и п53 са друге стране (табела 20). Осим ове корелације постоји изначајна веза између параметара ПЦНА и Ки-67.

На основу ових резултата уочава се да Хер2, 2+ група нема значајних линеарних веза између параметара, док се за параметре у групи Хер2, 3+ може рећи да су међусобно повезани са доста релатираних веза (што непосредних што посредних).

Табела 20. Корелације

ХЕР Група			Старост	Естроген %	Прогестерон %	п53	ПЦНА	Ки-67	
Спеарман'с рхо	Хер2, 2+	Старост	Корелација Коефицијент	1.000	.111	-.109	-.026	.062	-.026
			Сиг. (2-таилед)	.	.366	.377	.835	.613	.834
			Н	68	68	68	68	68	68
		Естроген %	Корелација Коефицијент	.111	1.000	.648**	.002	.080	-.016
			Сиг. (2-таилед)	.366	.	.000	.987	.518	.895
			Н	68	68	68	68	68	68
		Прогестерон %	Корелација Коефицијент	-.109	.648**	1.000	-.113	.093	.037
			Сиг. (2-таилед)	.377	.000	.	.360	.452	.762
			Н	68	68	68	68	68	68
		п53	Корелација Коефицијент	-.026	.002	-.113	1.000	.128	.174
			Сиг. (2-таилед)	.835	.987	.360	.	.298	.157
			Н	68	68	68	68	68	68
	ПЦНА	Корелација Коефицијент	.062	.080	.093	.128	1.000	-.158	
		Сиг. (2-таилед)	.613	.518	.452	.298	.	.197	
		Н	68	68	68	68	68	68	
	Ки-67	Корелација Коефицијент	-.026	-.016	.037	.174	-.158	1.000	
		Сиг. (2-таилед)	.834	.895	.762	.157	.197	.	
		Н	68	68	68	68	68	68	

Хер2,3+	Старост	Корелација Коефицијент	1.000	-.074	-.132	.019	-.233*	-.041
		Сиг. (2-таилед) Н	.	.486	.211	.860	.026	.701
Естроген %	Корелација Коефицијент	Сиг. (2-таилед) Н	91	91	91	91	91	91
		Корелација Коефицијент	-.074	1.000	.842**	-	.119	.024
Прогестерон %	Корелација Коефицијент	Сиг. (2-таилед) Н	.486	.	.000	.235*	.261	.824
		Корелација Коефицијент	-.132	.842**	1.000	-	.011	-.090
п53	Корелација Коефицијент	Сиг. (2-таилед) Н	.211	.000	.	.030	.919	.396
		Корелација Коефицијент	.019	-.235*	-.227*	1.00	.157	.145
ПЦНА	Корелација Коефицијент	Сиг. (2-таилед) Н	.860	.025	.030	.	.137	.169
		Корелација Коефицијент	-.233*	.119	.011	.157	1.000	.533*
Ки67	Корелација Коефицијент	Сиг. (2-таилед) Н	.026	.261	.919	.137	.	.000
		Корелација Коефицијент	-.041	.024	-.090	.145	.533**	1.000
Хер2,3+	Корелација Коефицијент	Сиг. (2-таилед) Н	.701	.824	.396	.169	.000	.
		Корелација Коефицијент	-.041	.024	-.090	.145	.533**	1.000

** . Корелација је сигнификантна на нивоу 0.01 (п).

* . Корелација је сигнификантна на бнивоу 0.05 (п).

Што се тиче линеарних веза у оквиру групе без ПТЕН-а ситуација је слична као и у Хер2,2+ групи, где веза постоји једино између естрогена и прогестерона, с тим да је она нешто јача ($p=0.807$; $\pi=0.000$)

Корелационе везе у оквиру ПТЕН позитивне групе су сличне Хер2,3 групи и то тако што постоји значајна корелација прогестерона са старошћу и естрогеном, као и значајна веза између ПЦНА и Ки67 (табела 21).

Табела 21. Корелације

ПТЕН 0 и остало			Старос т	Естроге н %	Прогестеро н %	п53	ПЦН А	Ки- 67
Спеарман' БЕЗ с рхо	Старост	Корелација Коефицијен т	1.000	.030	-.002	-.083	-.156	-.034
		Сиг. (2- таилед)	.	.799	.983	.487	.187	.775
		Н	73	73	73	73	73	73
	Естроген %	Корелација Коефицијен т	.030	1.000	.807**	-.092	.182	-.090
		Сиг. (2- таилед)	.799	.	.000	.437	.123	.450
		Н	73	73	73	73	73	73
	Прогестеро н %	Корелација Коефицијен т	-.002	.807**	1.000	-.162	.068	-.152
		Сиг. (2- таилед)	.983	.000	.	.170	.567	.199
		Н	73	73	73	73	73	73
	п53	Корелација Коефицијен т	-.083	-.092	-.162	1.00 0	.139	.088
		Сиг. (2- таилед)	.487	.437	.170	.	.242	.459
		Н	73	73	73	73	73	73
	ПЦНА	Корелација Коефицијен т	-.156	.182	.068	.139	1.000	.071
		Сиг. (2- таилед)	.187	.123	.567	.242	.	.549
		Н	73	73	73	73	73	73
	Ки67	Корелација Коефицијен т	-.034	-.090	-.152	.088	.071	1.00 0
		Сиг. (2- таилед)	.775	.450	.199	.459	.549	.
		Н	73	73	73	73	73	73
ПОЗИТИВА Н	Старост	Корелација Коефицијен т	1.000	-.031	-.217*	.093	-.042	.093
		Сиг. (2- таилед)	.	.778	.044	.394	.702	.396
		Н	86	86	86	86	86	86
	Естроген %	Корелација Коефицијен т	-.031	1.000	.785**	-.090	.111	-.092
		Сиг. (2- таилед)	.778	.	.000	.409	.309	.397
		Н						

	Н	86	86	86	86	86	86
Прогестерон %	Корелација Коефицијент	-.217*	.785**	1.000	-.119	.073	-.101
	Сиг. (2-таилед)	.044	.000	.	.275	.504	.357
	Н	86	86	86	86	86	86
п53	Корелација Коефицијент	.093	-.090	-.119	1.000	.103	.000
	Сиг. (2-таилед)	.394	.409	.275	.	.347	.999
	Н	86	86	86	86	86	86
ПЦНА	Корелација Коефицијент	-.042	.111	.073	.103	1.000	.259*
	Сиг. (2-таилед)	.702	.309	.504	.347	.	.016
	Н	86	86	86	86	86	86
Ки67	Корелација Коефицијент	.093	-.092	-.101	.000	.259*	1.000
	Сиг. (2-таилед)	.396	.397	.357	.999	.016	.
	Н	86	86	86	86	86	86

** . Корелација је сигнификантна на нивоу 0.01 (п).

* . Корелација је сигнификантна на нивоу 0.05 (п).

