

Pojavnost HER1 receptora i e-cadherina u trostruko negativnom karcinomu dojke

Banović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:222472>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Ana Banović

**POJAVNOST HER1 RECEPTORA I E-CADHERINA U TROSTRUKO
NEGATIVNOM KARCINOMU DOJKE**

Diplomski rad

Osijek, 2017. godine

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Ana Banović

**POJAVNOST HER1 RECEPTORA I E-CADHERINA U TROSTRUKO
NEGATIVNOM KARCINOMU DOJKE**

Diplomski rad

Osijek, 2017. godine

Rad je ostvaren u: Klinički zavod za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra u Osijeku.

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

Rad ima 75 listova, 11 tablica i 120 slika.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Branku Dmitroviću na pruženoj pomoći u vezi s izradom diplomskog rada.

Zahvaljujem se prof. Kristini Kralik koja mi je pomogla u statističkoj obradi podataka.

Veliko hvala mom mužu, mojoj obitelji i prijateljima koji su vjerovali u mene i pružali mi potporu tijekom studiranja i pisanja diplomskog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija.....	1
1.2. Etiologija	1
1.3. Histološka klasifikacija tumora dojke	1
1.4. Patohistološko određivanje stadija bolesti.....	3
1.5. HER1	9
1.6. E-cadherin.....	5
1.7. Trostruko negativni karcinom dojke (TNBC)	6
1.8. Povezanost između TNBC i BLBC	7
2. HIPOTEZA.....	8
3. CILJEVI.....	9
4. MATERIJALI I METODE.....	10
4.1. Ustoj studije.....	10
4.2. Materijal.....	10
4.3. Metode	10
4.3.1. Histološka analiza	10
4.3.2. Imunohistokemija	10
4.4. Statističke metode.....	11
5. REZULTATI	12
6. RASPRAVA.....	22
7. ZAKLJUČCI	26
8. SAŽETAK	27
9. SUMMARY.....	28
10. LITERATURA.....	29
11. ŽIVOTOPIS	32
12. PRILOZI.....	34

POPIS OZNAKA I KRATICA

BRCA1 – gen 1 vezan uz rak dojke; (od engl. breast cancer gen 1)

BRCA2 – gen 2 vezan uz rak dojke; (od engl. breast carcinoma gen 2)

EGFR – epidermalni faktor rasta; (engl. epidermal growth factor receptor)

ER – estrogen receptor

PR – progesteron receptor

HER-2 – dio obitelji HER (Neu, ErbB2)

Ki-67 – nuklearni antigen

HER1 – dio obitelji HER (EGFR, ErbB1)

AR – androgen receptor

TNBC – trostruko negativni karcinom dojke; (engl. triple negative breast cancer)

BLBC – karcinom nalik bazalnim stanicama; (engl. basal-like breast cancer)

HZJZ – Hrvatski zavod za javno zdravstvo

1. UVOD

Rak dojke nastaje u tkivu dojke, najčešće u mliječnim kanalićima ili režnjićima. Javlja se u muškaraca i u žena, iako je pojavnost raka dojke u muškaraca rijetka.

1.1. Epidemiologija

Karcinom dojke najčešći je zloćudni tumor u žena. Čini oko 25 % tumora u žena i uzrokuje veliki društveni i zdravstveni problem osobito u razvijenim zemljama svijeta. U Hrvatskoj se godišnje dijagnosticira oko 2500 novih slučajeva, a oko 800 žena umire od raka dojke. Prema podacima iz Registra za rak Hrvatske i Hrvatskog Zavoda za javno zdravstvo (2014. g.), rak dojke je najčešći zloćudni tumor u žena s 29 % (1,2). Rizik od nastanka karcinoma raste sa starošću žene (3). Malokad se pojavljuje prije 25. godine života, a najčešće oko i nakon menopauze (4).

1.2. Etiologija

Obiteljska anamneza važna je kod žena koje su u obitelji imale pozitivnu anamnezu na rak dojke, posebice u mlađih žena. Genska predispozicija očituje se u oštećenjima dvaju gena: BRCA1 i BRCA2. Povećani rizik također povezan je sa ženama koje su imale ranu menarhu, nisu rađale, rađale su u kasnoj životnoj dobi ili su kasnije ušle u menopauzu. U čimbenike okoliša koji dovode do nastanka karcinoma dojke ubrajamo učestalo zračenje, posebice u mlađem životnom razdoblju. Studije su pokazale da nadomjesna hormonska terapija estrogenom povećava rizik za oboljenje (5).

1.3. Histološka klasifikacija tumora dojke

Gotovo svi karcinomi dojke spadaju u histološku skupinu adenokarcinoma, dok su svi ostali tipovi rijetkost. S obzirom na invazivnost dijele se na neinvazivne, mikroinvazivne i invazivne oblike s posebno prepoznatljivim podtipovima (4).

NEINVAZIVNI KARCINOM :

- Intraduktalni karcinom (DCIS) – 80 %
- Intraduktalni papilarni karcinom

- Lobularni karcinom in situ (LCIS) – 20 %

MIKROINVAZIVNI KARCINOM

INVAZIVNI KARCINOM DOJKE:

- Invazivni karcinom bez posebnih osobitosti (NOS)
- Invazivni lobularni karcinom
- Tubularni karcinom
- Kribriformni karcinom
- Mucinozni karcinom
- Invazivni karcinom s medularnim karakteristikama
- Karcinom sa apokrinom diferencijacijom
- Karcinom sa stanicama oblika prstena pečatnjaka
- Invazivni papilarni karcinom
- Pagetova bolest bradavice
- Inflamatorni karcinom

Nova je klasifikacija raka dojke temeljena na molekularnoj dijagnostici. S obzirom na to da nije jeftina i dostupna, koristi se surogatna klasifikacija temeljena na imunohistokemijskom određivanju ER, PR, HER2 i Ki67. (Tablica 1.1.).

Tablica 1.1. Surogatni molekularni tipovi karcinoma dojke. Prema Damjanov I i sur. (4).

PODTIP KARCINOMA DOJKE	IMUNOHISTOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE	INCIDENCIJA
Luminalni A	ER+, PR+, HER-2, Ki-67 < 20 %	40 %
Luminalni B HER-2 negativni	ER+, HER-2, i najmanje jedno od : - PR negativan ili nizak (< 20 % + stanica) - Ki-67 visok (> 20 %)	10 – 15 %

Luminalni B Her-2 pozitivni	ER+, HER-2+, Ki-67 bilo kakav, PR bilo koji	10 – 15 %
Her-2 pozitivni	HER-2+, ER-, PR-	10 – 15 %
Trostruko negativni	HER-2-, ER-, PR-	15 – 20 %

1.4. Patohistološko određivanje stadija bolesti

TNM – klasifikacija proširenosti raka dojke (stadija bolesti: T = veličina primarnog tumora i invazivnost, N = nodalne metastaze i M = prisustvo ili odsustvo udaljenih metastaza) (1).

- Tis (Karcinom in situ)
- T1 (Tumor do 2 cm u promjeru)
- T2 (Tumor od 2 do 5 cm)
- T3 (Tumor od 5 cm)
- T4 (Tumor koji zahvaća kožu ili prsni koš)
- N0 (Bez zahvaćenih limfnih čvorova)
- N1 (Tumorom zahvaćena 1-3 limfnih čvorova u aksili)
- N2 (Tumorom zahvaćeno 4-9 limfnih čvorova u aksili)
- N3 (Tumorom zahvaćeno 10 i više limfnih čvorova u aksili)
- M0 (Bez udaljenih presadnica)
- M1 (Udaljene presadnice)

Stadij karcinoma dojke

- Stadij 0 (Tis N0 M0)
- Stadij I (T1 N0 M0)
- Stadij II A (T0-T2 N0-N2 M0)
- Stadij II B (T2N1M0, T3N0M0)

- Stadij III (A T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N2M0)
- Stadij IV (bilo koji T, bilo koji N, M1)

1.5. HER1

HER1 ili EGFR (epidermal growth factor receptor) epidermalni faktor rasta sastoji se od 53 aminokiseline. Za njega je karakteristično da se stvara se u brojnim tkivima, u serumu trudnica je u visokoj koncentraciji, potentni je mitogen, te djeluje preko receptora (6). Kod ljudi obitelj HER uključuje HER1 (EGFR, ErbB1), HER2 (Neu, ErbB2), HER3 (ErbB3) i HER4 (ErbB4). Receptori za HER1 u normalnim tkivima nalaze se u kolonu, dok se u tumorskom tkivu mogu naći u tumorima dojke, gliomima, ginekološkim tumorima, tumorima pluća i tumorima mokraćnog mjehura. Pacijentice čiji su tumor građeni od tumorskih stanica u kojim je vrlo malo ili uopće nema estrogenskih i progesteronskih receptora, ali se u njima nalaze receptori za HER1 povezan je s slabijim preživljenjem (7).

HER1 signalizira regulaciju u interakciji između mezenhima i epitela tijekom rasta i razvoja te prijenosa ekstracelularnih znakova unutarstaničnih signalnih kaskada. Njihovim membranama protežu se tirozin kinaza receptori koji sadrže domenu izvanstaničnog ligand vezanja, transmembransku domenu i unutarstaničnu tirozin kinazu. Ovi inače neaktivni receptori aktiviraju se kada se ligand poveže sa ekstracelularnom domenom receptornog monomera. Vezivanje liganda uzrokuje strukturalne promjene što pogoduje dimerizaciji s istim članom (homodimer) ili različitim članom (heterodimer) obitelji. Kad su dimerizirane, domene tirozin kinaza aktiviraju se te fosforiliraju ključne ostatke tirozina u unutarstaničnim domenama što rezultira aktivacijom nekoliko nizvodnih signalnih kaskada. Na kraju tih procesa putem tog faktora dolazi do stimulacije sinteze DNA i diobe kako normalnih tako i tumorskih stanica (8).

HER1 atraktivan je u terapijskim istraživanjima zbog prekomjerne izraženosti i/ili poremećaja u mnogim solidnim tumorima. Aktivacija HER1 uključuje mrežu signalnih procesa koji potiču proliferaciju tumorskih stanica, migraciju, adheziju, angiogenezu i odgođenu apoptozu. Nasuprot tomu, inhibicija HER1 s pomoću tirozin kinaznih inhibitora blokira signalni put pa time i tumorigenezu. HER1 ima ključnu ulogu u normalnom staničnom rastu, staničnoj usmjerenosti, oporavku stanica i funkcijskoj različitosti. Kod prekomjerne izraženosti vezanjem liganda receptora dolazi do dimerizacije receptora i autofosforilacije što

dovodi do tumorske proliferacije, angiogeneze, pokretljivosti, metastaziranja i zaštićenost od apoptoze. Inhibicijski mehanizmi HER obitelji sprječavaju tumorski nastanak i progresiju.

Svaki od receptora HER obitelji sadrži ekstarcelularnu ligand vezujuću domenu, transmembransku regiju i unutarstaničnu citoplazmatsku domenu (7). Struktura HER1 načinjena je od amino skupine na kraju ekstarcelularne domene s dvije regije bogate cisteinom koji čine ligand vezujuću domenu. Transmembransku regiju čini zasebni alfa heliks čija je uloga učvršćivanje receptora za stanicu. Citoplazmatska domena sadrži tirozin kinaza regiju i karboksi terminalni rep (7).

Dva glavna puta uključena u signalizaciju HER1 su ras-raf mitogen aktivirana protein kinaza (MAPK – stanična proliferacija) i fosfatidilinositol 3 kinaza (PI3K – stanično preživljavanje) (7).

HER1 je najviše ispitan u brojnim studijama od cijele HER obitelji te postoje istraživanja da bi bio važan u antikarcinomskoj terapiji. Abnormalna receptorska aktivnost ili poremećena signalna transdukcija može dovesti do mehanizama koji su potencijalno odgovorni za rast i/ili razvoj karcinoma u ljudi.

1.6. E-cadherin

E-cadherin je stanična adhezivna molekula sintetizirana pomoću CDH1 gena smještenog na 16q22.1 kromosomu. Izražen je na svim epitelnim stanicama, u staničnoj proliferaciji, invaziji i kao supresor metastaza. E-cadherin ima transmembransku glikoproteinsku strukturu s tri specifične domene: intracitoplazmatsku, transmembransku i ekstarcelularnu. Citoplazmatska domena ima ulogu spojnog/strukturnog proteina i ulogu signalnog pretvornika. Ekstarcelularna domena sastoji se od četiri poddomene: EC-1 (ovisna o kalciju), EC-2, EC-3, EC-4 (pridržane poddomene) uz membranu proksimalnog dijela ekstarcelularne domene. E-cadherin ima ključnu ulogu u staničnoj pokretljivosti i invaziji tijekom epitelno-mezenhimalnih tranzicija, ekstarvaciji i migraciji. U većini epitelnih tumora funkcija e-cadherina izgubljena je inaktivacijom mutacija kod gena koji kodiraju e-cadherin i β -katenin, inhibiranje transkripcije ili proteolize izvanstanične domene cadherina. Eksperimentalni dokazi pokazuju da je manjak ekspresije e-cadherina ključan za invazivnost i metastaziranje epitelnih tumora. Retrospektivne studije pokazale su da je niska razina ekspresije e-cadherina znak loše prognoze te da upućuje na metastaze u limfnim čvorovima (9).

1.7. Trostruko negativni karcinom dojke (TNBC)

Trostruko negativni karcinom (TNBC) dojke definira se kao odsutnost estrogenskih receptora (ER), progesteronskih receptora (PR) i izostanak prekomjerne ekspresije faktora rasta (HER2) u stanicama raka dojke (10). U oko 170.000 bolesnika diljem svijeta godišnje se dijagnosticira TNBC (11). Taj tip čini 10 - 20 % svih karcinoma dojke i općenito je povezan s lošijom prognozom (12). Spada u heterogenu skupinu karcinoma koja je vrlo agresivna, ima visok rizik od recidiva i metastaza, pojavljuje se često u žena u predmenopauzalnom razdoblju života. To su tumori visokog gradusa (slabije diferencijacije), visoke proliferacije sa središnjom nekrozom, učestalim pozitivnim limfnim čvorovima. Karakteristično je također i da su pacijenti kraće vreme bez relapsa, 85,5 % pacijenata sa TNBC-om ima preživljenje od 4 godine, dok je isti postotak u drugih tipova 94,2 %. Preživljenje od 5 godina pripisuje se 81 % pacijenata sa TNBC-om, dok za druge tipove iznosi 91 %. Recidivi se pojavljuju 1,2 godine ranije nego u ostalim tipovima (13). Lošiju prognozu potkrepljuju česte ekspresije: citokeratina (5,14,17), HER1, mioepitelnih markera (kaveolin (1,2,3), P-cadherin) te manjak ekspresije e-cadherina. Tu je i visoka ekspresija gena odgovornih za proliferaciju: Ki-67, TOP2A, ciklin E, niska razina ciklin D1. Oko 50 % oboljelih od TNBC-a ima promijenjen gen p53 (14).

Budući da TNBC ne reagira na hormonsku terapiju, kemoterapija i zračenje mogu biti jedina moguća sredstva liječenja. U početku postoji odgovor na konvencionalnu kemoterapiju, ali ubrzo dolazi do relapsa bolesti. Nije otkriven učinkoviti tretman bolesti (15). Istraživanja su pokazala da je medijan preživljavanja pacijenata sa metastazama u TNBC samo 13 mjeseci, a gotovo svi pacijenti umiru usprkos pokušaju liječenja kemoterapijom koja je trenutno jedina dostupna metoda liječenja (16). Novija klinička ispitivanja uvrstila su PARP inhibitore koji su pokazali uspjeh, ali samo kod promjena vezanih uz BRCA1 gen. Nadalje, uspjeh je ostvaren kod karcinoma s pozitivnim androgen receptorima (AR) liječenih enzalutamidom. Nedavno su provedena i ispitivanja u području imunoterapija gdje se pomoću avelumaba i anti-PD-L1 (atezolizumab) protutijela došlo do niskog odgovora od 8,6 %, a pomoću anti-PD-1 (pembrolizumaba) do dugotrajnijeg odgovora sa ukupnom stopom od 18,5 % (17). Postoji velika potreba za razumijevanjem bioloških puteva koji su izrazito aktivni kod TNBC-a što bi moglo dovesti do razvoja bolje ciljane terapije (18).

1.8. Povezanost između TNBC i BLBC

Trostruko negativni karcinom (TNBC) i karcinom nalik bazalnim stanicama (BLBC) nisu isti, ali su jako slični po svojim karakteristikama. TNBC je heterogena skupina karcinoma, dok BLBC stvara homogenu grupu sa sličnim tumorima. Zajednička im je histološka građa većinom duktalnih invazivnih karcinoma gradusa III. s velikom mitotičkom aktivnošću, visokom stopom apoptoze i nekroze te pomicanjem granica invazivnosti. Češće se pojavljuju u mlađih žena gdje su i agresivniji. Povišena je pojavnost kod žena sa povećanom tjelesnom masom i kod žena mlađih od 40 godina koje rabe oralne kontraceptive. BLBC eksprimira u visokim razinama gene povezane sa proliferacijom - Ki67, PCNA i ciklin A, također do 75 % BLBC pokazuju mutacije gena TP53 i/ili nakupljanje nuklearnih kiselina. Pojačana je ekspresija i p53 gena. Smanjena ekspresija i gubitak heterozigotnosti (LOH) gena supresor tumora Rb1 također se pripisuje BLBC-u što dovodi do povećanja inhibitora kinaze ovisnih o ciklinu p16 i lošije prognoze od onih bez Rb1 LOH (14).

2. HIPOTEZA

Tumorske stanice trostruko negativnog karcinoma dojke pojačano izražavaju HER1 receptore i slabo ili nikako ne izražavaju e-cadherin.

3. CILJEVI

Cilj rada je usporediti pojavnost HER1 receptora i e-cadherina u tumorskim stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke s ostalim karcinomima dojke.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) odrediti ekspresiju HER1 receptora i e-cadherina u tumorskim stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke
- 2) usporediti izraženost HER1 receptora i e-cadherina u tumorskim stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke s izraženosti u tumorskim stanicama ostalih karcinoma dojke (kontrolne skupine)
- 3) Ciljevi su utvrditi povezanost izraženosti HER1 receptora i e-cadherina u raku dojke s:
 - a) veličinom tumora
 - b) nazočnosti metastaza u limfnim čvorovima
 - c) stupnjem diferencijacije tumora
 - d) dobi bolesnica
 - e) ekspresijom ER i PR receptora
 - f) ekspresijom HER2
 - g) mitotskom aktivnošću tumora mjerenom ekspresijom Ki-67.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao retrospektivno istraživanje.