Због горе наведених резултата извршена је подела на 4 групе (Хер2,2+ без ПТЕН-а, Хер2, 2+ и ПТЕН позитивни, Хер2, 3+ без ПТЕН-а, Хер2, 3+ и ПТЕН позитивни)

Корелације у групи Хер2,2+ и без ПТЕН-а показује да једина корелациона веза постоји између прогестероне и естрогена и то слабијег карактера мада статистички значајна.

Иста ситуација је и у оквиру групе Хер2,2+ и ПТЕН позитивне групе где се такође на сличном нивоу исказује корелација између естрогена и прогестерона.

Група Хер2,3+ без ПТЕН-а показује јаку везу између естрогена и прогестерона али такође се појављује и корелација између ПЦНА и Ки67 као активатора у оквиру ове групе.

Слична ситуација је и у групи Хер2, 3+ и ПТЕН позитивној с тим да се у везу са прогестероном укључује и старост као негативно корелисану величину.

На основу овога се може закључити да су интеракције у групи Хер2,2+ слабе између параметара и да се не остварују међусобна деловања на одвијање самог процеса

			Естроген %	Корелација Коефицијент Сиг. (2-таилед) Н	.364 .057 28	1.000 .28	.651** .000 28	-.074 .707 28	.126 .523 28	.031 .876 28
			Прогестерон %	Корелација Коефицијент Сиг. (2-таилед) Н	-.158 .421 28	.651** .000 28	1.000 .385 28	-.171 .236 28	.231 .161 28	.272 .161 28
			п53	Корелација Коефицијент Сиг. (2-таилед) Н	.243 .214 28	-.074 .707 28	-.171 .385 28	1.000 .461 28	.145 .957 28	.011 .957 28
			ПЦНА	Корелација Коефицијент Сиг. (2-таилед) Н	.154 .434 28	.126 .523 28	.231 .236 28	.145 .461 28	1.000 .715 28	- .072 28
			Ки67	Корелација Коефицијент Сиг. (2-таилед) Н	.072 .714 28	.031 .876 28	.272 .161 28	.011 .957 28	-.072 .715 28	1.00 .715 28
Х е р 2 3+	Без	Сpearman's rho	Старост	Корелација Коефицијент Сиг. (2-таилед) Н	1.000 .095 33	.095 .598 33	.140 .436 33	.020 .914 33	-.245 .169 33	- .689 33
			Естроген %	Корелација Коефицијент Сиг. (2-таилед) Н	.095 .598 33	1.000 .33	.905** .000 33	-.219 .221 33	.007 .970 33	.069 .703 33
			Прогестерон %	Корелација Коефицијент Сиг. (2-таилед) Н	.140 .436 33	.905** .000 33	1.000 .33	-.325 .065 33	-.112 .535 33	- .837 33
			п53	Корелација Коефицијент Сиг. (2-таилед)	.020 .914	-.219 .221	-.325 .065	1.000 .903	.022 .593	.097 .593

			Н	33	33	33	33	33	33
		ПЦНА	Корелација Коефицијент	-.245	.007	-.112	.022	1.000	.682*
			Сиг. (2- таилед)	.169	.970	.535	.903	.	.000
			Н	33	33	33	33	33	33
		Ки67	Корелација Коефицијент	-.072	.069	-.037	.097	.682**	1.00
			Сиг. (2- таилед)	.689	.703	.837	.593	.000	.
			Н	33	33	33	33	33	33
Позитивна	Сpearman's	Старост	Корелација Коефицијент	1.000	-.172	-.261*	.058	-.148	.064
Н	rho		Сиг. (2- таилед)	.	.196	.048	.667	.268	.633
			Н	58	58	58	58	58	58
		Естроген %	Корелација Коефицијент	-.172	1.000	.808**	-.236	.150	-
			Сиг. (2- таилед)	.196	.	.000	.075	.263	.039
			Н	58	58	58	58	58	58
		Прогестерон %	Корелација Коефицијент	-.261*	.808**	1.000	-.169	.026	-
			Сиг. (2- таилед)	.048	.000	.	.206	.844	.152
			Н	58	58	58	58	58	58
		п53	Корелација Коефицијент	.058	-.236	-.169	1.000	.216	.135
			Сиг. (2- таилед)	.667	.075	.206	.	.104	.314
			Н	58	58	58	58	58	58
		ПЦНА	Корелација Коефицијент	-.148	.150	.026	.216	1.000	.372*
			Сиг. (2- таилед)	.268	.263	.844	.104	.	.004
			Н	58	58	58	58	58	58
		Ки67	Корелација Коефицијент	.064	-.039	-.152	.135	.372**	1.00
			Сиг. (2- таилед)	.633	.773	.254	.314	.004	.
			Н	58	58	58	58	58	58

** . Корелација је сигнификантна на нивоу 0.01 (п).

* . Корелација је сигнификантна на нивоу 0.05 (п).

Као методе мултиваријационе анализе коришћена је логистичка бинарна регресиона анализа за предикцију припадност групе Хер2, (2+ или 3+), као и за предикцију ПТЕН позитивности или без ПТЕН-а (табела 22). Разматрани параметри у предикцији категоризација су: старост, проценат естрогена, проценат прогестерона, п53, ПЦНА, Ки67, ПТЕН (без - 1, позитиван - 0), тип тумора (Нос - 1, Лобуларе - 0) и Хер групација (Хер2 – 1, Хер3 – 0).

У првом делу урађена је предикција Хер2 групације. Почетни степен предикције када нису укључени горе наведени параметри износи 57.2% (табела 23).

Табела 23. Почетна класификација логистичке регресије за ХЕР

посматран			Предвиђени		
			ХЕР Група		Тачан проценат
			Хер2, 2+	Хер2, 3+	
Корак 0	ХЕР Група	Хер2, 2+	0	68	.0
		Хер2, 3+	0	91	100.0
укупни проценат					57.2

Квалитет горе наведеног модела је на нивоу значајности од 93% (табела 24).

Табела 24. Квалитет добијеног модела за ХЕР2

	Wald	df	Сиг.	OR
Корак 0 Константа	3.304	1	.069	1.338

Како би се постигао већи степен предикције Хер2 групације спроведена је логистичка бинарна мултиваријациона регресиона анализа (метод унапред – Форвард Степвисе Валд). На основу добијених резултата може се видети да Нагелкерке Р2 износи 0.264 (табела 25).

Табела 25. Вредности корелације за ХЕР2

Корак	Модел Сумарни резултат	
	Цок & Снелл Р Скуаре	Нагелкерке Р Скуаре
4	.196	.264

На основу модела добијени је следећи резултат као показатељ параметара од значаја за класификацију Хер2 група (табела 26).

Табела 26. Модел мултиваријационе логистичке регресионе анализе за предикцију ХЕР2

		Варијабле у моделу							
		Б	С.Е.	Валд	ДФ	Сиг.	ОР	95% Ц.И.фор ОР	
								доња	горња
Корак 4	ЕР	-.018	.006	10.052	1	.002	.982	.971	.993
	ПЦНА	-.030	.013	5.156	1	.023	.970	.946	.996
	Ки67	.045	.017	6.881	1	.009	1.046	1.012	1.082
	ПТЕН0(1)	-1.017	.376	7.305	1	.007	.362	.173	.756
	константа	3.516	1.095	10.307	1	.001	33.656		

Параметри од значаја за класификацију Хер2 групације су проценат естрогена, ПТЕН категорија без, Ки-67 и ПЦНА. Повећани ниво процента естрогена, ПЦНА и без ПТЕН-а водиће ка категорији Хер2, 2+, док повећање вредности Ки-67 води ка Хер2,3+ категорији. Униваријантном анализом естроген и Ки-67 су били од значаја у раздвајању група, док ПЦНА се у мултиваријантном моделу појављује као елемент од значаја за ту класификацију.

Валидација модела дата је у табели 27 где се види да је увођењем наведених параметара у класификацију повећан квалитет предвиђања на 71.7%.

Табела 27. Резултат валидације модела мултиваријационе логистичке регресионе анализе за ХЕР2

Класификациона Табела					
посматран			Предвиђени		
			ХЕР2 Група		Тачан проценат
			Хер2, 2+	Хер2, 3+	
корак 4	ХЕР2 Група	Хер2, 2+	42	26	61.8
		Хер2, 3+	19	72	79.1
Укупан проценат					71.7

У случају предвиђања класификације ПТЕН, почетни ниво класификације износи 54.1% када параметри од значаја нису узети у разматрање (табела 28).

Табела 28. Почетна класификација логистичке регресије за ПТЕН

посматран			Предвиђени		
			ПТЕН 0 и остало		Тачан проценат
			Без	Позитиван	
корак 0	ПТЕН 0 и остало	Без	0	73	.0
		Позитиван	0	86	100.0
		Укупан проценат			54.1

Модел на основу добијених резултата је на нивоу од 70%, што је лошија ситуација него код предикције и класификације Хер2 група (табела 29).

Табела 29. Квалитет добијеног модела за ПТЕН

		Валд	ДФ	Сиг.	ОР
корак 0	константа	1.061	1	.303	1.178

Како би се постигао већи степен предикције ПТЕН групације спроведена је логистичка бинарна мултиваријациона регресиона анализа (метод унапред – Напред Степвисе Валд). На основу добијених резултата може се видети да Нагелкерке R^2 износи 0.155 (табела 30).

Табела 30. Вредности корелације за ПТЕН

корак	Модел Сумарни резултат	
	Цок & Снелл R^2 Скуаре	Нагелкерке R^2 Скуаре
3	.116	.155

Добијени резултат је лошијег квалитета него у случају класификације Хер2 група.

На основу модела добијени је следећи резултат као показатељ параметара од значаја за класификацију ПТЕН група (табела 31).

Табела 31. Модел мултиваријационе логистичке регресионе анализе за предикцију ХЕР2

		Варијабле у моделу							95% Ц.И.фор ОР	
		Б	С.Е.	Валд	ДФ	Сиг.	ОР	доња	горња	
Корак 3	п53	.014	.007	3.777	1	.052	1.014	1.000	1.029	
	пцна	.030	.012	6.127	1	.013	1.030	1.006	1.055	
	ХЕР2(1)	-1.146	.351	10.675	1	.001	.318	.160	.632	
	константа	-1.948	.928	4.410	1	.036	.143			

Параметри од значаја за предикцију појаве ПТЕН-а (позитивног резултата) су ПЦНА, п53 с тим да је на граници статистичке значајности ($p=0.052$) и појава Хер2 групе. Параметри ПЦНА и п53 су од значаја са становишта да се повећањем ова два параметра долази до појаве ПТЕН позитивног статуса, док појава Хер2 групације води ка статусу без ПТЕН-а.

Тако добијени резултат модела износи 63.5% што је лошији резултат од Хер2 предикције (табела32).

Табела 32. Резултат валидације модела мултиваријационе логистичке регресионе анализе за ХЕР2

посматран		Класификациона Табела			
		Предвиђени			Тачан проценат
		ПТЕН 0 и остало			
		Без	Позитиван		
Корак 3	ПТЕН 0 и остало	Без	38	35	52.1
		Позитиван	23	63	73.3
	Укупан проценат				63.5

7. ДИСКУСИЈА

Тумори дојке представљају хетерогену групу промена са разним променама у различитим генима.

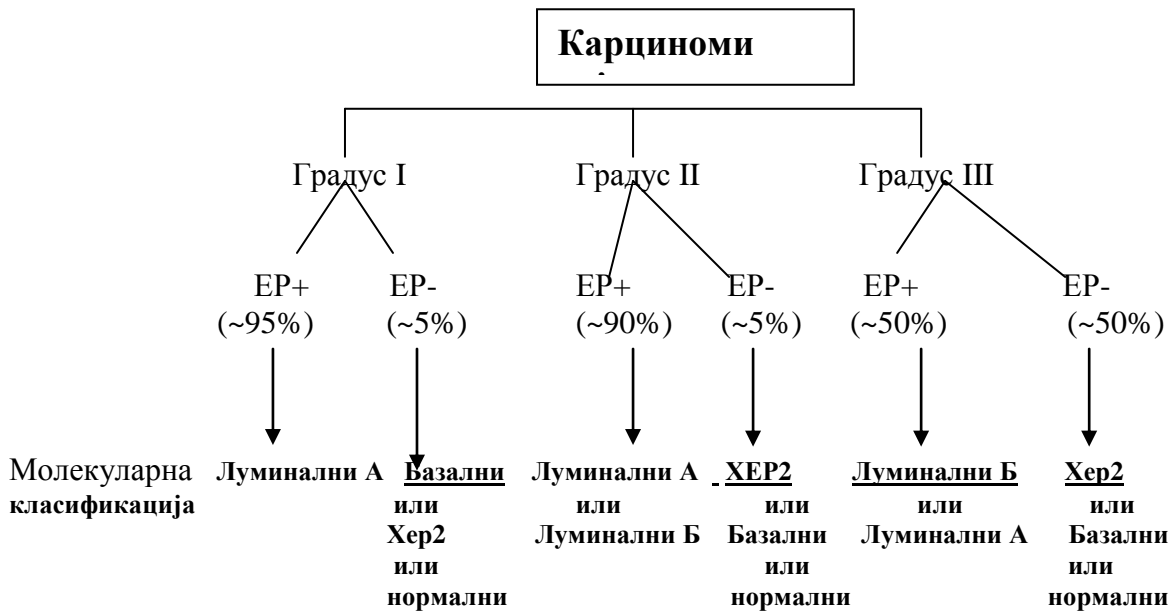
Пероу ет ал (2000) користећи цДНА микроареј технику, поделили су карциноме дојке у пет подтипова: луминални А и Б, Хер2 позитивни, базални и нормални подтипови. Не луминални А/ ЕР позитивни тумори су субкласификовани у луминални Б и Ц фенотипове. Треба рећи да ни један од наведених подтипова није дефинисан уз помоћ ИХХ метода већ на основу генског профила. У већини студија луминални А фенотипови су карактерисани на основу следећих карактеристика:

1. показују експресију ЕР и ПР.
2. строго су удружени са ниским хистолошким градусом и ниским пролиферативном активношћу.
3. показују коекспресију ФОХА1 и ГАТА 3.
4. имају добру прогнозу са петогодишњим преживљавањем преко 95%.