4.2. Materijal

Materijal su parafinski blokovi 30 dijagnosticiranih trostruko negativnih karcinoma dojke na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek počevši od 01. siječnja 2010. godine, a kontrolna skupina 30 dijagnosticiranih ostalih skupina karcinoma dojke od istog datuma. Iz patohistoloških nalaza prikupljeni su podaci o dobi ispitanica, veličini tumora, patohistološkoj dijagnozi, stupnju diferencijacije tumorskog tkiva, ekspresiji ER, PR i HER2.

4.3. METODE

4.3.1. Histološka analiza

Patohistološka analiza provedena je na uzorcima tkiva koji su prethodno bili u 10 % otopini formalina (19). Nakon što uzorci uklopljeni u parafinske blokove njihovim rezanjem na mikrotomu dobivaju se rezovi debljine 3-5 μm . Slijedi postupak standardnog bojenja hemalaun-eozin (HE) u automatskom bojaču (Sakura Tissue-Tek Prisma). Mikroskopiranjem se određuje moguća dijagnoza (histološki tip) te daljnji postupak i potreba za imunohistokemijskim ispitivanjima.

4.3.2. Imunohistokemija

Imunohistokemija je proces lokalizacije specifičnih antigena u tkivu pomoću ciljno usmjerenih protutijela tako da se određeno protutijelo veže i prepoznaje samo određeni antigen. Imunohistokemija omogućava dobivanje važnih dijagnostičkih, prognostičkih i prediktivnih informacija neophodnih za klasificiranje i diferenciranje pojedinih bolesti. Osim u dijagnostičke svrhe imunohistokemija se također koristi i u znanstveno-istraživačke svrhe da bi se bolje razumjela distribucija i lokalizacija biomarkera i ekspresija pojedinih proteina u

različitim tkivima. Ta tehnika se razvijala i unaprjeđivala osjetljivost analize zbog različite očuvanosti tkiva u fiksiranom uzorku.

Parafinski blokovi reprezentativnih uzoraka tumorskog tkiva istraživane i kontrolne skupine bit će obojeni imunohistokemijski na HER1 receptore i e-cadherin. Korišteno je monoklonalno mišje protutijelo anti-HER1, klon H11 (Dako) za imunohistokemijsko određivanje EGFR (HER1) glikoproteina, kao i monoklonalno mišje protutijelo anti-e-cadherin, klon NCH-38 (Dako) za određivanje e-cadherina.

Pozitivnost imunohistokemijskog nalaza receptora očitat će se semikvantitativno kao 0 (negativan), 1+ (do 11% pozitivnih tumorskih stanica), 2+ (11%-30% pozitivnih tumorskih stanica) i 3+ (30% i više pozitivnih tumorskih stanica).

4.4. STATISTIČKE METODE

Kategorijski podatci bit će predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci bit će opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona.

Razlike ili povezanost kategorijskih varijabli bit će testirane χ^2 testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli bit će testirana Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina bit će testirane Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom.

Sve P vrijednosti bit će dvostrane. Razina značajnosti bit će postavljena na $p < 0,05$. Za statističku analizu bit će korišten statistički program SPSS (inačica 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na ukupno 60 uzoraka tumorskog tkiva karcinoma dojke od kojih je 30 trostruko negativnog tipa, a 30 uzoraka (kontrolna skupina) iz skupine ostalih tipova karcinoma dojke.

Prema TNM klasifikaciji najviše ih je iz skupine do 2 cm (T1): 29 (48 %) te iz skupine najvećeg promjera od 2 - 5 cm (T2): 23 (38 %) uzorka. Metastaze u pazušnim limfnim čvorovima utvrđene su u 34 (57 %) bolesnice, bez značajne razlike prema skupinama. Prema stupnju diferencijacije (gradusu) slabo diferenciranih tumora je ukupno 27 (45 %), od koji je značajno više iz skupine trostruko negativnih, čak 19 (63 %) (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$) (Tablica 5.1.).

Tablica 5.1. Veličina tumora, postojanje pazušnih metastaza i gradus tumora prema istraživanim skupinama.

	Broj (%) uzoraka			P*
	Ostali	Trostruko	Ukupno	
	Karcinomi	negativni		
Veličina prema TNM klasifikaciji				
Najveći promjer do 2 cm	15 (50)	14 (47)	29 (48)	0,62
Najveći promjer od 2 do 5 cm	12 (40)	11 (37)	23 (38)	
Najveći promjer veći od 5 cm	2 (7)	5 (16)	7 (12)	
Infiltracija prsnog koša, kože dojke	1 (3)	0	1 (2)	
Metastaze				
Nema metastaza	11 (37)	15 (50)	26 (43)	0,44
Ima metastaza	19 (63)	15 (50)	34 (57)	
Gradus (stupanj diferencijacije)				
I – dobro diferencirani	9 (30)	1 (3)	10 (17)	0,004
II – srednje diferencirani	13 (43)	10 (33)	23 (38)	
III – slabo diferencirani	8 (27)	19 (64)	27 (45)	
Ukupno	30 (100)	30 (100)	60 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Srednja dob svih ispitanica je 60 godina (interkvartilnog raspona 51 do 72 godine), a značajno su mlađe ispitanice s trostruko negativnim karcinomom, medijana 56 godina (interkvartilnog raspona 44 do 69 godina) (Mann Whitney U test, $P = 0,03$).

Mitotska aktivnost tumorskog tkiva (Ki-67) značajno je viša u skupini trostruko negativnih karcinoma dojke u odnosu na ostale podskupine raka dojke, medijana 68 % (interkvartilni raspon 40 % do 80 %) (Mann Whitney U test, $P < 0,001$) (Tablica 5.2.).

Tablica 5.2. Srednja dob i broj stanica u diobi (Ki-67) prema istraživanim skupinama.

	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	Ostali karcinomi	Trostruko negativni	Ukupno	
Dob ispitanica [godina]	64 (57 – 74)	56 (44 – 69)	60 (51 – 72)	0,03
Ki-67 [% stanica u diobi]	15 (9 – 25)	68 (40 – 80)	25(12 – 70)	<0,001

*Mann Whitney U test

HER1 receptor nije prisutan kod 43 (72 %) uzorka, dok e-cadherin nije prisutan kod samo dva uzorka, a prisutan je više od 30 % kod 51 (86 %) uzoraka bez značajne razlike prema tome radi li se o trostruko negativnom ili ostalom karcinomu dojke (Tablica 5.3.).

Tablica 5.3. Uzorci prema HER1 receptoru i e-cadherinu po skupinama.

		Broj (%) uzoraka			P*
		Ostali	Trostruko	Ukupno	
		Karcinomi	negativni		
HER1 receptor					
Nije prisutno		24 (80)	19 (63,3)	43 (72)	0,13
manje od 11 %		6 (20)	6 (20)	12 (20)	
11 % do 30 %		0	3 (10)	3 (5)	
više od 30 %		0	2 (6,7)	2 (3)	
e-cadherin					
Nije prisutno		2 (6,7)	0	2 (3)	0,10
manje od 11 %		0	2 (6,7)	2 (3)	
11 % do 30 %		1 (3,3)	4 (13,3)	5 (8)	
više od 30 %		27 (90)	24 (80)	51 (86)	
Ukupno		30 (100)	30 (100)	60 (100)	

*Fisherov egzaktni test

U skupini ispitanica s prisutnim HER1 receptorom najviše je onih s manje od 11 %, 12/17 uzoraka, više od 30 % imaju samo dvije ispitanice, bez značajne razlike prema skupinama.

Više od 30 % prisutnosti e-cadherina ima 51 (88 %) ispitanica, manje od 11 % dvije ispitanice, a od 11 % do 30 % njih 5 (9 %) bez značajne razlike prema skupinama (Tablica 5.4.).

Tablica 5.4. Učestalost prisutnih HER1 receptora i e-cadherina prema skupinama.

	Broj (%) uzoraka			P*
	Ostali Karcinomi	Trostruko negativni	Ukupno	
prisutan HER1 receptor				
manje od 11 %	6/6	6/11	12/17	0,21
11 % do 30 %	0	3/11	3/17	
više od 30 %	0	2/11	2/17	
Ukupno	6/6	11/11	17/17	
prisutan e-cadherin				
manje od 11 %	0	2 (7)	2 (3)	0,16
11 % do 30 %	1 (4)	4 (13)	5 (9)	
više od 30 %	27 (96)	24 (80)	51 (88)	
Ukupno	28 (100)	30 (100)	58 (100)	

*Fisherov egzaktni test

U skupini trostruko negativnih karcinoma dojke najviše tvorbi, čak 14 promjera je do 2 cm (47 %) , od kojih 9/19 nema pozitivne stanice HER1 receptora. Jednak broj ispitanica ima, odnosno nema metastaze. Ispitanice s metastazama, ukoliko imaju prisutan HER1 receptor on je kod 2/3 s 11 % do 30 % pozitivnih stanica, a 1/2 ima više od 30 % pozitivnih stanica.

Prema gradusu (stupnju diferencijacije) većinom je 19 (64 %) slabo diferencirano. Her2 amplifikacija, receptori estrogena i progesterona su negativni. Nema značajnih razlika prema učestalosti HER1 receptora (Tablica 5.5).

Tablica 5.5. Raspodjela uzoraka prema HER1 receptoru i parametrima kod trostruko negativnih karcinoma dojke.

Trostruko negativni karcinomi dojke	Broj (%) uzoraka prema HER1 receptoru					P*
	nema pozitivnih stanica	< 11% pozitivnih stanica	11% do 30% pozitivnih stanica	> 30 % pozitivnih stanica	Ukupno	
Veličina prema TNM klasifikaciji						
promjer do 2 cm	9/19	3/6	1/3	1/2	14 (47)	0,48
promjer 2 do 5 cm	8/19	1/6	2/3	0	11 (37)	
promjer veći od 5 cm	2/19	2/6	0	1/2	5 (16)	
Metastaze						
Nema metastaza	9/19	4/6	1/3	1/2	15 (50)	0,86
Ima metastaza	10/19	2/6	2/3	1/2	15 (50)	
Gradus (stupanj diferencijacije)						
I – dobro diferencirani	0	1/6	0	0	1 (3)	0,16
II – srednje diferencirani	5/19	3/6	2/3	0	10 (33)	
III – slabo diferencirani	14/19	2/6	1/3	2/2	19 (64)	
HER2 amplifikacija						
Negativno	19/19	6/6	3/3	2/2	30 (100)	-
Estrogen receptor						
Negativno	19/19	6/6	3/3	2/2	30 (100)	-
Progesteron receptor						
Negativno	19/19	6/6	3/3	2/2	30 (100)	-
Ukupno	19/19	6/6	3/3	2/2	30 (100)	

*Fisherov egzaktni test

U ostalim skupinama karcinoma dojke najviše tvorbi je promjera do 2 cm, 15 (50 %) te od 2 do 5 cm, njih 12 (40 %). Metastaze ima 19 (63 %) ispitanica. Prema gradusu (stupnju diferencijacije) većinom je 13 (43 %) srednje diferencirano. Pozitivnu Her2 amplifikaciju ima 6 (20 %) ispitanica, receptore estrogena njih 27 (90 %) i progesterona njih 25 (83 %). Nema značajnih razlika prema učestalosti HER1 receptora (Tablica 5.6.)

Tablica 5.6. Raspodjela uzoraka prema HER1 receptoru i parametrima kod ostalih skupina karcinoma dojke.

Ostale skupine karcinoma dojke	Broj (%) uzoraka prema HER1 receptoru			P*
	nema	< 11%	Ukupno	
	pozitivnih stanica	pozitivnih stanica		
Veličina prema TNM klasifikaciji				
promjer do 2 cm	13/24	2/6	15 (50)	0,49
promjer 2 do 5 cm	9/24	3/6	12 (40)	
promjer veći od 5 cm	1/24	1/6	2 (7)	
Infiltracija prsnog koša, kože dojke	1/24	0	1 (3)	
Metastaze				
Nema metastaza	10/24	1/6	11 (37)	0,37
Ima metastaza	14/24	5/6	19 (63)	
Gradus (stupanj diferencijacije)				
I – dobro diferencirani	8/24	1/6	9 (30)	0,73
II – srednje diferencirani	10/24	3/6	13 (43)	
III – slabo diferencirani	6/24	2/6	8 (27)	
HER2 amplifikacija				
Negativno	19/24	5/6	24 (80)	> 0,99
Pozitivno	5/24	1/6	6 (20)	
Estrogen receptor				
Negativno	2/24	1/6	3 (10)	0,50
Pozitivno	22/24	5/6	27 (90)	
Progesteron receptor				
Negativno	4/24	1/6	5 (17)	> 0,99
Pozitivno	20/24	5/6	25 (83)	
Ukupno	24/24	6/6	30 (100)	

*Fisherov egzakti test

Nema značajnih razlika u učestalosti ekspresije e-cadherina prema TNM klasifikaciji, pojavnosti metastaza, stupnju diferencijacije te amplifikaciji HER2 kod trostruko negativnih karcinoma dojke (Tablica 5.7.).

Tablica 5.7. Raspodjela uzoraka prema e-cadherinu i parametrima kod trostruko negativnih karcinoma dojke.

		Broj (%) uzoraka prema e-cadherin					
Trostruko negativni karcinomi dojke		nema pozitivnih stanica	< 11% pozitivnih stanica	11% do 30% pozitivnih stanica	> 30 % pozitivnih stanica	Ukupno	p*
Veličina prema TNM klasifikaciji							
promjer do 2 cm	-	1/2	3/4	10/24	14 (47)	0,53	
promjer 2 do 5 cm	-	1/2	0	10/24	11 (37)		
promjer veći od 5 cm	-	0	1/4	4/24	5 (16)		
Metastaze							
Nema metastaza	-	0	4/4	11/24	15 (50)	0,05	
Ima metastaza	-	2/2	0	13/24	15 (50)		
Gradus (stupanj diferencijacije)							
I – dobro diferencirani	-	0	0	1/24	1 (3)	0,84	
II – srednje diferencirani	-	0	1/4	9/24	10 (33)		
III – slabo diferencirani	-	2/2	3/4	14/24	19 (64)		
Her2 amplifikacija							
Negativno	-	2/2	4/4	24/24	30 (100)	-	
Estrogen receptor							
Negativno	-	2/2	4/4	24/24	30 (100)	-	
Progesteron receptor							
Negativno	-	2/2	4/4	24/24	30 (100)	-	
Ukupno	-	2/2	4/4	24/24	30 (100)		

*Fisherov egzakti test

Nema značajnih razlika u učestalosti ekspresije e-cadherina prema TNM klasifikaciji, pojavnosti metastaza, stupnju diferencijacije te amplifikaciji HER2 ostalih skupina karcinoma dojke (Tablica 5.8.).

Tablica 5.8. Raspodjela uzoraka prema ekspresiji e-cadherina i parametrima kod ostalih skupina karcinoma dojke.

	Broj (%) uzoraka prema e-cadherinu					
Ostale skupine karcinoma dojke	nema pozitivnih stanica	< 11% pozitivnih stanica	11% do 30% pozitivnih stanica	> 30 % pozitivnih stanica	Ukupno	P*
Veličina prema TNM klasifikaciji						
promjer do 2 cm	0	-	1/1	14/27	15 (50)	0,42
promjer 2 do 5 cm	2/2	-	0	10/27	12 (40)	
promjer veći od 5 cm	0	-	0	2/27	2 (7)	
Infiltracija prsnog koša, kože dojke	0	-	0	1/27	1 (3)	
Metastaze						
Nema metastaza	1/2	-	1/1	9/27	11 (37)	0,45
Ima metastaza	1/2	-	0	18/27	19 (63)	
Gradus (stupanj diferencijacije)						
I – dobro diferencirani	1/2	-	0	8/27	9 (30)	> 0,99
II – srednje diferencirani	1/2	-	1/1	11/27	13 (43)	
III – slabo diferencirani	0	-	0	8/27	8 (27)	
Her2 amplifikacija						
Pozitivno	2/2	-	1/1	21/27	24 (80)	> 0,99
Negativno	0	-	0	6/27	6 (20)	
Estrogen receptor						
Negativno	0	-	0	3/27	3 (10)	> 0,99
Pozitivno	2/2	-	1/1	24/27	27 (90)	
Progesteron receptor						
Negativno	0	-	0	5/27	5 (17)	> 0,99
Pozitivno	2/2	-	1/1	22/27	25 (83)	
Ukupno	2/2	-	1/1	27/27	30 (100)	

*Fisherov egzaktni test

U skupini trostruko negativnih karcinoma dojke nalaz bez pozitivnih HER1 receptora češći je kod mlađih žena srednje dobi 52 godinu (interkvartilnog raspona 41 do 66 godina), no bez značajnih razlika. Postotak stanica u diobi (Ki-67) pada s porastom stupnja ekspresije HER1 receptora, ali bez značajnih razlika.

Nalaz s manje od 11 % e-cadherina češći kod mlađih žena srednje dobi od 38 godinu (interkvartilnog raspona 25 do 33 godina), no bez značajnih razlika. Postotak stanica u diobi (Ki-67) značajno pada s porastom stupnja ekspresije e-cadherina (Kruskal Wallis test, $P = 0,02$) (Tablica 5.9.).

Tablica 5.9. Srednja dob i broj stanica u diobi (Ki-67) prema prisutnosti pozitivnih stanica HER1 receptora i e-cadherin u skupini trostruko negativnih karcinoma dojke.