Луминални Б тумори се дефинишу као тумори који показују коекспресију Ер и Хер2. У скорије време луминални Б тумори су дефинисани као ЕР позитивни тумори са високом пролиферативном активношћу (Ки-67 преко 19%) и друга категорија тумора који су ЕР позитивни и Хер2 позитивни. Тумори који имају високу пролиферативну активност имају лошију прогнозу. Изгледа да ови тумори немају функционалне ЕР. Неки од ових тумора имају преклапајуће знаке са базалним туморима у генском профилисању (Шема 4).

Шема 4.

Груби приказ молекуларне класификације тумора дојке (према Бадвеу и Наксхатри-у)



ER сигнални пут је неопходан за преживљавање и прогресију знатног броја тумора дојке. Овај пут се може активирати естрогеном или укрштеним везивањем са рецептором за пут фактора раста.

Активирани сигнали делују преко транскрипционих и нетранскрипционих механизма. Стероидни рецептори се данас идентификују ИХХ методом и вредности најчешће изражавају Аллред скором. Јасно је да да група са ER позитивним ћелијама не представља један ентитет. Ниско градусни ER позитивни тумори не представљају један ентитет (познати као луминални А) и треба их разликовати од високо градусних ER позитивних тумора (Бадве С, 2009). Код естроген позитивних тумора који су хетерогена група ефикасност хормоно терапије зависи од статуса других протеина укључујући друге транскрипционе факторе као ФОХА1, ГАТА-3, фактора раста и коактиваторних и корепресорних протеина. Стероидни хормони, нарочито естрогени и прогестерони су кључни за нормалан развој и раст дојке а такође делују као фактори раста код већине тумора дојке. Експресија естроген рецептора (ER) код карцинома дојке је прогностички маркер а такође и предиктивни фактор за одговор на таргет терапију синтезе естрогена (оофоректомија или ароматазе инхибитори) и на блокирање акције рецептора (тамохифен). Резистенција на ендокрину терапију, урођену или стечену, је чест налаз. Постоји више изоформи ER алфа који имају различите функције

у настанку карцинома дојке и у антиестрогеној резистенцији. Функција ЕР бета није за сада комплетно разјашњена. Укрштена реакција са путем фактора раста може бити одговорна за резистенцију на тамохифен (Бадве С, 2009). ЕР позитивне ћелије у нормалној дојци не показују пролиферативну активност. ЕР позитивне ћелије у атипичној дуктусној хиперплазији пролиферишу. У туморигенези овим путем кључни моменат је прелазак у пролиферишући фенотип.

Прогестеронски рецептори имају две изоформе, А и Б. Рутинским одређивањем ПР ми одређујемо тотални број.

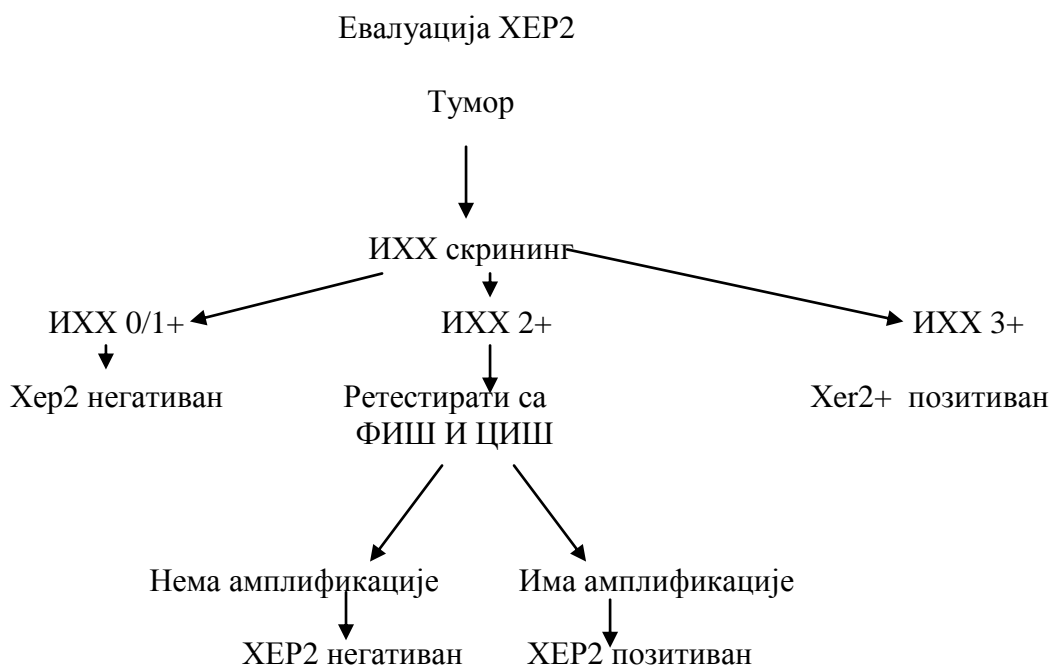
Хер2/неу онкоген хиперекспресија се види у 20-25 % тумора дојке и то је изванредан прогностички и предиктивни маркер инвазивног карцинома дојке (Цотту Х.П, 2008). Хер2 експресија овог онкогена је јако хомогена у туморском ткиву и праћена је лошом прогнозом. Међутим некада се види интратуморска хетерогеност а шта то клинички значи за сада није разјашњено. Овакав налаз указује на то да Хер2/неу група тумора дојке у прогностичкој класификацији (Пероу ЦМ, Сорлие Т, Еисен МБ, ет ал., 2000) није хомогена већ се у њој могу издиференцирати и неке подгрупе. У случајевима када је тумор метастазирао метастатски депозити могу бити такође Хер2 позитивни или негативни што поврђује хетерогеност популације туморских ћелија и различито биолошко понашање. У току терапије са цитостатицима и Херцептином може доћи до промене фенотипа па се у новим депозитима може показати одсуство реакције на Хер2/неу онкоген. Ово указује на интратуморску хетерогеност. Хер2 статус се обично не мења под дејством терапије (Винцет Саломон А, ет ал.2002). Хер2 статус у метастазама је сличан као у примарном тумору али може бити и различит што указује да унутар ове групе постоје субклонови који се развијају одвојено. Због овога би било добро да се код Хер2 позитивних тумора, Хер2 одређује ИХХ методом и у метастатским лимфним чворовима јер ће тај налаз утицати на одлуку о терапији. Давањем циљне терапије (херцептин и лапатиниб) могуће је ерадицирати Хер2 позитивне ћелије.

Уз одређивање Хер2 статуса било би добро из прогностичких разлога одређивати густину микросудова око тумора (Кумар Сх, Гхеллал А, Ли Цх, ет ал,1999). Ангиогенеза је стварање нових крвних судова од већ постојећих. То је вишестадјумски процес који захвата ремоделирање екстрацелуларног матрикса, миграцију ендотелних ћелија, пролиферацију ендотелних ћелија, стварање микросудова и њихово анастомозирање. Ангиогенеза је неопходна за раст и метастазирање тумора. Она се може користити као прогностички маркер.

Хер2 подтип тумора дојке представља велику групу хормон рецептор негативних тумора који показују експресију Хер2. Тумори који су хормоно рецептор позитивни и Хер2 позитивни сврставају се у групу луминалних тумора. Хер2 позитивни тумори често показују p53 мутције и најчешће су хистолошког градуса 3, док су луминални градуса I. Хер2 позитивни тумори најчешће су са метастазама у лимфним чворовима. Губитак ПТЕН-а је одговоран за резистенцију на трастузумаб.

Не реагују сви пацијенти са ХЕР2 позитивним туморима на трастузумаб терапију (Шема 5). Хетерогеност ХЕР2 статуса између примарних тумора и метастатских депозита је једно од могућих објашњења за ову резистенцију. С друге стране Хер2 негативни примарни тумори дојке стичу Хер2 амплификацију у току прогресије болести. p53 мутације и Хер2 хиперекспресија идентификују пацијенте са лошом прогнозом (Тонини Г,2008) и slabим одговором на терапију. Нису сви пацијенти са хиперекспресијом ХЕР2 (3+) реактивни на терапију херцептином (Тонини.Г,2008).

Шема 5.



ПТЕН је други најчешће мутирани ген после p53 у бројним хуманим спорадичним и хередитарним туморима. ПТЕН руководи бројним кључним функцијама ћелија укључујући пролиферацију, миграцију и апоптозу. За супресорну функцију је одговорна активност липидне фосфатазе (Зханг Х., 2006). Цитосолни ПТЕН није исто као и нуклеарни ПТЕН. Нуклеарни ПТЕН игра улогу у стабилизацији хромозома, ДНА обнови, заустављању ћелијског циклуса и ћелијској стабилности

Баланс између ових функција је важан фактор у одређивању да ли ће ћелија остати бенигна или постати неопластична.

ПТЕН је потенцијални маркер за ДЦИС прогресију. ПТЕН протеин делује модулирајући активност тумор промовишућег сигналног пута унутар ћелија, који се назива ПИЗкиназа. ПТЕН такође напада Акт-зависне сигнале за преживљавање, тако да одсуство активног ПТЕН-а омогућава ћелијама да избегну процес апоптозе.

ПТЕН је један од најчешће мутираних тумор супресора који функционише примарно као цитоплазматска фосфатаза која регулише сигнал трансдукционе путеве који учествују у расту, адхезији, миграцији, инвазији и апоптози. ПТЕН је изражен код ембриона и има важне функције у ембрионалном развоју. ПТЕН је способан да ауторегулише своју експресију и функцију кроз стабилизацију p53. ПТЕН штити p53 од деградације док p53 појачава транскрипцију ПТЕН-а. За p53 се веже убиквитин што омогућаје транспорт p53 из једра у цитоплазму где га деградирају протеазоми. ПТЕН штити p53 од деградације протеазомима.

Тестирањем Хер2 позитивних тумора на ПТЕН мутације може се видети да и Хер2,2+ и Хер2, 3+ нису хомогене подгрупе. Обе подгрупе се могу даље поделити на оне које су ПТЕН позитивне и оне које су ПТЕН негативне. ПТЕН мутације се испољавају као цитоплазматска позитивност и она је много чешћа код Хер2,3+ подгрупе. Хер2, 2+ подгрупа не показује мутације ПТЕН у 58,8% (табела 7) док су мутације присутне у 41,2%. Ова подгрупа се даље може тестирати ИХХ методама да се види да ли постоји амплификација и да ли је пацијенткиња кандидат за терапију херцептином. Подгрупа Хер2,3+, не показује мутације ПТЕН у 36,3% а исте су присутне у 63,7%. Ово указује да је неопходно ретестирати ову подгрупу ИХХ методом и испитати друге прогностичке факторе као p 53 и Ки-67. Ако су ови фактори позитивни или високо позитивни онда треба покушати терапију са антителима а ако нису не треба очекивати позитиван терапијски одговор. Из овога је јасно да се прогностичка група Хер2 може поделити на Хер2, 2+ и Хер2, 3+, а ове даље на подгрупе да ли су ПТЕН позитивне или негативне. Из табеле 7 могло би се закључити да није прецизно ПТЕН позитивност градирати по степену интензитета ИХХ реакције, I, II, III подтип. Много је прихватљивије ПТЕН промене поделити на интрануклеану позитивност и интрацитоплазматску позитивност, а интрацитоплазматску позитивност изразити само као присутну или одсутну. Ово се градира ИХХ методом која зависи од бројних фактора: начина фиксације, самог реагенса, и лабораторије где се анализа ради. Сам налаз да је ПТЕН присутан и у Хер2, 2+ и Хер2, 3+ потврђује ово мишљење.

Хер2 је статистички значајно изражена пре свега у односу на ниво без ПТЕН-а (58.8% према 36.3%). Ознака "без" значи да није било мутације ПТЕН гена. У подгрупи Хер2, 2+ је било 40 случајева а у подгрупи Хер2, 3+ 33 случаја. ПТЕН I, II и III значи интензитет мутације.

Однос постојања ПТЕН-а и Хер групе (Табела 8) показује статистички значајну повезаност где се види да је Хер2, 3+ чешће имао позитиван ПТЕН 63.7% , док у случају Хер2, 2+, 41.2% је било позитивних ПТЕН-а. Ово указује да је код 41,2% има смисла радити даља ИХХ испитивања тј. ЦИШ или ФИШ. У групи Хер2,2+ без мутације ПТЕН-а било је 40 пацијенткиња или 58,8%, што указује да та подгрупа тражи даљу имунохистохемијску анализу. Процент пацијенткиња у групи ХЕР2,3+ без мутације је 36,3%, што се може протумачити да у овој групацији постоје и друге генске промене које на основу садашњег ИХХ профила не могу бити разјашњене.