Medijan (interkvartilni raspon) prema učestalosti						
Trostruko negativni karcinomi	nema pozitivnih stanica	< 11% pozitivnih stanica	11% do 30% pozitivnih stanica	> 30 % pozitivnih stanica	Ukupno	p*
HER1 receptor						
Dob (godina)	52 41 - 66)	70 (46 - 76)	60 (42 - 65)	58 (42 - 63)	64 (57 – 74)	0,43
Ki-67 (% stanica u diobi)	75 (60 - 80)	73 (18 - 86)	25 (5 - 75)	35 (19 - 53)	15 (9 – 25)	0,24
e-cadherin						
Dob (godina)	-	38 (25 - 33)	62 (36 - 77)	57 (46 - 68)	56 (44 - 69)	0,20
Ki-67 (% stanica u diobi)	-	78 (56 - 61)	88 (78 - 94)	60 (25 - 75)	68 (40 - 80)	0,02

*Kruskal Wallis test

U skupini ostalih karcinoma dojke nema značajnih razlika u dobi ispitanica i u postotku stanica u diobi (Ki-67) prema učestalosti ekspresije HER1 i e-cadherina (Tablica 5.10).

Tablica 5.10. Srednja dob i broj stanica u diobi (Ki-67) prema prisutnosti pozitivnih stanica HER1 receptora i e-cadherin u skupini ostalih karcinoma dojke.

Ostali dojke	karcinomi	Medijan (interkvartilni raspon) prema učestalosti					P*
		nema	< 11%	11 - 30%	> 30 %		
		pozitivnih	pozitivnih	pozitivnih	pozitivnih	Ukupno	
		stanica	stanica	stanica	stanica		
HER1 receptor							
Dob (godina)		66 (58 - 74)	58 (49 - 77)	-	-	64 (57 – 74)	0,45
Ki-67 (% stanica u diobi)		14 (9 - 24)	18 (8 - 66)	-	-	15 (9 – 25)	0,41
e-cadherin							
Dob (godina)		54 (52 - 56)	-	61 [†]	67 (57 - 75)	56 (44 - 69)	0,24
Ki-67 (% stanica u diobi)		14 (9 - 11)	-	30 [†]	15 (9 - 25)	68 (40 - 80)	0,51

*Mann Whitney U test: [†]samo jedna ispitanica;

6. RASPRAVA

Karcinom dojke najčešći je maligni tumor u žena. U Hrvatskoj prema podacima HZJZ godišnje oko 800 žena umire od raka dojke. Primijećen je i stalni porast novooboljelih i to osobito u razvijenim zemljama svijeta. Za procjenu konačne dijagnoze i određivanje moguće terapije koriste se prognostički faktori. U njih ubrajamo veličinu tumora, postojanje i proširenost lokalnih metastaza u pazušnim limfnim čvorovima, stupanj diferencijacije (gradus) tumorskog tkiva, status hormonskih receptora u jezgrama tumorskih stanica (ER, PR), stupanj amplifikacije Her2 gena, kao i stupanj proliferacije tumorskih stanica imunohistokemijski mjeren pomoću Ki-67 antitijela.

TNBC čini 10-20 % svih karcinoma dojke (12). Literaturni navodi istovjetno prikazuju karakteristike TNBC-a. Prikazuje ga se kao slabo diferenciranog tumor visokog histološkog gradusa i rizika od relapsa, agresivnog tijeka i brzog metastaziranja (najčešće u mozak) te se češće javlja u žena mlađe životne dobi (21).

Ova vrsta karcinom teška je za liječenje baš iz razloga što ne eksprimira estrogenske, progesteronske i Her2 receptore. Zbog hormonske negativnosti ne može reagirati na antihormonsku specifičnu i ciljanu terapiju. Također ne reagira niti na terapiju trastuzumabom (Herceptinom) jer izostaje amplifikacija HER2 gena i ekspresija istoimenih receptora. U početku se nailazi na dobar odgovor kod liječenja pomoću konvencionalnih kemoterapeutika, ali ubrzo dolazi do relapsa bolesti što vodi k sve lošijoj prognozi za bolesnice (15,16).

Vođeni prikupljenim podacima različitih autora o ovoj temi krenuli smo u istraživanje vidjeti da li bi rezultati ekspresije HER1 i e-cadherina mogli pridonijeti u razvoju novih mogućnosti liječenja te vrste karcinoma. Česta ekspresija HER 1 (EGFR-a) znak je lošije prognoze u mnogim tumorima pa tako i karcinomu dojke, te je time atraktivan u terapijskim istraživanjima (6-8). Stanična adhezivna molekula e-cadherin izražena je između ostalog i kao supresor metastaza. Neka su eksperimentalna istraživanja pokazala da manjak e-cadherina ima ključnu ulogu u invazivnosti i metastaziranju nekih tumora.

Ovo je istraživanje obuhvatilo ukupno 60 uzoraka tumorskog tkiva karcinoma dojke u žena. Formirane su dvije skupine ispitanica: 30 ispitanica kojima je dijagnosticiran trostruko negativni karcinom dojke (TNBC) i 30 ispitanica (kontrolna skupina) koje su obuhvaćene pod dijagnozom ostalih tipova karcinoma dojke.

Značajnija razlika u ove dvije skupine nije nađena kada se gleda razlika u veličini tumora u vrijeme provedene dijagnostike i operacijskog liječenja i prisutnosti metastaza u pazušnim limfnim čvorovima. Ovaj podatak i ne iznenađuje jer otkrivanje raka dojke više ovisi o drugim faktorima nego li o tipu tumora (dostupnost zdravstvene zaštite, upućenost bolesnica na samopregled i redovite preglede, odziv na program ranog otkrivanja itd). Statistički značajna razlika utvrđena je u usporedbi gradusa (stupnja diferencijacija) ovih tumora. Značajno više slabo diferenciranih tumora bilo je u skupini trostruko negativnog karcinom dojke (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$). Slabiju diferencijaciju, kao i raniji relaps bolesti zbog agresivnosti te vrste tumora dojke dokazali su u svojem istraživanju i Buer i suradnici (22).

Srednja dob svih ispitanica bila je 60 godina (51 – 72 godine). Utvrđeno je da su značajno mlađe ispitanice s trostruko negativnim karcinomom (Mann Whitney U test, $P = 0,03$). Isto se navodi u istraživanju kojeg su proveli Ruijter i suradnici (14). Mitotska aktivnost tumorskog tkiva utvrđivana je imunohistokemijski određivanjem ekspresije Ki-67 u jezgrama tumorskih stanica. Dokazano je da je mitotska aktivnost značajno viša u skupini trostruko negativnih karcinoma dojke u odnosu na ostale podskupine raka dojke (Mann Whitney U test, $P < 0,001$). Visoka mitotska aktivnost upućuje na bržu progresiju tumora, lošiju prognozu bolesti, veći rizik povratka bolesti i metastaziranja što je potvrđeno i publiciranim istraživanjima drugih autora (13,20,22).

Ekspresija HER1 receptora nije prisutna kod 72 % ispitanih uzoraka, dok je ekspresija e-cadherina utvrđena čak u 97 % ispitanica, bez statistički značajne razlike prema tome radi li se o skupini trostruko negativnog ili ostalog tipa karcinoma dojke. Naši rezultati tako pokazuju kako nema značajne razlike u ekspresiji promatranih receptora u istraživanim skupinama, što nije u skladu s postavljenom hipotezom. Naime, zbog slabije prognoze i preživljenja, očekivala bi se veća ekspresija HER1 receptora preko kojih bi različiti čimbenici djelovali na brži rast tumora, kao i izostanak ili smanjena ekspresija e-cadherina zaslužna za slabiju koheziju i lakše raspršivanje tumorskih stanica i brži nastanak metastaza. Uz ogradu kako je istraživani uzorak relativno malen.

U skupini ispitanica s prisutnim HER1 receptorom, najviše je ispitanica s ekspresijom 1+ (manje od 11 %) i to 20 %, dok je ekspresija od 3+ (više od 30 %) utvrđena je samo u dvije ispitanice (3 %) bez značajne razlike prema skupinama. Više od 30 % (3+) prisutnosti e-

cadherina ima 51 ispitanica (njih 86%), a manje od 11 % (1+) dvije ispitanice (3 %), također bez značajne razlike prema skupinama.

Analiza dobivenih rezultata u raspodjeli uzoraka ekspresije HER1 receptora u skupini trostruko negativnih karcinoma dojke prema veličini tumora, prisutnosti pazušnih metastaza, stupnju diferencijacije, HER2 amplifikaciji i pozitivnim hormonskim (ER i PR) receptorima pokazala je da nema značajnih razlika. Prema nekim istraživanjima povišena ekspresija HER1-a korelira s opadanjem dužine razdoblja bez pojave bolesti. Do tih saznanja dolazimo iz istraživanja Donggena i suradnika (23).

Analiza rezultata u raspodjeli uzoraka ekspresije HER1 receptora u kontrolnoj skupini (ostali karcinomi) prema navedenim parametrima također nije pokazala statistički značajnijih razlika.

Ista su ispitivanja provedena i u raspodjeli uzoraka prema ekspresiji e-cadherina u obje skupine u odnosu prema veličini tumora, postojanju pazušnih metastaza, stupnju diferencijacije tumorskog tkiva, amplifikaciji HER2 gena i pojavnosti ER i PR te je utvrđeno da u obje skupine nema značajnih razlika.

Potrebno je naglasiti kako je u skupini trostruko negativnih karcinoma dojke utvrđen nalaz bez pozitivnih HER1 receptora češći kod mlađih žena, no bez značajnih razlika u odnosu na skupine s nalazom pozitivnih HER1 receptora. Postotak stanica u diobi (Ki-67) pada s porastom stupnja ekspresije HER1 receptora, ali bez značajnih razlika.

Nalaz s manje od 11 % ekspresije e-cadherina (1+) češći je kod mlađih žena oboljelih od trostruko negativnog karcinoma dojke, no bez značajnih razlika u odnosu na skupine s pozitivnom ekspresijom e-cadherina. Postotak stanica u diobi međutim značajno opada s porastom stupnja ekspresije e-cadherina (Kruskal Wallis test, $P = 0,02$).

U kontrolnoj skupini nisu utvrđene statistički značajne razlike u dobi ispitanica i u postotku stanica u diobi prema stupnju ekspresije HER1 receptora i e-cadherina.

Postoje istraživanja koja ukazuju na značaj određivanja ekspresije e-cadherina u trostruko negativnom karcinomu dojke (24,25). Primjerice, utvrđena je statistički značajno smanjena ekspresija e-cadherina u TNBC ($P < 0.001$). Nadalje u 123 bolesnice s TNBC prognoza onih s negativnom ekspresijom e-cadherina bila je značajno lošija od e-cadherin pozitivnih bolesnica ($P=0.0265$) (24).

Značaj istraživanja je, kako je već spomenuto, u osmišljanju novih strategija liječenja bolesnica s trostruko negativnim karcinom dojke. Kemoterapija je i dalje osnovni način liječenja. Lijekovi koji se koriste su antraciklini, taksani, iksabepilon i platina. Suvremeni pristup liječenju karakterizira primjerice EGFR inhibicija, ali još uvijek s dvojbenim rezultatima (26). Prema rezultatima našeg istraživanja, ekspresija HER1 (EGFR) receptora i e-cadherina u trostruko negativnom karcinomu dojke u odnosu na ostale podskupine karcinoma dojke ne pokazuje statistički značajne razlike, što bi upućivalo na zaključak kako HER1 i e-cadherin nemaju značajniji terapijski potencijal. Zbog relativno malog uzorka, studija je ograničenog značaja.

7. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Statistički značajno je bilo više slabo diferenciranih tumora u skupini trostruko negativnog karcinom dojke ($P < 0,001$).
2. Bolesnice oboljele od trostruko negativnog karcinoma dojke su značajnije mlađe dobne skupine od bolesnica oboljelih od ostalih tipova raka dojke ($P=0,03$).
3. Statistički značajno je veća mitotska aktivnost u skupini trostruko negativnih karcinoma dojke u odnosu na ostale podskupine raka dojke ($P < 0,001$).
4. E-cadherin pokazuje veću prisutnost od HER1 bez statistički značajne razlike između dvije promatrane skupine karcinoma dojke.
5. U obje skupine nema značajnih razlika u ekspresiji HER1 i e-cadherina prema veličini tumora, nazočnosti metastaza u limfnim čvorovima, stupnju diferencijacije tumora, dobi bolesnica, ekspresiji hormonskih (ER i PR) receptora, amplifikaciji HER2 gena i mitotskoj aktivnosti tumora.
6. U TNBC skupini, negativan HER1 češći je kod mlađih žena, no bez značajnih razlika. Postotak stanica u diobi (Ki-67) pada s porastom stupnja ekspresije HER1 receptora i e-cadherina, ali bez značajnih razlika. Nalaz s manje od 11 % ekspresije e-cadherina češći je kod mlađih žena, no bez značajnih razlika.
7. U skupini ostalih karcinoma dojke (kontrolnoj skupini) nema značajnih razlika u dobi ispitanica i u postotku stanica u diobi (Ki-67) prema učestalosti HER1 receptora i e-cadherina.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Imunohistokemijski usporediti pojavnost HER1 i e-cadherina u tumorskim stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke (TNBC) i u ostalim karcinomima dojke.

Ustroj studije: Retrospektivna studija.

Ispitanici i metode: Istraživanje je provedeno na 30 uzoraka tumorskog tkiva pacijentica kod kojih je dijagnosticiran TNBC i 30 uzoraka tumorskog tkiva ostalih karcinoma dojke. Imunohistokemijska pojavnost HER1 i e-cadherina procijenjena je semikvantitativno prema postotku pozitivno obojenih stanica: 0 (negativno), 1+ (do 11 % pozitivnih tumorskih stanica), 2+ (11-30 % tumorskih stanica), 3+ (30 % i više pozitivnih tumorskih stanica).

Rezultati: Statistički značajno bilo je više slabo diferenciranih tumora u skupini trostruko negativnog karcinoma dojke ($P < 0,001$). Bolesnice oboljele od trostruko negativnog karcinoma dojke su značajnije mlađe dobne skupine od bolesnica oboljelih od ostalih tipova raka dojke ($P = 0,03$). Statistički značajno je veća mitotska aktivnost u skupini trostruko negativnih karcinoma dojke u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,001$). U obje skupine nema značajnih razlika u ekspresiji HER1 i e-cadherina prema veličini tumora, nazočnosti metastaza u limfnim čvorovima, stupnju diferencijacije tumora, dobi bolesnica, ekspresiji hormonskih (ER i PR) receptora, amplifikaciji HER2 gena i mitotskoj aktivnosti tumora.

Zaključak: Pojavnost HER1 (HER1) receptora i e-cadherina u trostruko negativnom karcinomu dojke u odnosu na ostale podskupine karcinoma dojke ne pokazuje statistički značajne razlike što upućuje na zaključak kako HER1 i e-cadherin nemaju značajniji terapijski potencijal u ovoj skupini raka dojke.

Ključne riječi: Trostruko negativni karcinom dojke, receptor epidermalnog čimbenika rasta, e-cadherin.

9. SUMMARY

HER1 RECEPTOR OVEREXPRESSION AND E-CADHERIN EXPRESSION IN THE TRIPLE NEGATIVE BREAST CARCINOMA

OBJECTIVES: The aim of this study was to immunohistochemically compare the occurrence of HER1 and e-cadherin in triple negative breast cancer tumour cells (TNBC) with other breast cancer.

STUDY DESIGN: Retrospective study

PARTICIPANTS AND METHODS: The study was conducted on 30 samples of tumour tissue samples from patients diagnosed with TNBC and 30 tumour tissue samples of other breast cancers. Immunohistochemistry of HER1 and e-cadherin was evaluated semi-quantitatively, according to the percentage of positively coloured cells: 0 (negative), 1+ (up to 11% of positive tumour cells), 2+ (11 – 30% tumour cells), 3+ (30% and more positive tumour cells).

RESULTS: Statistically there were significantly fewer poorly differentiated tumours in the group of triple negative breast cancer ($P < 0.001$). Patients suffering from triple negative breast cancer are significantly younger than patients with other breast cancer types ($P = 0.03$). There is statistically significantly higher mitotic activity in the group of triple negative breast cancer compared to the control group ($P < 0.001$). There are no significant differences in the expression of HER1 and e-cadherin in tumour size, lymph node metastases, degree of tumour differentiation, patients' age, hormone (ER and PR) receptor expression, HER2 gene amplification, and mitotic tumour activity.

CONCLUSION: The occurrence of HER1 (HER1) receptors and e-cadherin in triple negative breast cancer does not show statistically significant differences in comparison to other breast cancer subgroups, suggesting that so far HER1 and e-cadherin have no significant therapeutic potential.