Табела 8. Однос пацијенткиња са ПТЕН 0 и са позитивним налазом

		ПТЕН 0 и остало		Укупно
		Без	Позитиван	
ХЕР2 Група	Хер2, 2+ број	40	28	68
	% унутар ХЕР2 Групе	58.8%	41.2%	100.0%
	Хер2, 3+ број	33	58	91
	% унутар ХЕР2 Групе	36.3%	63.7%	100.0%
укупно	број	73	86	159
	% унутар ХЕР2 Групе	45.9%	54.1%	100.0%

$P=0.005$

Од 68 пацијенткиња са налазом ХЕР2,2+ без мутације ПТЕН-а било је 40 пацијенткиња и ту групу можемо даље тестирати са ФИШ-ом или ЦИШ-ом на амплификацију и у случају амплификације је превести у ХЕР2,3+ и тако пацијенте третирати. Међутим пацијенткиње са позитивном реакцијом на ПТЕН, њих 28 или 41,2% не треба тестирати јер се сигурно не могу сврстати у већу групу, тј ХЕР2,3+. Треба рећи да се подгрупе ПТЕН-а одређују на основу интензитета реакције у цитоплазми, што може да варира од лабораторије до лабораторије, зависно од хромогена, и варијације постоје у зависности од анализатора. Зато је пожељно да се реакције означавају као одсутне или позитивне у односу на цитоплазму. Нуклеарне реакције се само нотирају као присутне или одсутне.

Ако се степен ПТЕН-а разврста на ниже и више вредности не показује статистички значајну везу између Хер2 група. Ако се реакција на ПТЕН подели у две групе, негативна (0 и 1) и позитивна (2 и 3) онда не постоје значајне вредности између ХЕР2, 2+ и ХЕР2,3+.

Базални фенотип карцинома дојке интензивно се анализира од 2006 године. То је јединствени и врло агресивни тип карцинома дојке (Сорлие и сар,2001). Ћелије показују експресију базалних цитокератина (ЦК5/14/17). Ови цитокератини су нормално присутни у базалном слоју епитела дојке. Терминолошки ова група тумора није јасно дефинисана па се користе и други термини као базал-лике, базални фенотип, базални епителни фенотип и базални тип. Најбоље је користити термин басал лике тип. Утврђено је да је експресија цитокератина стабилна у току карциногенезе те тако омогућава индиректне закључке у односу на порекло ћелије. Карциноми дојке показују широку експресију ЦК 8/18/19 што указује да карциноми дојке воде порекло од епителних ћелија дојке које показују експресију цитокератина. Карциноми дојке могу показивати експресију луминалних или базалних цитокератина. У диференцијацији базалних ћелија се користи и п63 као и глатко мишићни актин (СМА). У ову групу се свраставају и хередитарни карциноми (БРЦА1 ии БРЦА2 позитивни). Ови тумори показују висок хистолошки градус, слабу диференцијацију ћелија, нуклеарни плеоморфизам, висок митотски индекс и лошу прогнозу. Поред наведеног високог хистолошког градуса ови тумори имају још неке морфолошке знаке као гурајуће ивице, лимфоцитну инфилтрацију, некрозу, централно ожиљавање и присуство вретенастих ћелија. Типична је и експресија 5/14 цитокератина и негативан налаз рецептора. Већина базал лике тумора показује имунореактивност на виментин, луминалне цитокератине 8/18 и цитокератине 5/6. Они су негативни на ЕР и Хер2. Хистолошки показују повећан број митоза, географски тип некрозе, гурајуће ивице и стромални лимфоцитни одговор (Ливасу Цх,2006).

И поред хистохемијских маркера који дефинишу ћелијски тип може се рећи да и даље постоји интратуморска хетерогеност ћелија. Ова хетерогеност се може објаснити на два начина: стем ћелијском хипотезом и клоналном еволуцијом. Имунохистохемијско бојење на Хер2 и п53 одражава генску амплификацију и мутације. Прогресија тумора се обавља на неколико начина. Линеарни еволуциони модел сматра да у тумору постоји доминантни клон ћелија који прогресивно нагомилава генске и епигенетске алтерације и ове ћелије расту и напредују због околних селекционих притисака. Модел разноврсне еволуције са друге стране претпоставља да поред

доминантног клона у тумору постоје и други мултипли клонови. Зависно од стања која су из околине или створена терапијским интервенцијама идентитет доминантног клона се мења како тумор прогредира (Полуак К,2008). Као последица, хетерогени тумори са високо клоналном различитошћу имају више услова за прогресију и за развој резистенције на лечење. Подела на дукталне и лобуларне карциноме је на основу микроскопског изгледа. Имунохистохемијске карактеристике и диференцирање ова два типа се обавља на основу Е катхерина, који је присутан у дуктусним а не и у лобуларним карциномима. Високо молекуларни цитокератини (ЦК1,ЦК5,ЦК10,ЦК14) су пак присутни у лобуларним карциномима. Други цитокератини као ЦК5/6 и ЦК8 су негативни у већини дукталних карцинома, а ЦК8 је присутан у оба ентитета.

8. Закључци

- Прогностичка класификација тумора дојке базира се на одређивању генског профила. Иако се код појединих група налазе одређене генске промене исте нису хомогене.
- Ове групе тумора дојке показују одређене имунохистохемијске реакције које ову класификацију чине применљивом у клиничкој пракси. Имунохистохемијске анализе се заснивају на хистогенетском пореклу туморских ћелија.
- Група луминалних тумора се дели сада у три подгрупе: луминални А, Б и Ц подтип. Имунохистохемијске карактеристике и биолошко понашање је различито па самим тим и терапија.
- Базал лајк подгрупа такође се карактерише одређеним ИХХ профилем и биолошким понашањем.
- Хер2 позитивна група је посебна група код које је испољена експресија Хер2. Иако је данас уобичајено у пракси подела ове групе на Хер2,3 + и Хер2 остало, Хер2,3+ није хомогена подгрупа.
- Одређивање ПТЕН супресорног гена нам помаже да ХЕР2,3+ групу прецизније карактеришемо у погледу понашања и терапије.
- ПТЕН супресорни ген је најчешће мутирани ген чије мутације и дејство доста добро корелирају са п53 супресорним геном што значи да је пожељно да се ова два супресора одређују симултано.
- Позитивна реакција ПТЕН-а указује на клиничку резистенцију на Херцептин.
- ПТЕН индукује апоптозу а његов губитак доводи до ексцесивне пролиферације или дефектне апоптозе.
- ПТЕН штити п53 од деструкције и ћелије које немају ПТЕН имају редукован п53
- ПТЕН учествује у одржавању стем ћелија.
- Ниске вредности ПТЕН-а корелирају са не реаговањем на терапију, а губитак указује на резистенцију.
- Код свих Хер2 позитивних тумора пре примене терапије потребно је одредити ПТЕН, п53 и Ки-67.
- Хер2 прогностичка група тумора се може сада поделити на ПТЕН позитивну и ПТЕН негативну подгрупу.