KEY WORDS: triple negative breast cancer, epidermal growth factor receptor, e-cadherin

10. LITERATURA

1. Vrdoljak E., Šamija M., Kusić Z., Petković M., Gugić D., Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014., Bilten 39, Zagreb, 2016. Dostupno s: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2014_final.pdf
3. Bešlija S., Vrbanc D. Medicinska/internistička onkologija, Sarajevo: Medicinski fakultet: Udruženje onkologa Bosne i Hercegovine, 2014.
4. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija, četvrto izdanje. Medicinska naklada: Zagreb 2014; 639-58.
5. Rosai J., Lauren V. Kirurška patologija - Prijevod devetoga američkog izdanja. Zagreb: Školska knjiga; 2010.
6. Oparić M., Granić M. Tumori dojke. Beograd: MP grafomed Bor; 1996.
7. Arteaga C. Targeting HER1/EGFR: A molecular approach to cancer therapy. Seminars in oncology. 2003; 30 (7): 3-14.
8. Gunderson L, Tepper J, V. Waxwieler T, Raben D. Clinical radiation oncology, 4th edition; 5. chapter, Elsevier; 2015.
9. Ricciardi GRR, Adamo B, Ieni A, Licata L, Cardia R, Ferraro G, i sur. Androgen Receptor (AR), E Cadherin, and Ki67 as Emerging Targets and Novel Prognostic Markers in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) Patients. Plos One. 2015; 10(7) 1-11.
10. Chen YH, Hancock BA, Solzak JP, Brinza D, Scafe C, Miller KD, i sur. Next-generation sequencing of circulating tumor DNA to predict recurrence in triple-negative breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy. Npj Breast Cancer 2017;3:24. Dostupno s: <https://www.nature.com/articles/s41523-017-0028-4>
11. Camorani S, Crescenzi E, Gramanzini M, Fedele M, Zannetti A, Cerchia L. Aptamer-mediated impairment of EGFR-integrin $\alpha\beta 3$ complex inhibits vasculogenic mimicry and growth of triple-negative breast cancers. Sci. Rep. 2017; 7. Dostupno s: <https://www.nature.com/articles/srep46659>
12. Kim JY, Lee H, Woo J, Yue W, Kim K, Choi S, i sur. Reconstruction of pathway modification induced by nicotinamide using multi-omic network analyses in triple

- negative breast cancer. *Sci. Rep.* 2017; 7. Dostupno s:
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-03322-7>
13. Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JPJ, van England M, Heijnen VCT. Characters of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137:183-192
 14. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010; 7, 683-692
 15. Lin W, Huang J, Yuan Z, Feng S, Xie Y, Ma W. Protein kinase C inhibitor chelerythrine selectively inhibits proliferation of triple-negative breast cancer cells. *Sci. Rep.* 2017; 7. Dostupno s: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-02222-0>
 16. Song W, Hwang Y, Youngblood WM, Cook RS, Balko JM, Chen J, i sur. Targeting EphA2 impairs cell cycle progression and growth of basal-like/triple-negative breast cancers. *Oncogene.* 2017; 10.1038/onc.2017.170 Dostupno s:
<http://www.nature.com/onc/journal/vaop/ncurrent/full/onc2017170a.html>
 17. Solzak P, Atale RV, Hancock BA, Sinn AL, Pollok KE, Jones DR, i sur. Dual PI3K and Wnt pathway inhibition is a synergistic combination against triple negative breast cancer. *npj Breast Cancer.* 2017; 3:17. Dostupno s: <https://www.nature.com/articles/s41523-017-0016-8>
 18. Blake A, Dragan M, Tirona RG, Hardy DB, Brackstone M, Tuck AB, i sur. G protein-coupled KISS1 receptor is overexpressed in triple negative breast cancer and promotes drug resistance. *Sci. Rep.* 2017; 7. Dostupno s:
<https://www.nature.com/articles/srep46525>
 19. Glavina-Durdov M. Biologija novotvorina - Imunohistokemija u istraživanju novotvorina. Sveučilište u Splitu - poslijediplomski studijski program. 2011. Dostupno s:
http://neuron.mefst.hr/docs/graduate%20school/novotvorine/popis_predmeta/IHKmetode/Imunohistokemija.pdf
 20. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 139 (2), 539–552. Dostupno s: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-013-2560-8>
 21. Chacón RD, Costanzo MV. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research* 2010; 12(2):S3. Dostupno s: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/bcr2574?site=breast-cancer-research.biomedcentral.com>
 22. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative

- invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. American cancer society. 2007; 109(9) 1721–1728. Dostupno s :
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.22618/full>
23. Donggen L, Jiehua H, Zhongyu Y, Shusen W, Roujun P, Yanxia Shi, i sur. EGFR expression correlates with decreased disease-free survival in triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. Med Oncol. 2012; 29(2):401-5
 Dostupno s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264531>
 24. Kashiwagi S, Yashiro M, Takashima T, Nomura S, Noda S, Kawajiri H, i sur. Significance of E-cadherin expression in triple negative breast cancer. Br J Cancer 2010; 103: 249-55.
 25. Li P, Sun T, Yuan Q, Pan G, Zhang J, Sun D. The expressions of NEDD9 and E-cadherin correlate with metastasis and poor prognosis in triple-negative breast cancer patients. Onco Targets Ther. 2016; 19: 5751-9.
 26. Hudis CA, Gianni L. Tripple Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. The Oncologist 2011; 16(1): 1–11.

11. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI:

Ime i prezime: Ana Banović (djevojačko Budiša)

Datum i mjesto rođenja: 23.07.2017 u Splitu

Adresa prebivališta: Gomile 47, 21216 Kaštel stari

Adresa boravišta: Dubrovačka 33, 31000 Osijek

Tel. 0977278191, e-mail: budisa.ana@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2006. godine - završavam Osnovnu školu Mertojak, Split

2006 - 2010. godine - Zdravstvena škola Split; smjer: Zdravstveno laboratorijski tehničar

2010. - 2013. godine – Zdravstveno veleučilište Zagreb

Naziv dodijeljene kvalifikacije: Prvostupnica medicinsko laboratorijske dijagnostike

2014. – 2017. godine – Medicinski fakultet Osijek

Diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

RADNO ISKUSTVO:

2012. – 2013. godine – Demonstrator tijekom nastave iz predmeta Histologija za studente med. lab. dijag. Zavod za histologiju i embriologiju, Zagreb

prosinac 2013. – prosinac 2014. godine – Stručno osposobljavanje za samostalan rad za radno mjesto prvostupnika medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinsko-biokemijski laboratorij Bojčić, Vlainić u Osijeku

lipanj 2015. – kolovoz 2015. – radni odnos na određeno, Medicinsko-biokemijski laboratorij Bojčić, Vlainić u Osijeku

studen 2015. – siječanj 2016. - radni odnos na određeno, Biokemijski laboratorij, OB Dr. J. Benčević, Slavonski Brod

siječanj 2016. godine- do danas – radni odnos na neodređeno, KBC Osijek – Klinički zavod za patologiju i sudsku medicinu

STRUČNO USAVRŠAVANJE

travanj 2012. godine – 4. Hrvatski kongres laboratorijske dijagnostike s međunarodnim sudjelovanjem, predavač: Banović M, Budiša A., Znanje studenata o HIV-u. Opatija

studen 2012. godine – Konferencija sa međunarodnim sudjelovanjem. „ Stare i nove virusne bolesti.- što znamo o njima “. predavač: Banović M, Budiša A., Znanje studenata o HIV-u. Osijek

studen 2013. godine - Konferencija s međunarodnim sudjelovanjem. „ Krvlju prenosive bolesti – prevencija, dijagnostika, liječenje “ kao slušač. Osijek

lipanj 2015. godine – „Ninth ISABS conference on forensic and anthropologic genetics and mayo clinic lectures in individualized medicine“ kao slušač. Bol (Brač)

listopad 2015. godine. – Kongres „Nacionalni program ranog otkrivanja raka vrata maternice: Možemo li bolje?“ kao slušač. Osijek

studen 2015. godine – Međunarodni kongres „Zdravlje i zdravstvena zaštita 2015. – 2030.“ Futur Z; kao slušač. Opatija

travanj 2016. – Kongres „Uloga liječnika obiteljske medicine u Nacionalnim programima ranog otkrivanja raka“ kao slušač. Osijek

OSTALE AKTIVNOSTI

svibanj 2013. godine. – Sudjelovanje na Sportsko edukativnom natjecanju biomedicinskih znanosti – Humanijada. BiH(Fojnica)

veljača 2014. godine – aktivni volonter mladeži Hrvatskog crvenog križa

listopad 2015. godine – Volonter u projektu “Bolnica za medvjediće” u Gunji

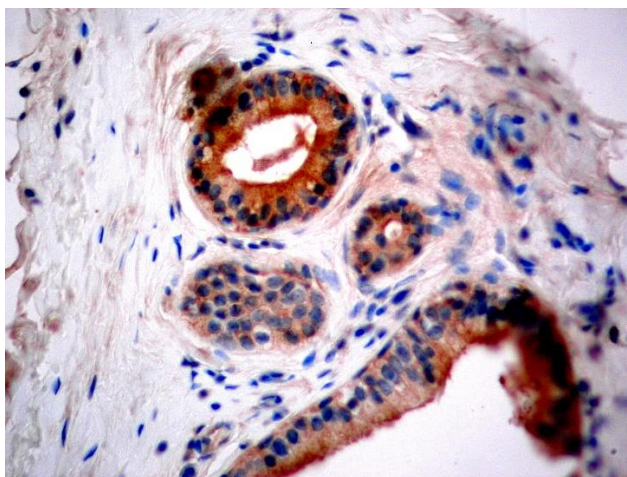
ak. godina 2015/2016 – tajnica; Udruga studenata medicinsko laboratorijske dijagnostike (CMLDSA). Osijek

ak. godina 2016/2017 – potpredsjednica; Udruga studenata medicinsko laboratorijske dijagnostike (CMLDSA). Osijek

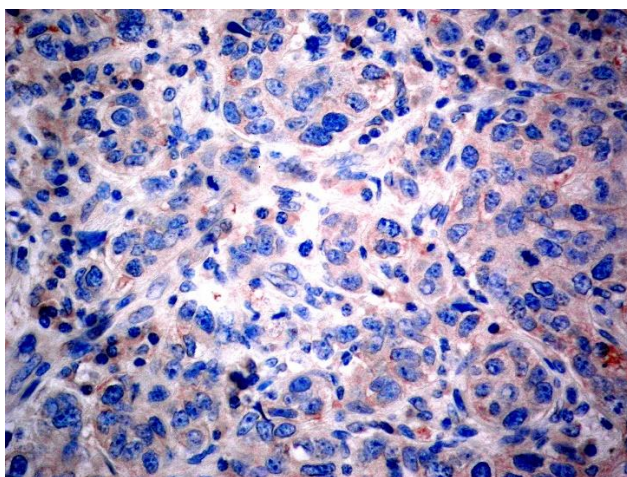
travanj 2017. – Festival znanosti, Osijek

12. PRILOZI

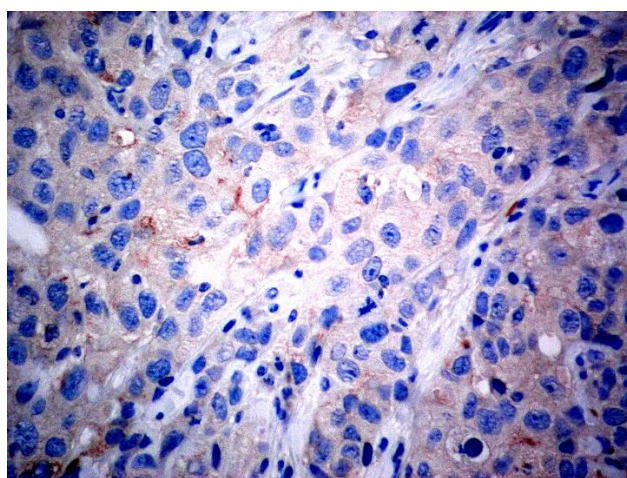
Prilog 1. Slikovni prikaz izražaja HER1 receptora u istraživanih tumora



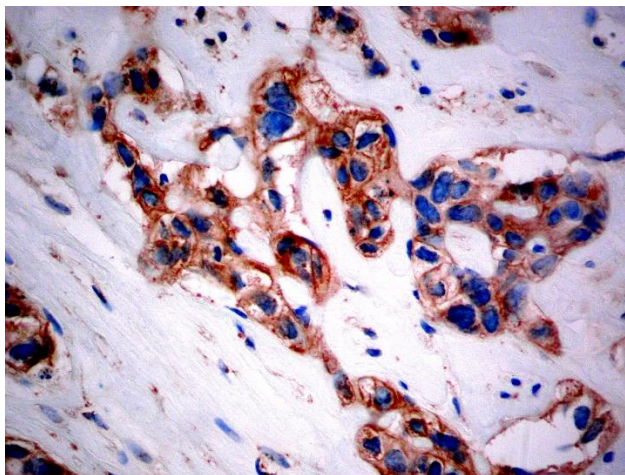
Slika 1. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 52/2011, HER1, $\times 200$.



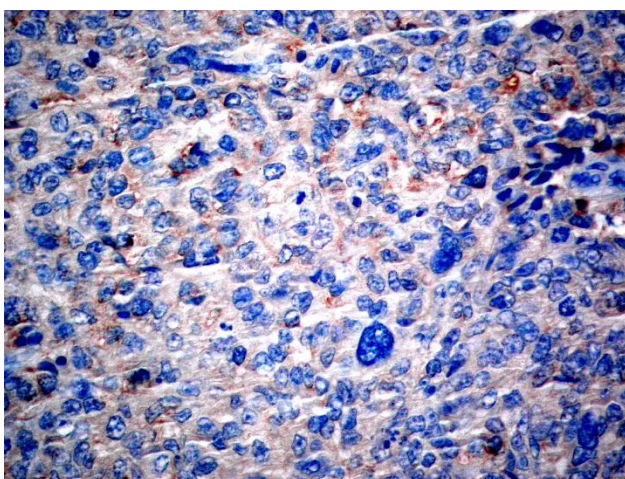
Slika 2. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 174/2011, HER1, $\times 200$.



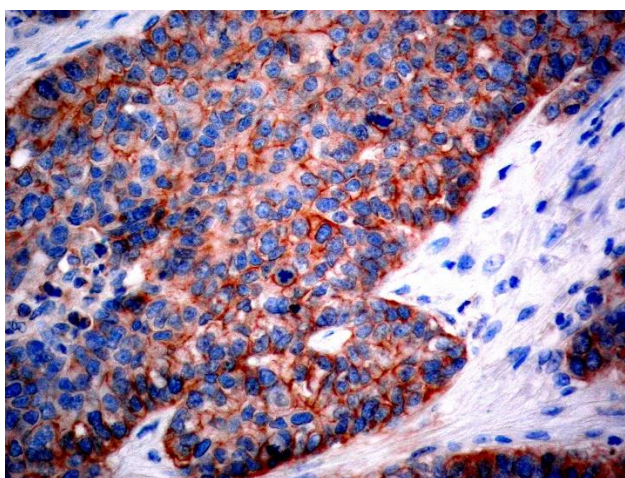
Slika 3. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 516/2010, HER1, $\times 200$.



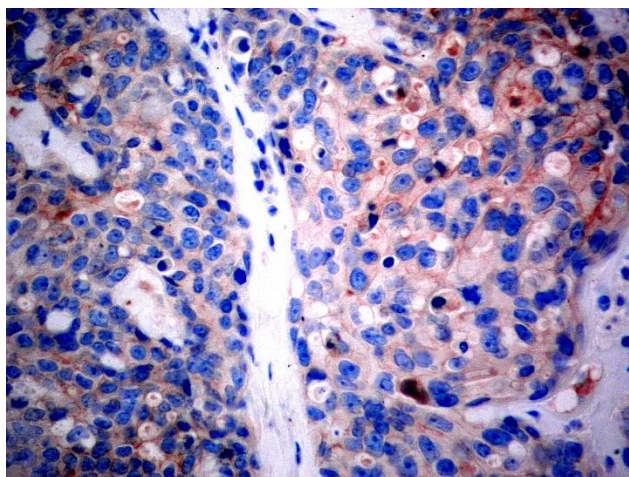
Slika 4. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 1035/2011, HER1, $\times 200$.



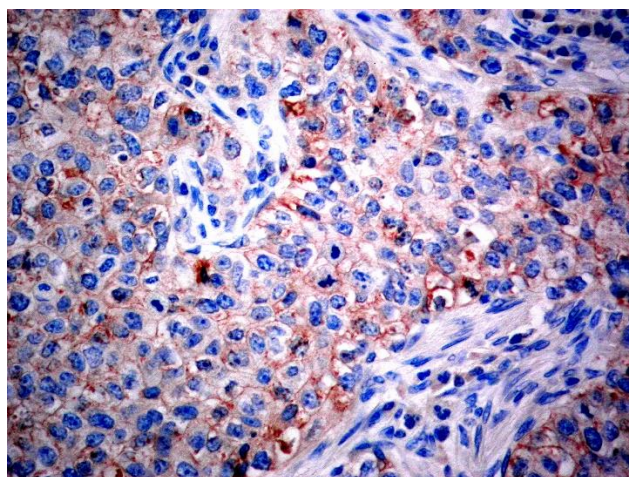
Slika 5. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 1424/2010, HER1, $\times 200$.



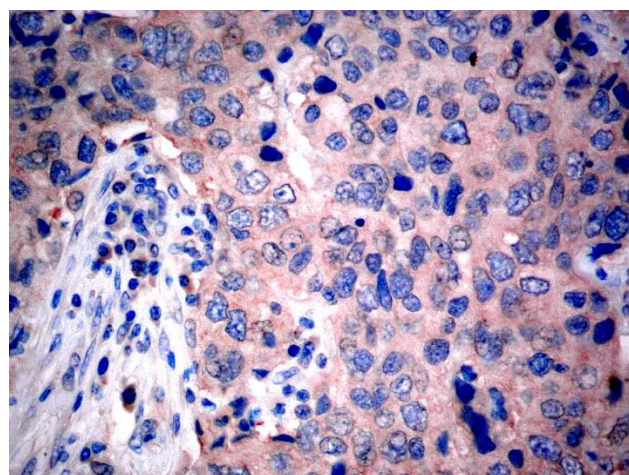
Slika 6. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 1564/2011, HER1, $\times 200$.



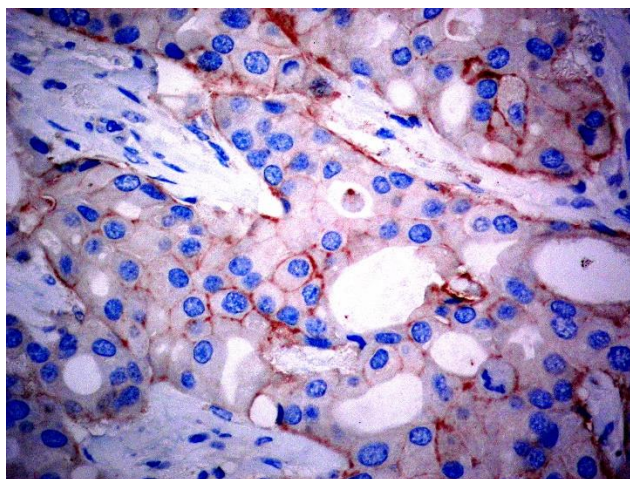
Slika 7. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 3741/2011, HER1, $\times 200$.



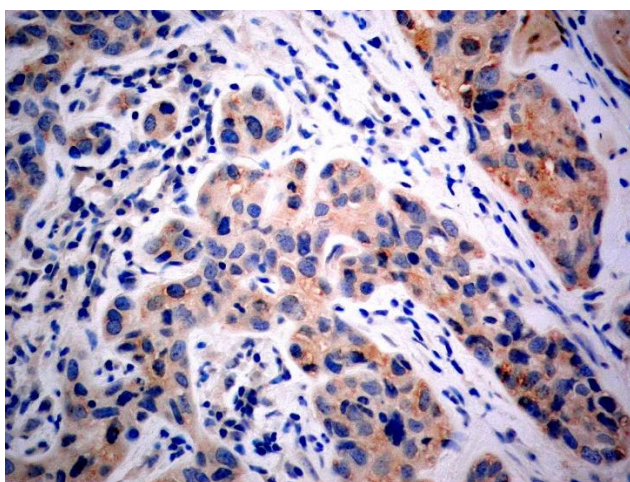
Slika 8. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 3915/2011, HER1, $\times 200$.



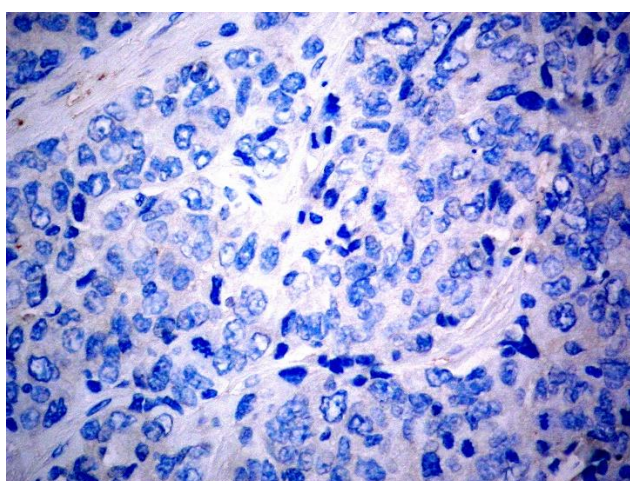
Slika 9. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 4130/2011, HER1, $\times 200$.



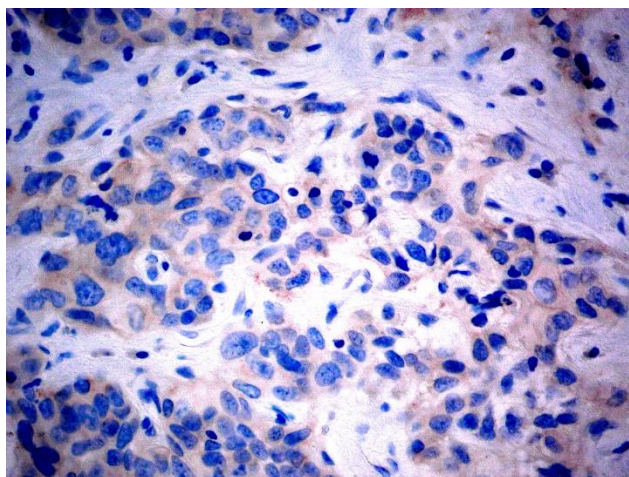
Slika 10. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 5077/2011, HER1, $\times 200$.



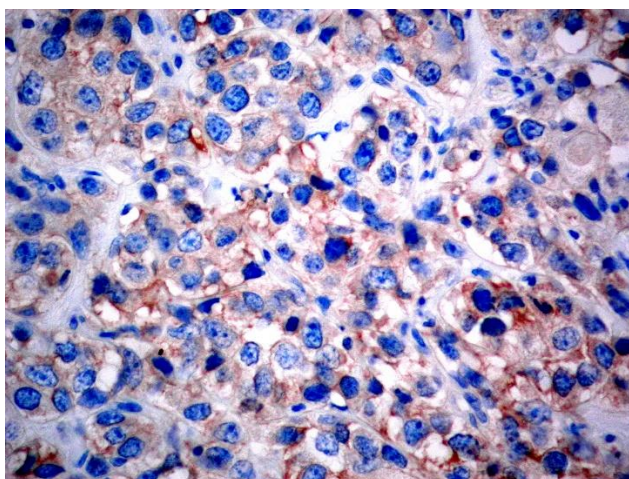
Slika 11. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 6422/2011, HER1, $\times 200$.



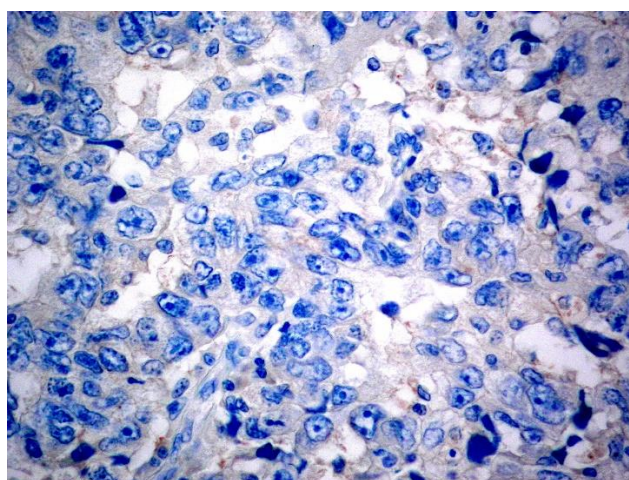
Slika 12. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 6547/2011, HER1, $\times 200$.



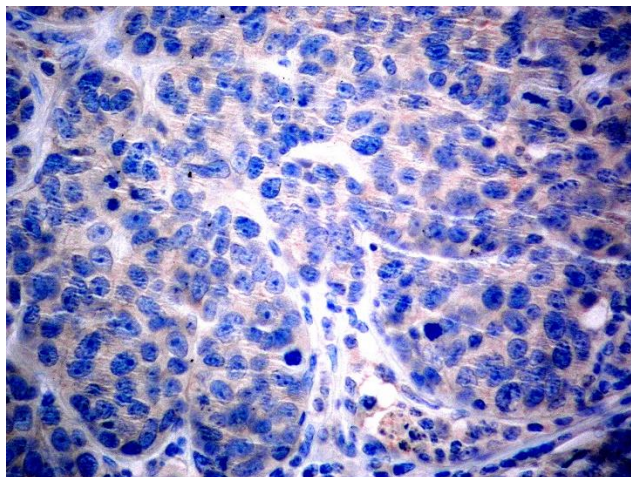
Slika 13. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 6780/2011, HER1, $\times 200$.



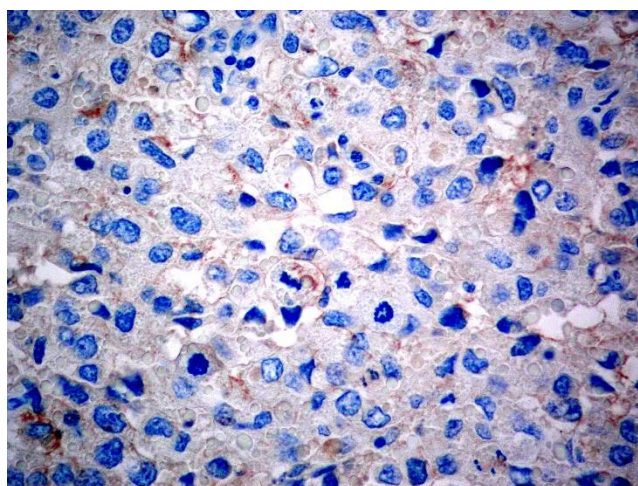
Slika 14. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8397/2011, HER1, $\times 200$.



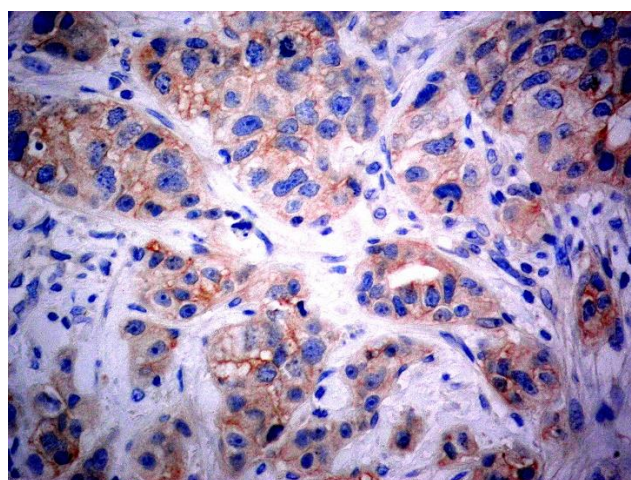
Slika 15. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8539/2010, HER1, $\times 200$.



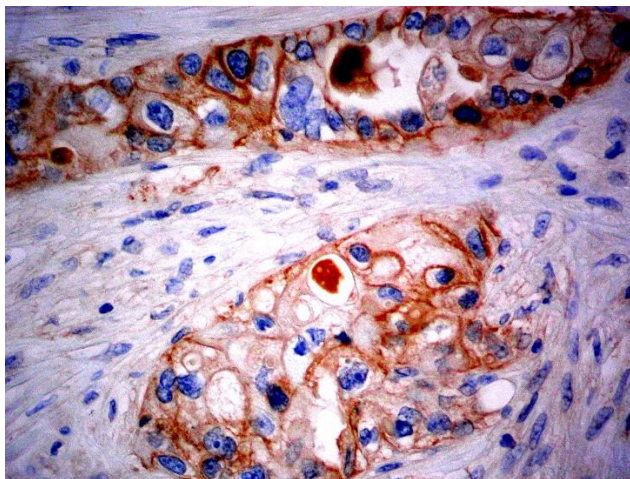
Slika 16. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8585/2011, HER1, $\times 200$.



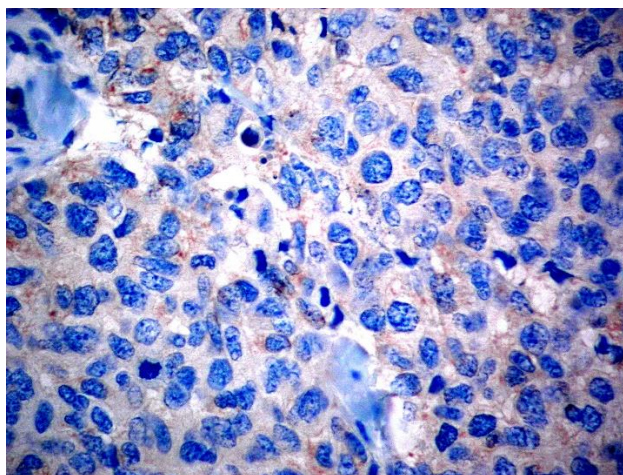
Slika 17. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8741/2010, HER1, $\times 200$.



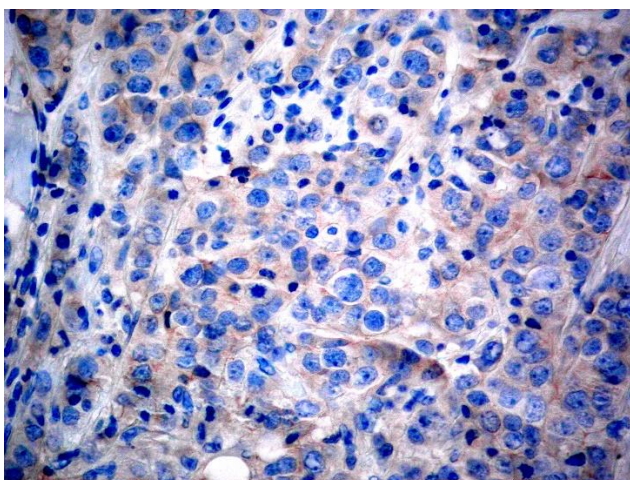
Slika 18. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 9486/2011, HER1, $\times 200$.



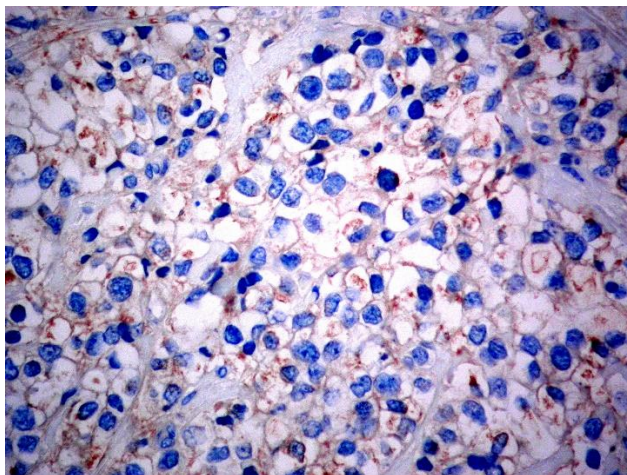
Slika 19. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 9490/2011, HER1, $\times 200$.



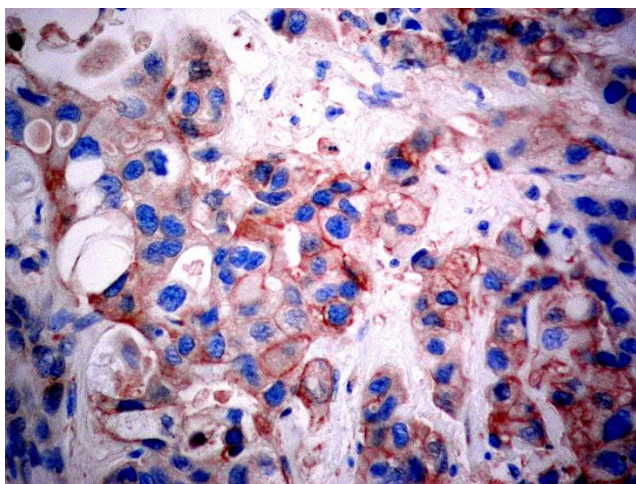
Slika 20. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 10089/2010, HER1, $\times 200$.



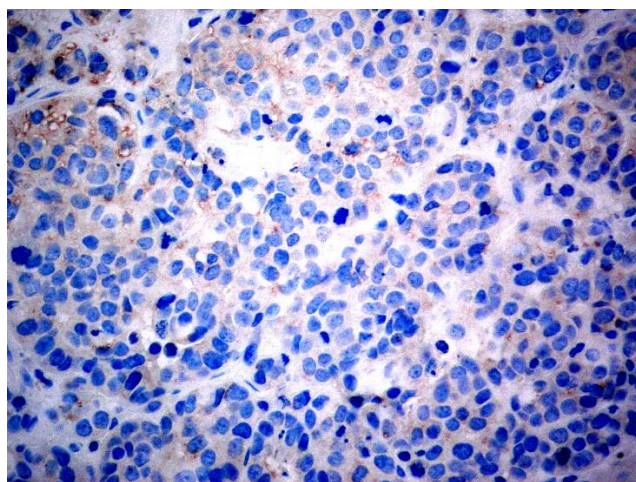
Slika 21. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 10285/2010, HER1, $\times 200$.



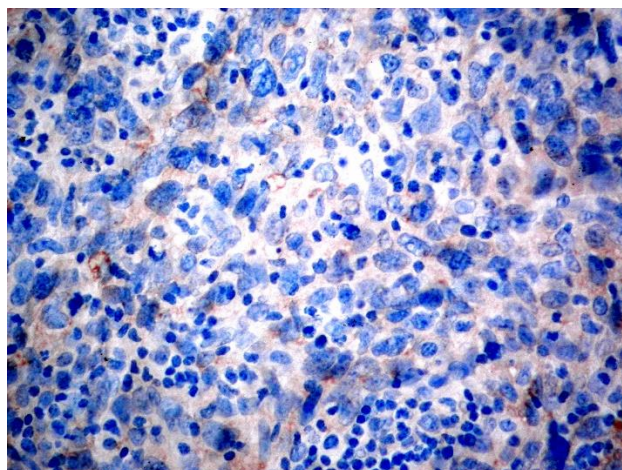
Slika 22. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11042/2011, HER1, $\times 200$.



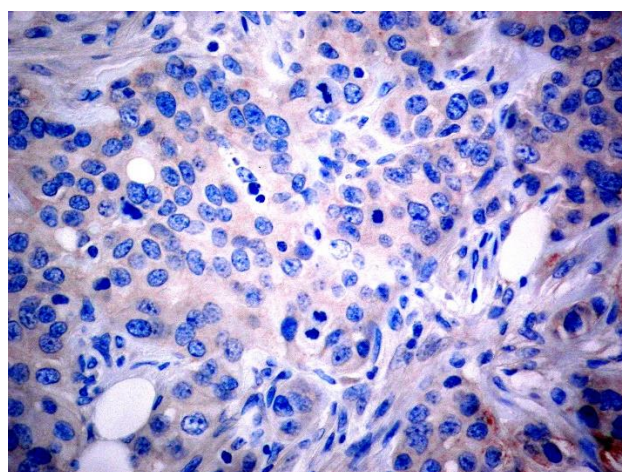
Slika 23. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11137/2011, HER1, $\times 200$.



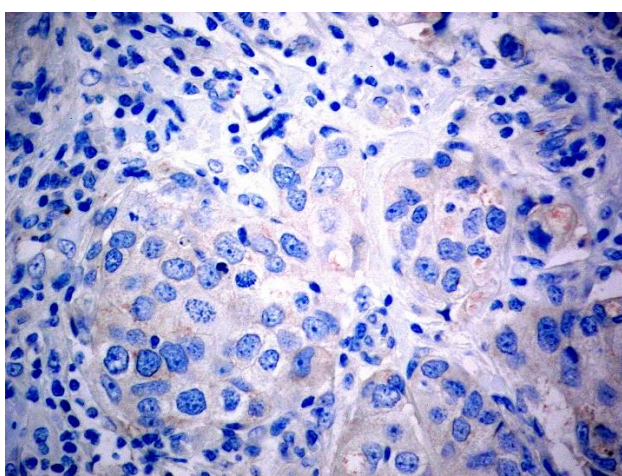
Slika 24. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11318/2010, HER1, $\times 200$.



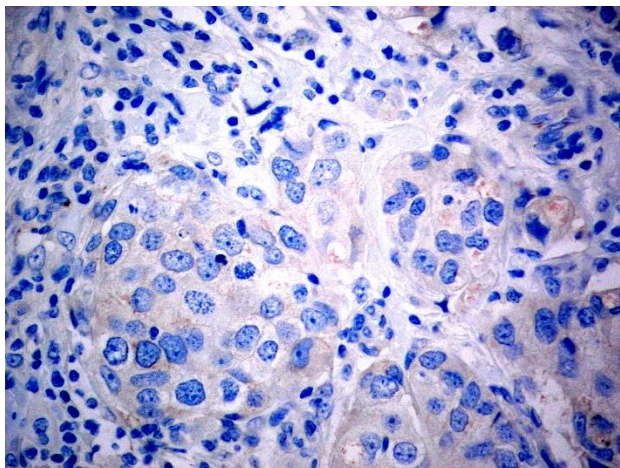
Slika 25. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11392/2010, HER1, $\times 200$.