- Губитак ПТЕН-а служи као предиктор резистенције на трастузумаб терапију.
- Повезаност постојања ПТЕН-а и типа групе Хер2 закључује се да постоји статистички значајна повезаност и то тако што је у случајевима да је ПТЕН позитиван биће више Хер2, 3+ и обрнуто без ПТЕН-а биће више Хер2,2+.

9. Литература

1. Badve C, Nakshatri H. Oestrogen receptor positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications. *J.Clin Pathol* 2009;62:6-12
2. Balsari A, Casalini P, Tagliabue E, et al: Fluctuation of HER2 expression in breast carcinoma during menstrual cycle. *Am.J.Pathol* 1999; 155(5):1543-1547
3. Bauer KR, Brown M, Cress RD, et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesteron-receptor (PR)-negative, and HER2 negative invasive breast cancer, the so called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 2007;109:1721-1728
4. Bild AH, Yao G, Chang JT, et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide targeted therapies. *Nature* 2006; 439:353-7
5. Carroll TB, Couch JF, Rebbeck RT, Waber LB. Polymorphisms in PTEN in breast cancer families. *J.Med Genetics* 1999;36:94-96
6. Casalini M, Tomasic G, Pilloti C, et al. Pathobiologic identification of two distinct breast carcinoma subsets with diverging clinical behaviors. *Breast cancer Res Treat.*2001;67:189
7. Casalini P, Botta L, Menard C. Role of p53 in HER2-induced proliferation and apoptosis. *J.biological chemistry* 2001;276(15):12449-12453
8. Chang Chun-Ju, Mulholland JD, Valamehr B, et al. PTEN Nuclear Localisation is Regulated by Oxidative stress and mediates p53-Dependent tumor Cuppression. *Mol Cell.biol* 2008;28:3281-3289
9. Chanrion M, Fontaine H, Rodriguez C, et al. A new molecular breast cancer subclass defined from a large scale real-time quantitative RT-PCR study. *BMC Cancer* 2007;/:39-45
10. Cheang CU M, Voduc D, Bajdik Ch, et al: Basal-like breast cancer Defined by five Biomarkers has superior prognostic Value than Triple–negative Phenotype 2008;14:1-15
11. Cianfrocca M, Gradishar W. New Molecular Classification of Breast Cancer. *CA Cancer J Clin* 2009;59:303-313
12. Darb-Esfahani C, Loibl C, Muller M.B, deGraffebried AL, Fulcher L, Friedrichs WE et al: Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers succceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt patway. *Annals of Oncology* 2004,15:1510-1516
13. Dunwald KL, Rossing AM, Christopher I. Hormone receptor status, tumor characteristics and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast cancer Research* 2007;9:R6
14. Dupont J, Renou PJ, Chani M, et al. PTEN overexpression suppress proliferation and differentiation and enhances apoptosis of the mouse mammary epithelium. *J.Clin invest* 2002;110:815-825
15. Fasano J, Muggia F. Breast cancer arising in a BRCA-mutated background:therapeutic implications from an animal model and drug development. *Ann.Onc* 2009;20(4):609-614

16. Ferrero-Pous M, Hacene K, Bouchet C , et al. Relationship between c-erbB2 and Other Tumor characteristics in Breast cancer Prognosis. *Clinical Cancer Research* 2000;6:4745-4754
17. Finak G, Cadekova C, Pepin F, et al: Gene expression signatures of morphologically normal breast tissue identify basal like tumors. *Breast Cancer Research* 2006;8:R58
18. Gil A, Andres Pons A, Fernandez E, et al. Nuclear localisation of PTEN by Ran-dependent Mechanism Enhances Apoptosis: Involvement of an N-Terminal Nuclear Localization Domain and Multiple Nuclear Exclusion Motifs- *MBC* 2006;17:3002-4013
19. Gim O, Perren A, Weng PA, et al. Differential Nuclear and cytoplasmic Expression of PTEN in Normal Thyroid Tissue, and Benign and Malignant Epithelial Thyroid Tumors. *Am.J pathology* 2000;156:1693-1700
20. Goncalves A, Charafe-Jauffret E, Bertucci F, et al. Protein Profiling of Human Breast Tumor Cells Identifies Novel Biomarkers Associated with Molecular subtypes. *Molecular and Cellular proteomics* 2008;7:1420-1433
21. Gori C, Cidoni A, Colozza M, et al: EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2 positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Annals of Oncology* 2009;20:648-654
22. Guedj M. A synthetic review of the five molecular Corlie' s subtypes in breast cancer, *Carte d Identite des Tumeurs, Ligue National contre l Cancer, Paris*
23. Hamida B A, Labidi C I, Mrad K, et al: Markers of subtypes in inflammatory breast cancer studied by immunohistochemistry: Prominent expression of P-cadherin. *BMC Cancer* 2008;8:28
24. Heard JD, Norby LP, Holloway J, Vissing H. Human ERR γ , a Third Member of the Estrogen Receptor-Related Receptor (ERR) subfamily of Orphan Nuclear receptors: Tissue-Cpecific Isoforms Are Expressed during Development and in the Adult, *Molecular Endocrinology* 2000;14(3):382-392
25. Hlobilkova A, Knillova J, Bartek J, et al. The mechanism of action of the tumour suppressor gene PTEN, *Bimed. Paper* 2003;147:19-25
26. Hu Z, Fan C, Oh DC, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006;7:96-100
27. Kapp A, Jeffrey CC, Langerad A, et al: Discovery and validation of breast cancer subtypes, *BMC Genomics* 2006;7:231-239
28. Kumar Ah, Ghellal , Li Ch, et al. Vascular density determining using CD105 Antibody Correlates with Tumor Prognosis. *Cancer Research* 1999;59:856-861
29. Liu C, Dontu G, Wicha M: Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Research* 2005;7:86-95
30. Liu R, Wang X, Chen GY, et al. The prognostic role of gene signature from tumorigenic breast cancer cells. *N.Engl J Med* 2007; 356:217-26
31. Livasy AC, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern Pathology* 2006,19:264-271
32. Lynch DE, Ostermeyer AE, Lee KM, et al. Inherited Mutation in PTEN That Are Associated with Breast Cancer, Cowden Disease and Juvenile Polyposis. *Am J Human Genetics* 1997,61:1254-1260
33. Massague J. Corting out Breast Cancer Gene Signature. *N.EnglJ Med* 2007;356:294-297
34. Msonard C, Balsari A, Casalini P, et al: Her-2 positive breast carcinomas as a particular subset with peculiar clinical behaviors. *Clinical cancer Research* 2002;8(2):520-525

35. Menard C, Balsari A, Casalini P, et al. HER-2 positive Breast Carcinomas as a Particular subset with Peculiar Clinical Behaviors. *Clin. Cancer Research* 2009;8:520-525
36. Minaguchi T, Waite K, Eng Ch. Nuclear Localization of PTEN is Regulated by Ca through a Tyrosil Phosphorylation-Indeendent Conformational Modification in Major Vault Protein. *Cancer Research* 2006;66:11677-11680
37. Mutter LG. PTEN, a Protean Tumor Suppressor. *Am J Path* 2001;158:1895-1898
38. Nagata Y, Keng-Hsueh I, Zhou X, et al. PTEN activation contribute to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer cell*. 2004;6:206
39. Naume B, Zhao Xi, Cynnestvedt M, et al. Presence of bone marrrow micrometastasis is associated with different recurrence risk within molecular subtypes of breast cancer. *Molecular oncology* 2007;1:160-171
40. Osborne KC, Cchiff R. Estrogen –Receptor Biology: Continuing Progress and Therapeutic Implications. *J Clin Oncology* 2005;23:16161-16-22
41. Ottu HP, Assekah J, Lae M, et al. Intratumoral heterogeniti of HER2/neu expression and its consequences for management of advanced breast cancer. Letterbntoeditor. *Annals of oncology*, 2008;10:1093
42. Pandolfi PP. Breast cancer_Loss of PTEN Predicts Resistance to Treatment. *N.Engl J.Med* 2004;351:2337-2338
43. Payne RC, Kemp JC. Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis* 2005; 26:2031-2045
44. Perou CM, Corlie T, Eisen MB, et al: Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 200;406:747-752
45. Perren A, Weng LW, Boag HA, et al: Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expression in Primary Ductal Adenocarcinomas of the Breast. *Am.J.Pathol* 1999;155:1253-1260
46. Petroceili T, Clingerland JJ. PTEN deficiency: a role in mammary carcinogenesis- *Breast Cancer Research* 2001;3:356-360
47. Planchon MC, Waite AK, Eng Ch. True nuclear affairs of PTEN. *J.Cell Science* 2008;121:249-253
48. Polyak K. Is Breast Tumor Progression Really Linear? *Clinical Cancer Research*. 2008;14:339-345
49. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, et al: Molecular Classification of Breast Cancer: Limitations and Potential. *The Oncologist* 11:868-877
50. Pusztai L. Current Status of Prognostic Profiling in Breast Cancer. *The Oncologist* 2008;4:350-360
51. Rakha E, Ellis I. Are triple-Negative and Basal like Breast Cancer Enonymous? *Clinical Cancer Reseaerch* 2008,15:618
52. Rao BR. Isolation and characterization of an estrogen binding protein wich may integrate the plethora of estrogenic actions in non-reproductive organs. *J.Steroid Biochem Molec Biol* 1998,65:3-41
53. Rollerova E,Urbancikova M. Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (review). *Endocrine regulations* 200,34:203-218
54. Rong Y, Belozarov EV, Tucker-Burden C, et al. Epidermal Growth Factor Receptor and PTEN Modulate Tissue Factor Expression in Glioblastoma through JunD/Activator protein-1 Transcriptional Activity. *Cancer research* 2009;69:2540-2543
55. Sansal I, Cellers W. The Biology and Clinical Relevance of the PTEN Tumor Suppressor Pathway. *J.Clin Oncology* 2004;22:2954-2963

56. Sorlie T, Perou CM, Tibishirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci UCA* 2001;98:10869-74
57. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Ccu UCA* 2003;100:8418-23
58. Sorlie T. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer:gene expression analysis across three different platforms. *BMC Genomics* 2006;7:127
59. Sorlie T. Gene expression patterns of breast carcinoma distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAC* 2001;98:10869-10874
60. Sorlie T. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAC* 2003;200:8418-8423
61. Sorlie T,Tibshirani R.,Parker J, et al: Repeated observation of breast tumor subtypes in independen3 gene expression data sets. *PNAC* 2003;100:8418-8423
62. Sorlie T. Introducing Molecular Subtyping of breast Cancer into the Clinic? *J.Clin.Oncol* 2009;27:1153-1154
63. Sotiriou CH, Neo CV, McChane ML, et al: Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:10393-10398
64. Spitale A, Mazzola P, Coldini D, et al. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from Couth Switzerland. *Annals of Oncology* 2009;20(4):628-635
65. Tamaguney T, Stokoe D. New insight into PTEN. *J.Cel Ccience* 2007;120:4071-4079
66. Tarin D. Comparisons of Metastases in Different Organs: Biological and Clinical Implications. *Clinical Cancer Research* 2008, 14:1923-1929
67. Tien Yeh I, Mies C. Application of Immunohistochemistry to Breast lesions. *Arch Path.Lab Med* 2007;132:349-358
68. Tolaney C. Therapy for HER-Expressing Breast cancer: Efficacy and Toxicity. *Breast Cancer* 2008;1:1-6
69. Tonini G, Fratto EM, Schiavon F. Molecular prognostic factors:clinical implications in patients with breast cancer. *Cancer Therapy* 2008;6:773-782
70. Torsten O Nielsen, Hsu DF, Jensen K, et al: Immunohistochemical and Clinical Characterization of basal like subtype of Invasive Breast carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2004;10:5367-5374
71. Truong PT, Berthelet E, Lee J, et al: The prognostic significance of the percentage of positive/dissected axillary lymph nodes in breast cancer recurrence and survival in patients with one to three positive axillary lymph nodes. *Cancer* 2005;193:2006-14
72. Ueda K, Nishijima M, Inui H, et al: Infrequent Mutations in the PTEN/MMAC1 Gene among Primary Breast cancers. *Cancer Science* 2005;89:17-21
73. Vincet Calaomon A, Jouve M, Genin P, et al. Her2 status in patients with breast carcinoma is not modified selectively by preoperative chemotherapy and is stable during the metastaic process. *Cancer* 2002;94:2169-2173
74. Wang J, Ouyang W, Li J, Wei L , et al: Loss of tumor suppressor p53 decreases PTEN Expression and Engances Signaling Pathways leading to Activation of Activator Protein 1 and nuclear factor kB induced by UV Radiation. *Cancer Research* 2005; 65:6601-6611
75. Welch RD, Cooper RC, Hurst BD, et al. Metastasis research Society-American Association for Cancer research Joint Conference on Metastasis. *Cancer research* 2008;68:23

76. Weng PL, Smith MW, Dahia MP, et al: PTEN suppress Breast Cancer Cell Growth by Phosphatase Activity dependent G1 Arres followed by Cell Death. *Cancer Research* 1999;59:5808-5814
77. Xang X, Li F, Bulloj A, et al: Tumor suppressor PTEN affects tau phosphorylation, aggregation, and binding to microtubules. *FACEB Journal* 2006; 20:1272-1274
78. Xue Thang, Li Feng, Ayelen Bulloj, et al. Tumor supressor PTEN affects tau phosphorylation, aggregation, and binding to microtubules. *FACEB Journal* 2006; 20:1272-1274
79. Yeh IT, Mies C. Application of Immunohistochemistry to Breast Lesions. *Arch Path Lab Med* 2009;132:349-358