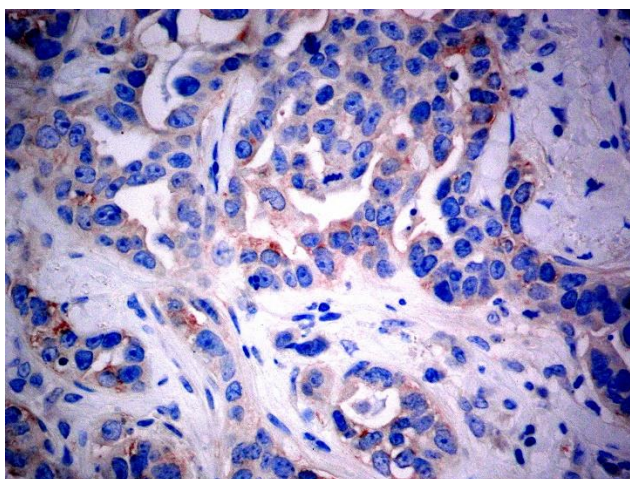
Slika 26. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11959/2011, HER1, $\times 200$.



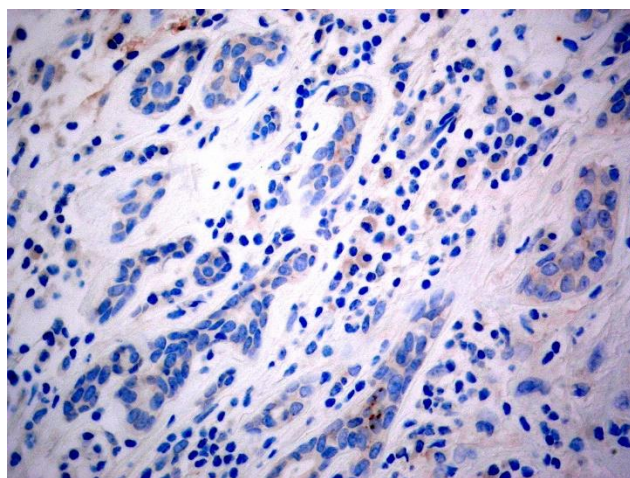
Slika 27. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 12115/2010, HER1, $\times 200$.



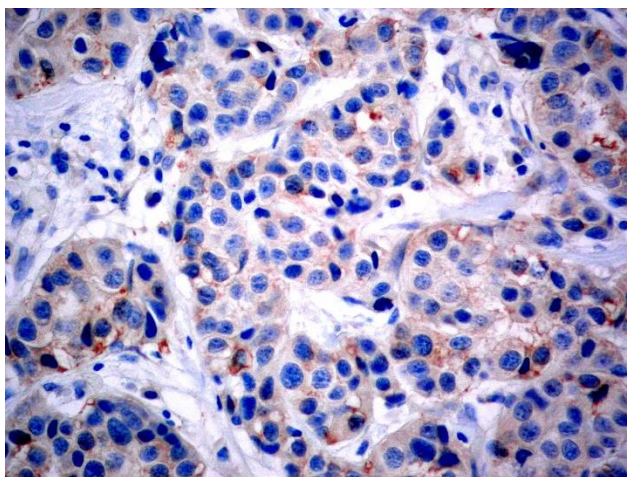
Slika 28. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 13970/2010, HER1, $\times 200$.



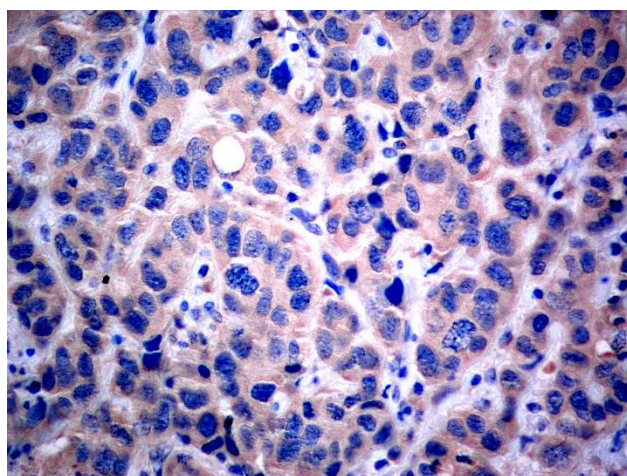
Slika 29. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 13973/2011, HER1, $\times 200$.



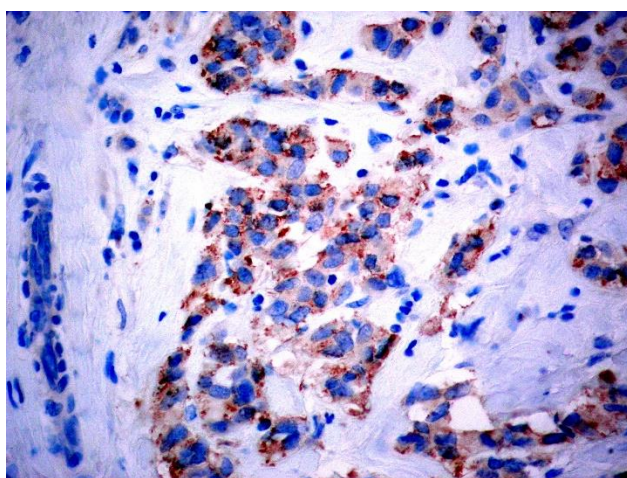
Slika 30. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 14088/2011, HER1, $\times 200$.



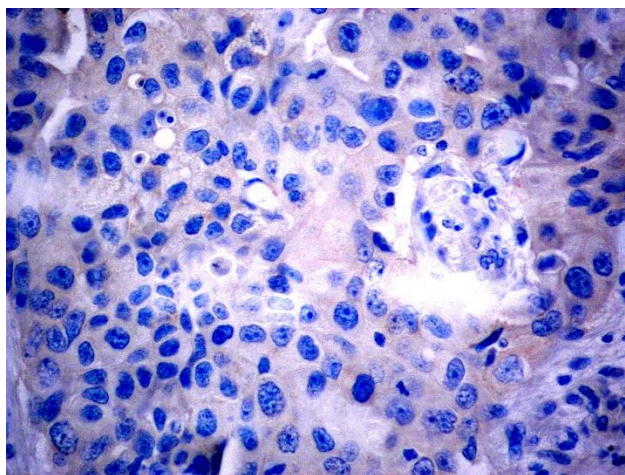
Slika 31. Kontrolna skupina, 46/2010, HER1, $\times 200$.



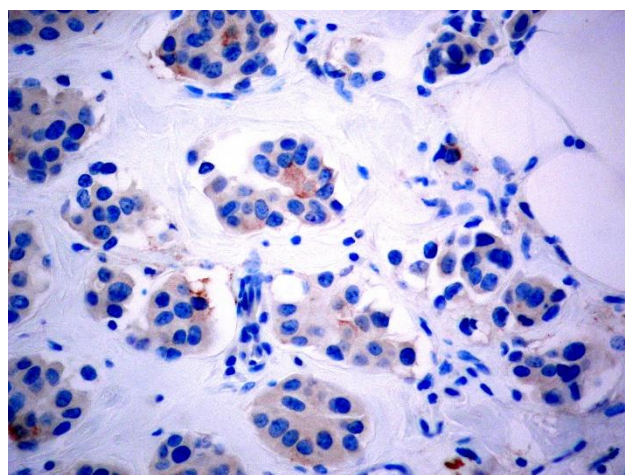
Slika 32. Kontrolna skupina, 113/2010, HER1, $200\times$.



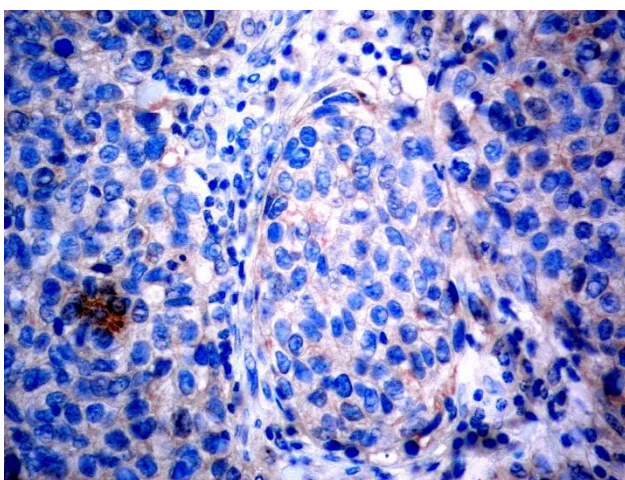
Slika 33. Kontrolna skupina, 645/2010, HER1, $200\times$.



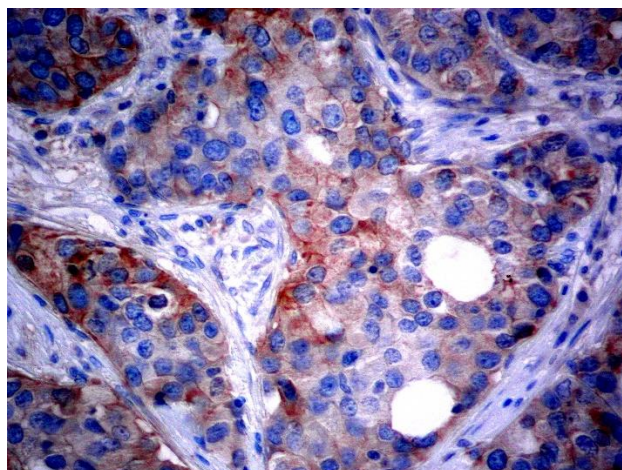
Slika 34. Kontrolna skupina, 656/2010, HER1, 200×



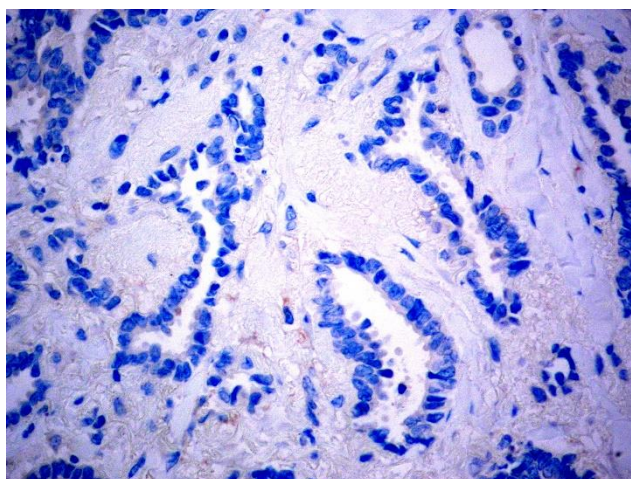
Slika 35. Kontrolna skupina, 839/2010, HER1, 200×



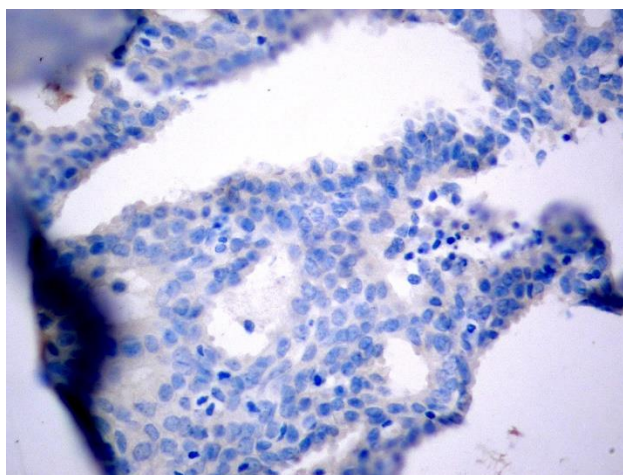
Slika 36. Kontrolna skupina, 903/2010, HER1, 200×



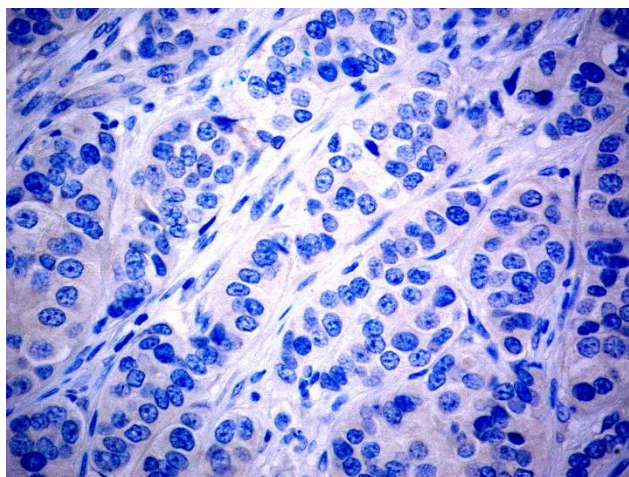
Slika 37. Kontrolna skupina, 1068/2010, HER1, $\times 200$.



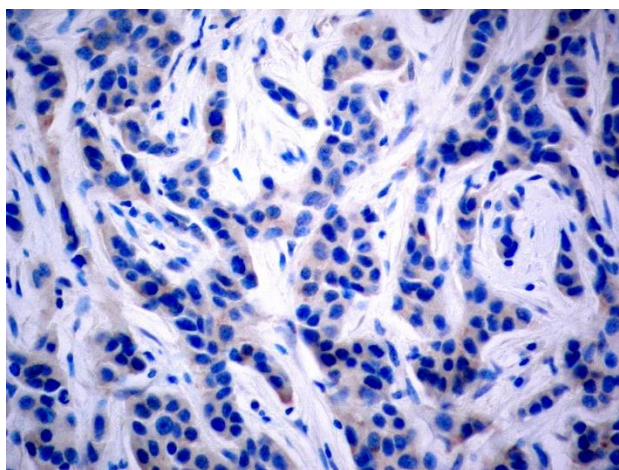
Slika 38. Kontrolna skupina, 1124/2010, HER1, $\times 200$.



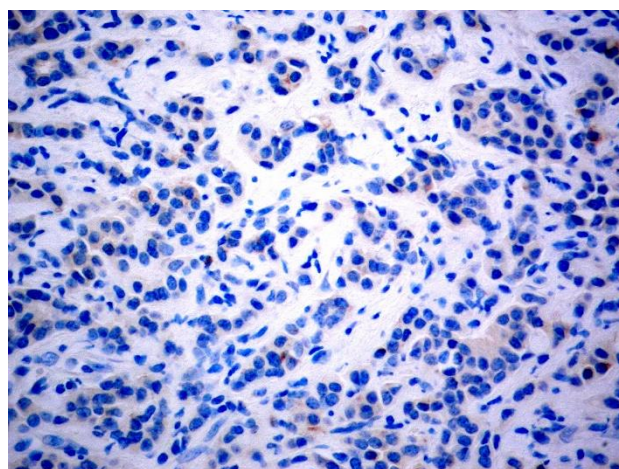
Slika 39. Kontrolna skupina, 1182/2010, HER1, $\times 200$.



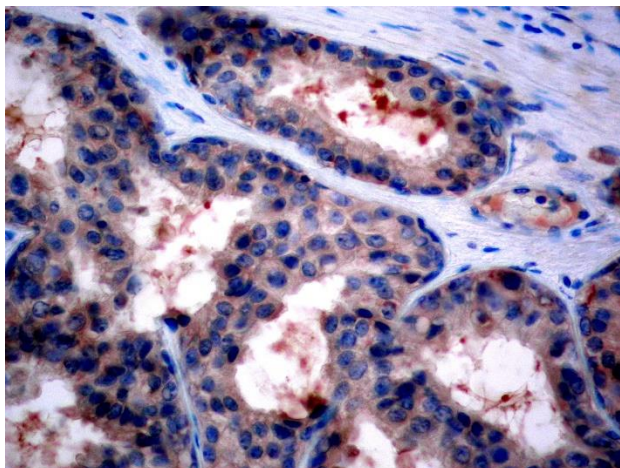
Slika 40. Kontrolna skupina, 1253/2010, HER1, $\times 200$.



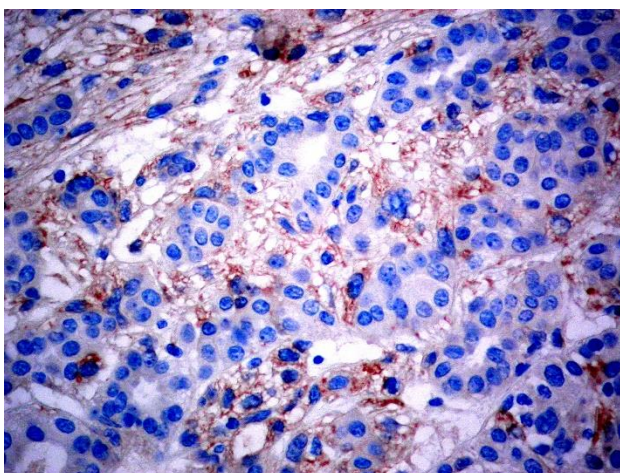
Slika 41. Kontrolna skupina, 1409/2010, HER1, $\times 200$.



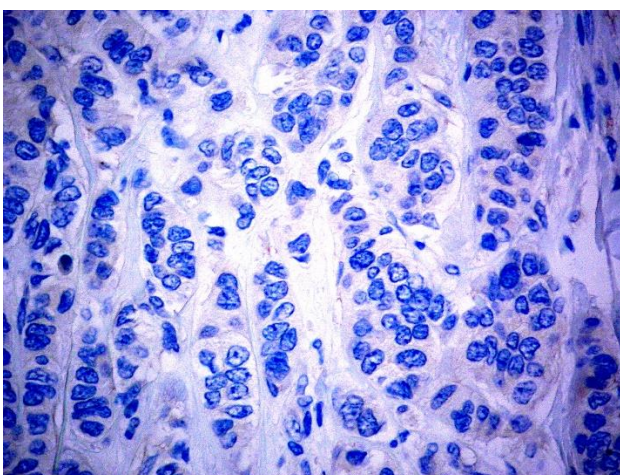
Slika 42. Kontrolna skupina, 1533/2010, HER1, $\times 200$.



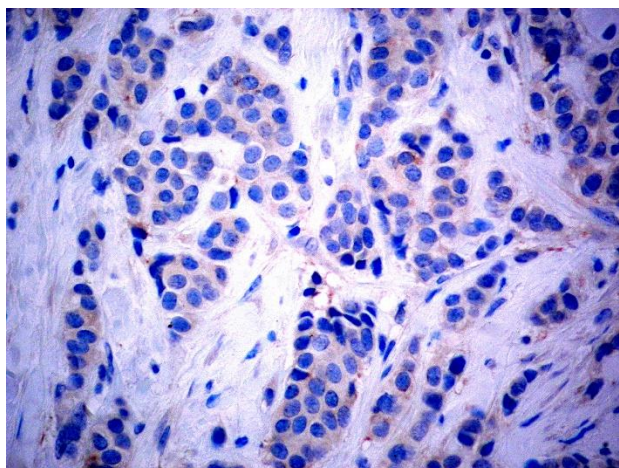
Slika 43. Kontrolna skupina, 1658/2010, HER1, $\times 200$.



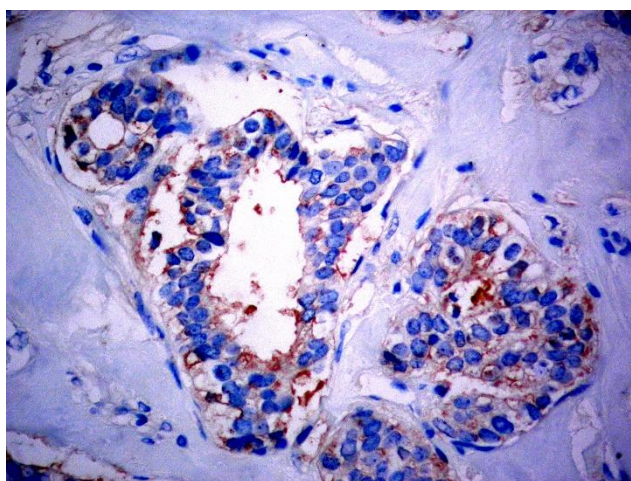
Slika 44. Kontrolna skupina, 1841/2010, HER1, $\times 200$.



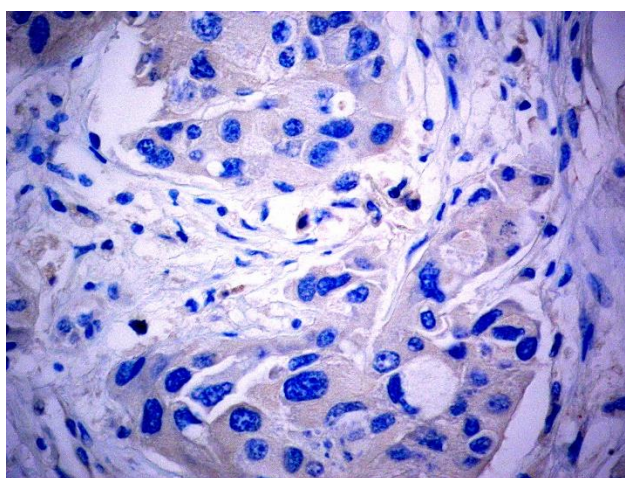
Slika 45. Kontrolna skupina, 1925/2010, HER1, $\times 200$.



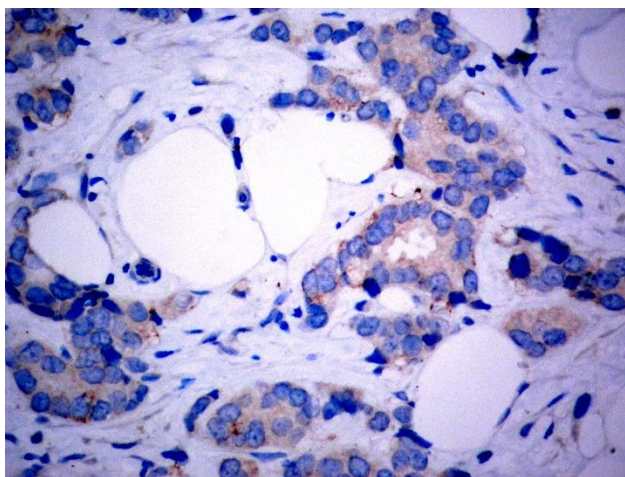
Slika 46. Kontrolna skupina, 2200/2011, HER1, $\times 200$.



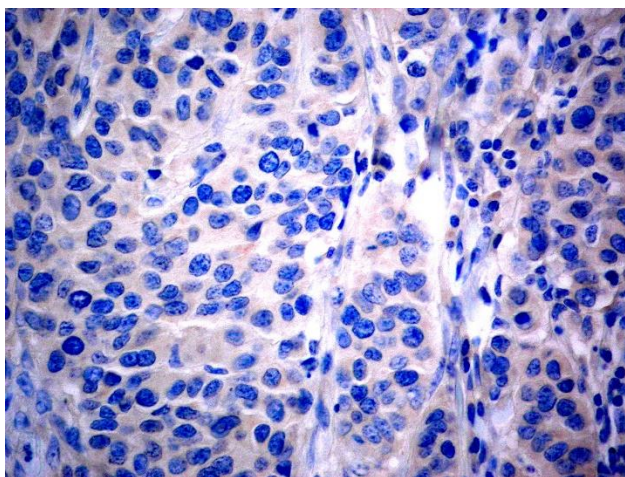
Slika 47. Kontrolna skupina, 2227/2010, HER1, $\times 200$.



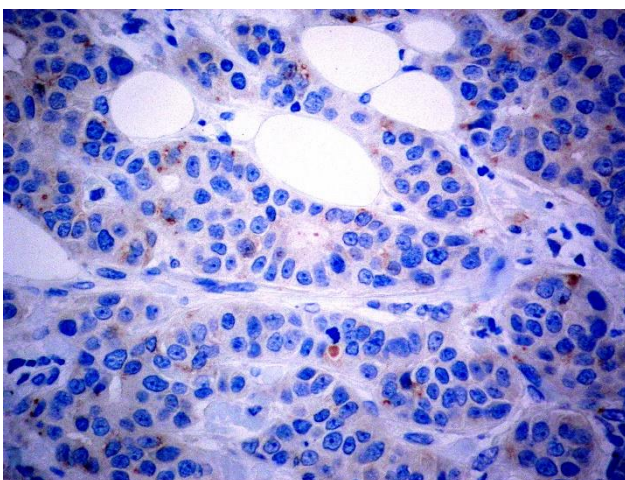
Slika 48. Kontrolna skupina, 2266/2010, HER1, $\times 200$.



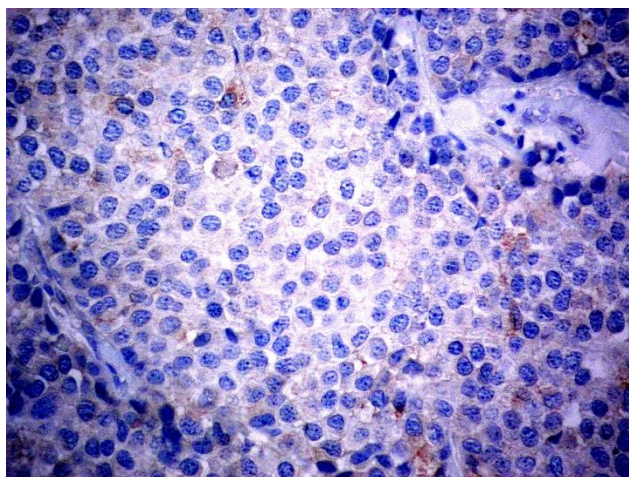
Slika 49. Kontrolna skupina, 2363/2010, HER1, $\times 200$.



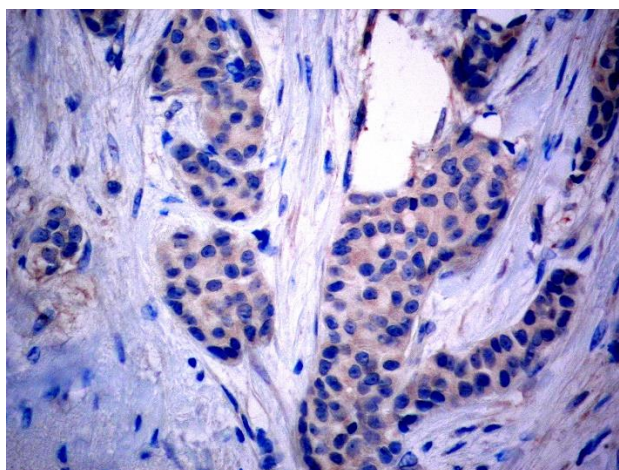
Slika 50. Kontrolna skupina, 2781/2010, HER1, $\times 200$.



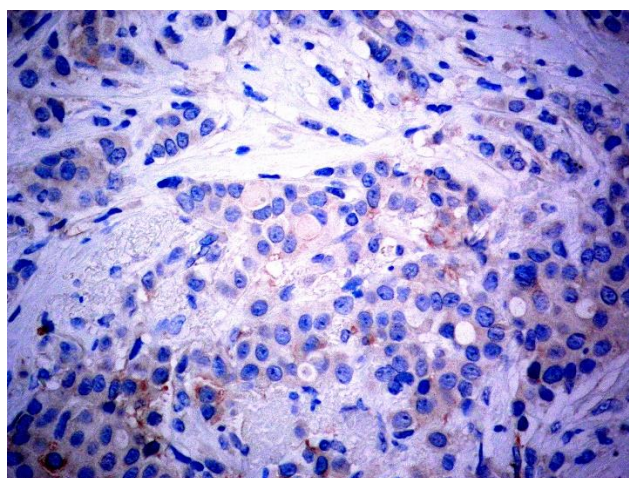
Slika 51. Kontrolna skupina, 2953/2010, HER1, $\times 200$.



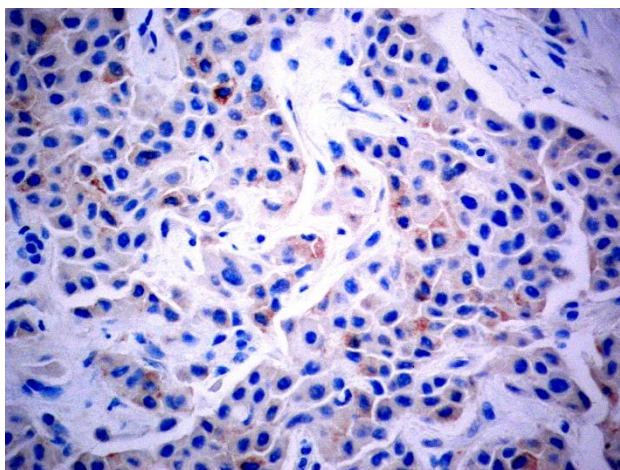
Slika 52. Kontrolna skupina, 3025/2010, HER1, $\times 200$.



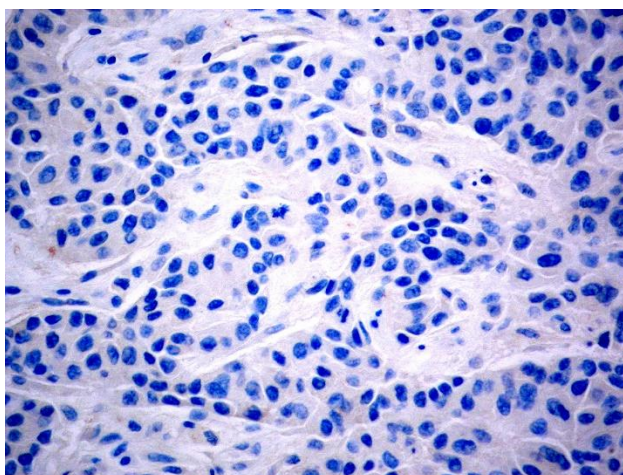
Slika 53. Kontrolna skupina, 3030/2010, HER1, $\times 200$.



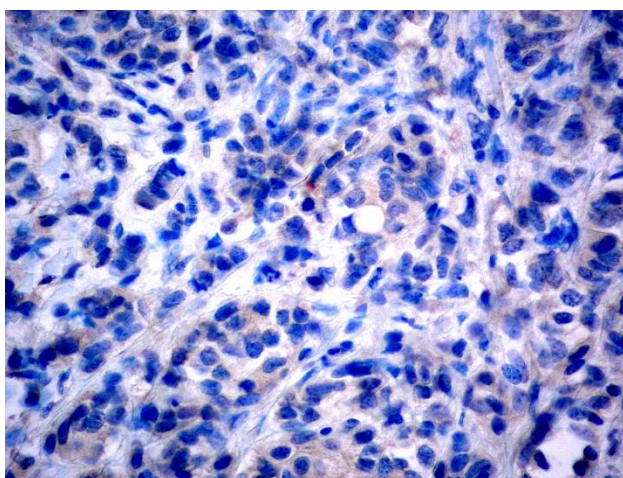
Slika 54. Kontrolna skupina, 3140/2010, HER1, $\times 200$.



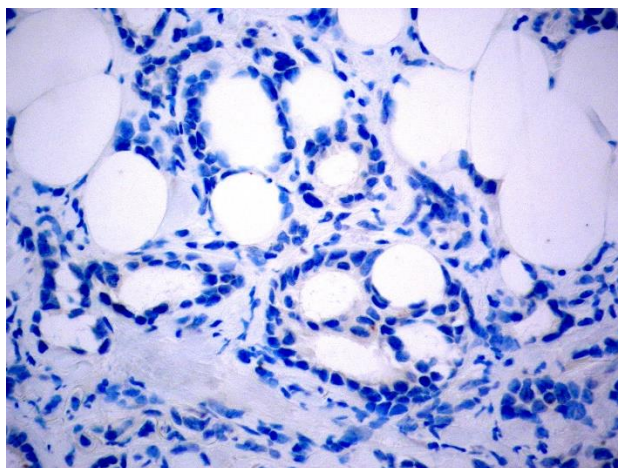
Slika 55. Kontrolna skupina, 3287/2010, HER1, $\times 200$.



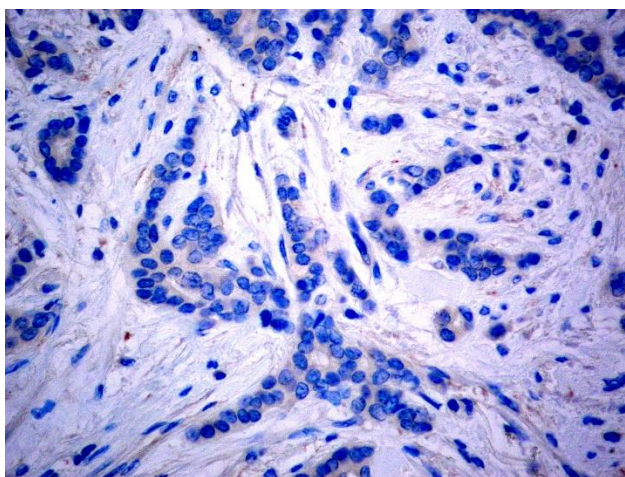
Slika 56. Kontrolna skupina, 3405/2010, HER1, $\times 200$.



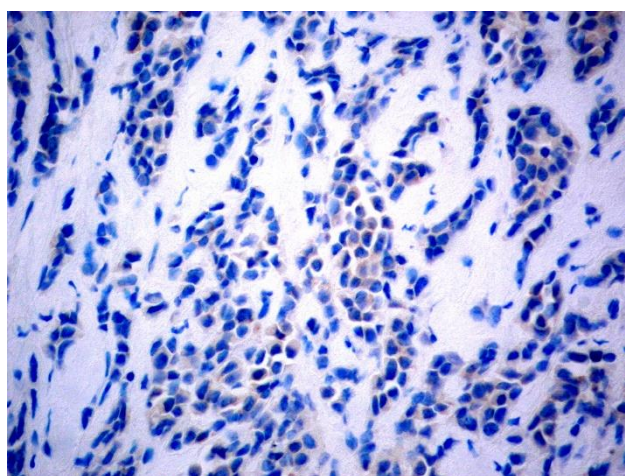
Slika 57. Kontrolna skupina, 3578/2010, HER1, $\times 200$.



Slika 58. Kontrolna skupina, 3973/2010, HER1, $\times 200$.



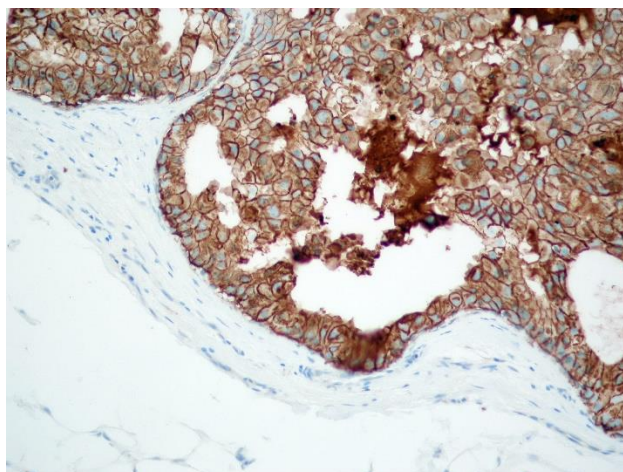
Slika 59. Kontrolna skupina, 3992/2010, HER1, $\times 200$.



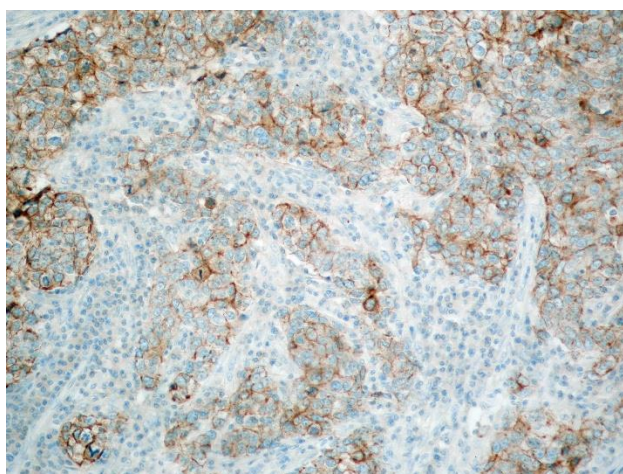
Slika 60. Kontrolna skupina, 4036/2010, HER1, $\times 200$.

12. PRILOZI

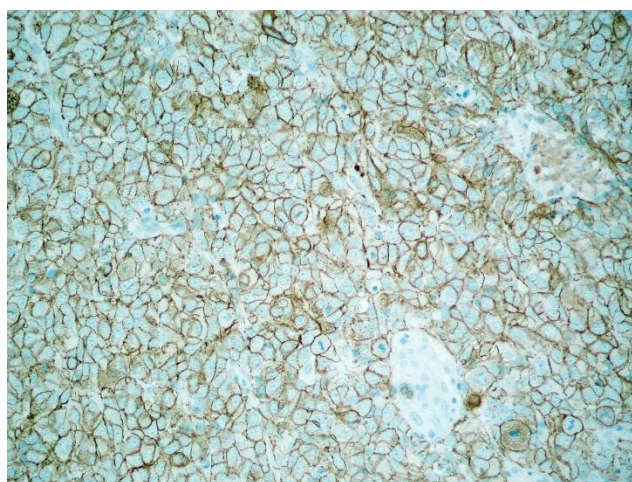
Prilog 2. Slikovni prikaz izražaja e-cadherina u istraživanih tumora



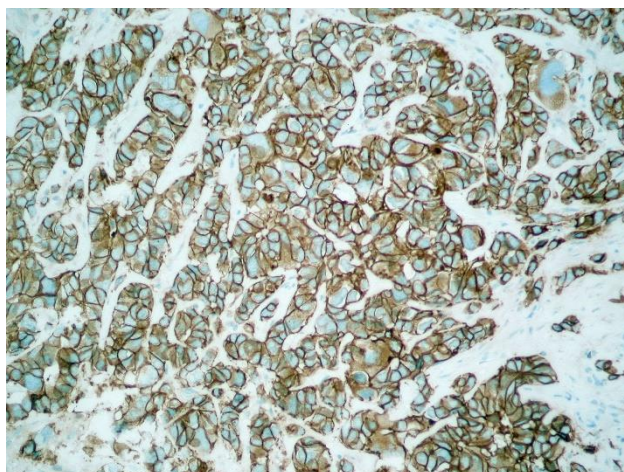
Slika 61. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 52/2011, e-cadherin, $\times 200$.



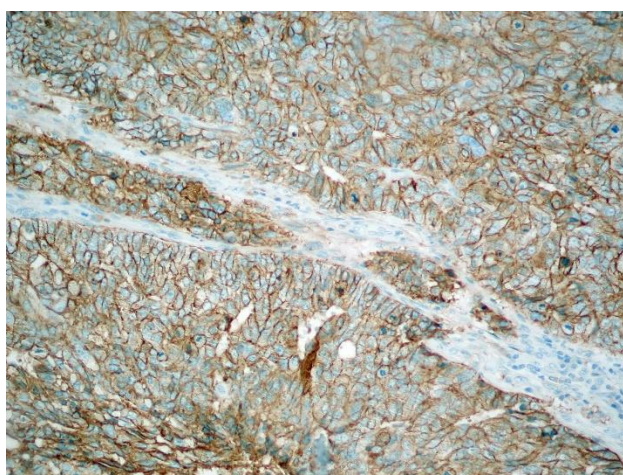
Slika 62. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 174/2011, e-cadherin, $\times 200$.



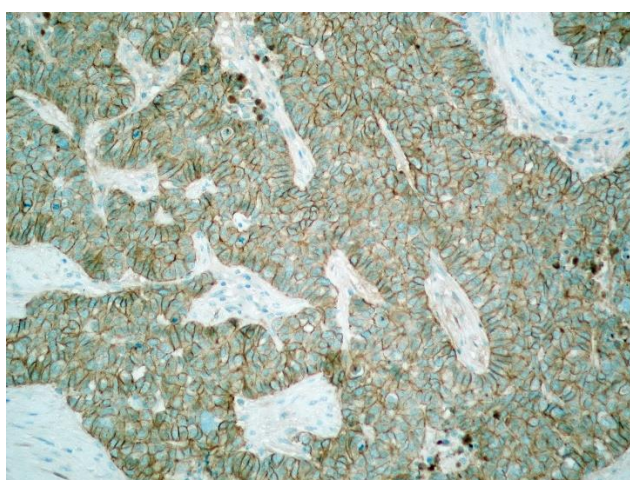
Slika 63. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 516/2010, e-cadherin, $\times 200$.



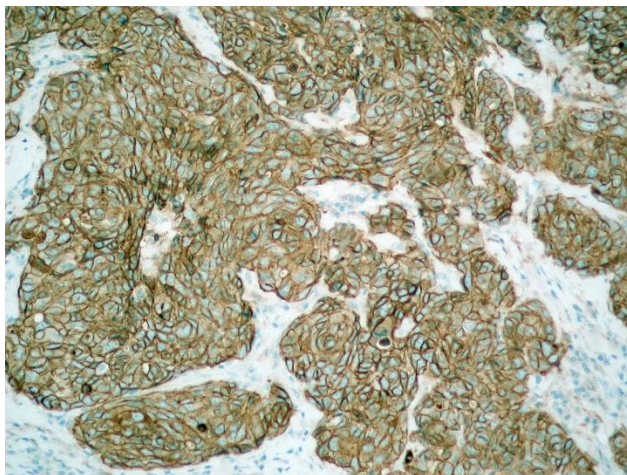
Slika 64. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 1035/2011, e-cadherin, $\times 200$.



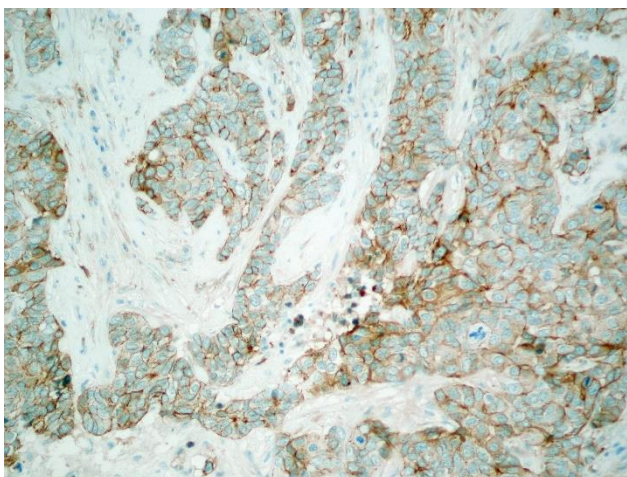
Slika 65. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 1424/2010, e-cadherin, $\times 200$.



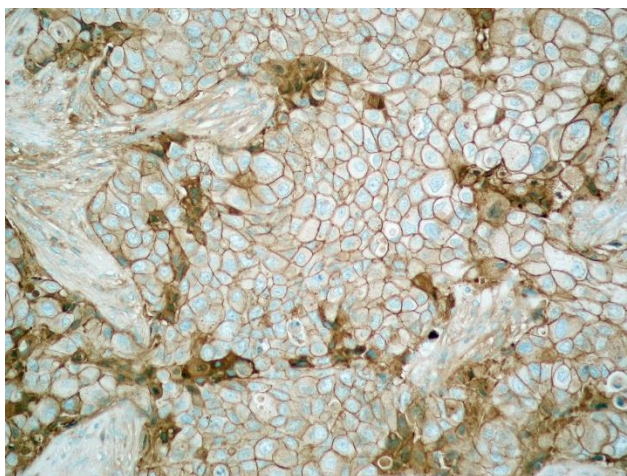
Slika 66. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 1564/2011, e-cadherin, $\times 200$.



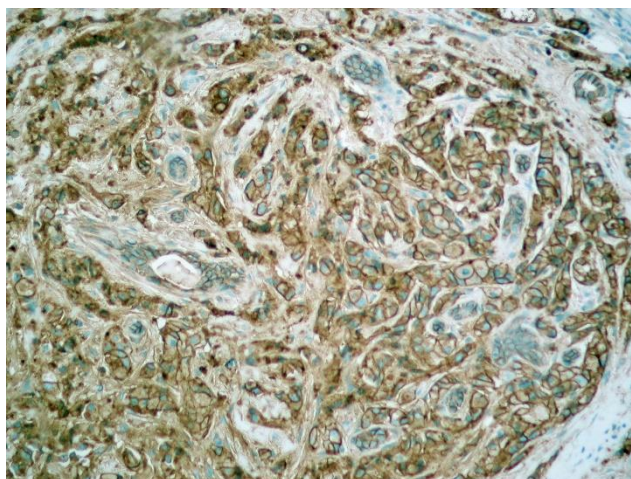
Slika 67. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 3741/2011, e-cadherin, $\times 200$.



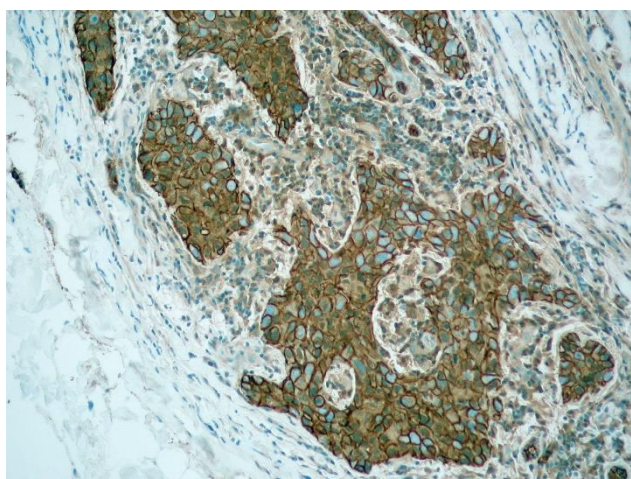
Slika 68. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 3915/2011, e-cadherin, $\times 200$.



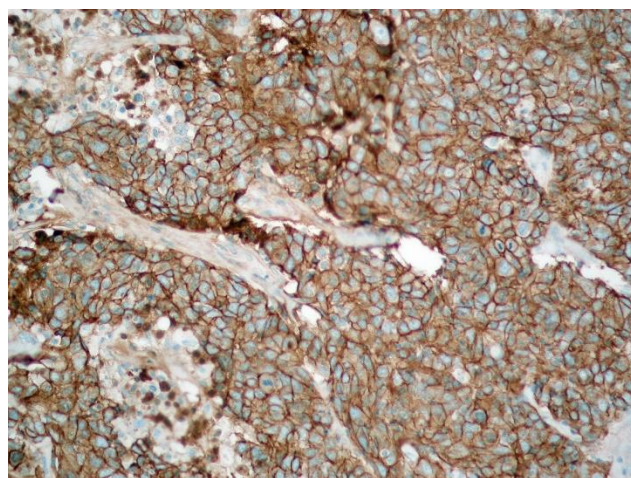
Slika 69. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 4130/2011, e-cadherin, $\times 200$.



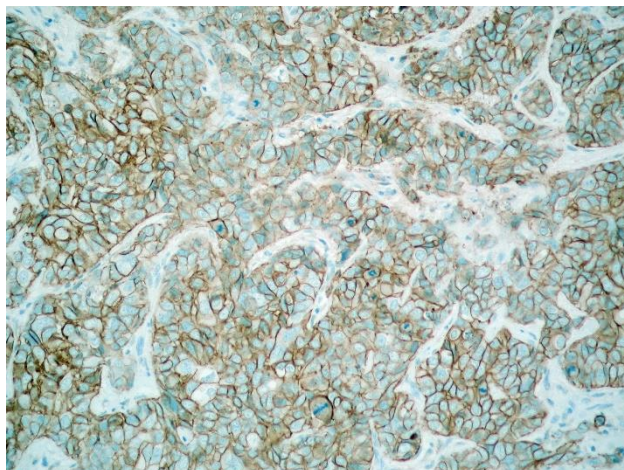
Slika 70. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 5077/2011, e-cadherin, $\times 200$.



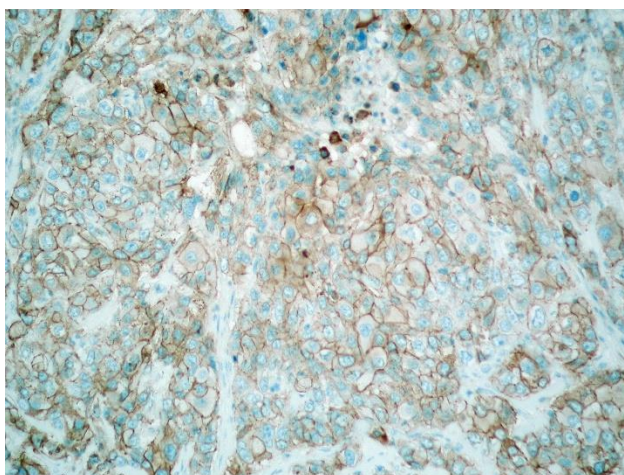
Slika 71. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 6422/2011, e-cadherin, $\times 200$.



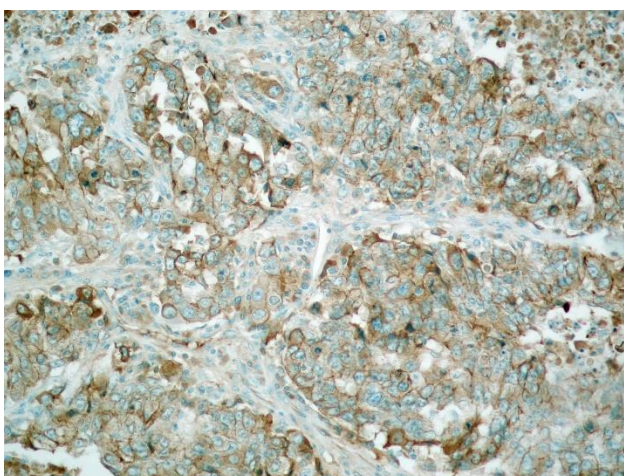
Slika 72. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 6547/2011, e-cadherin, $\times 200$.



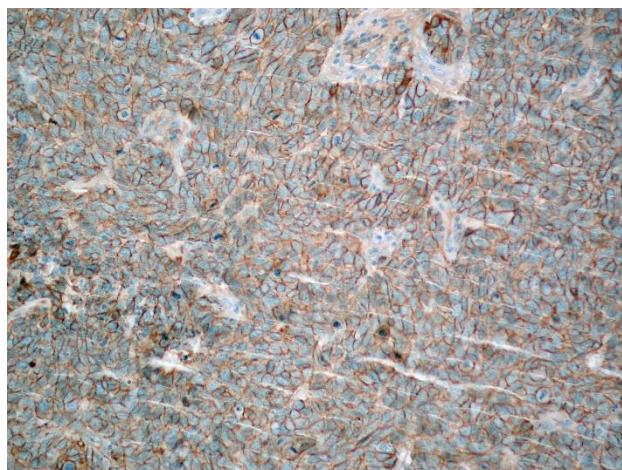
Slika 73. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 6780/2011, e-cadherin, $\times 200$.



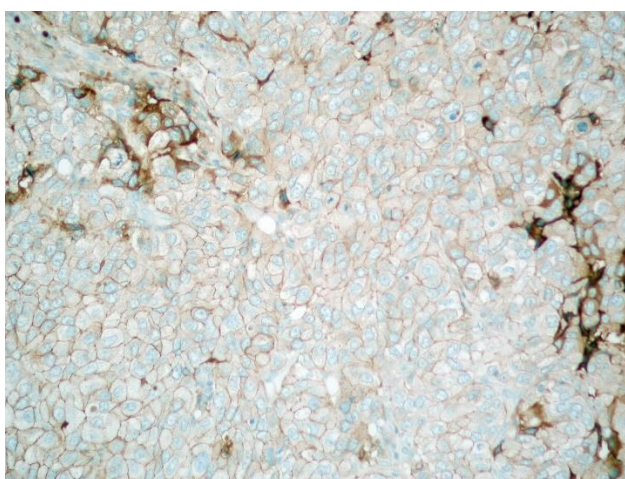
Slika 74. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8397/2011, e-cadherin, $\times 200$.



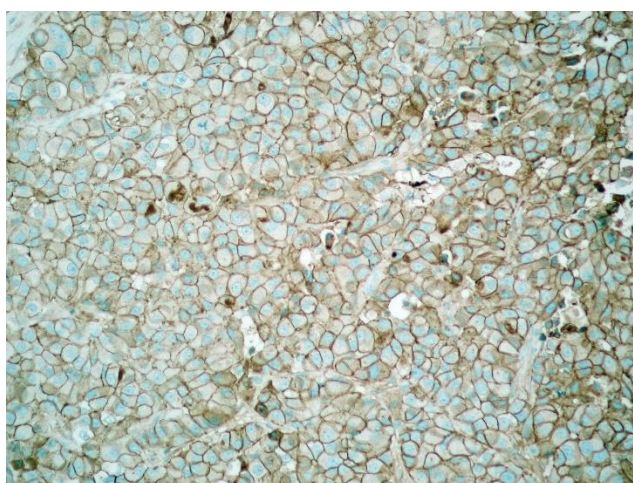
Slika 75. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8539/2010, e-cadherin, $\times 200$.



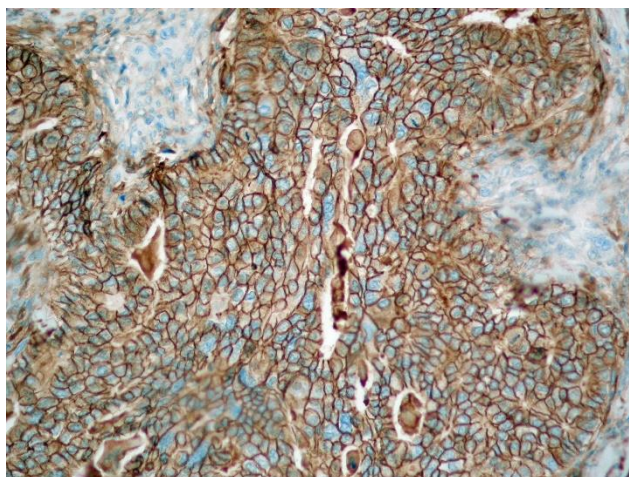
Slika 76. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8585/2011, e-cadherin, $\times 200$.



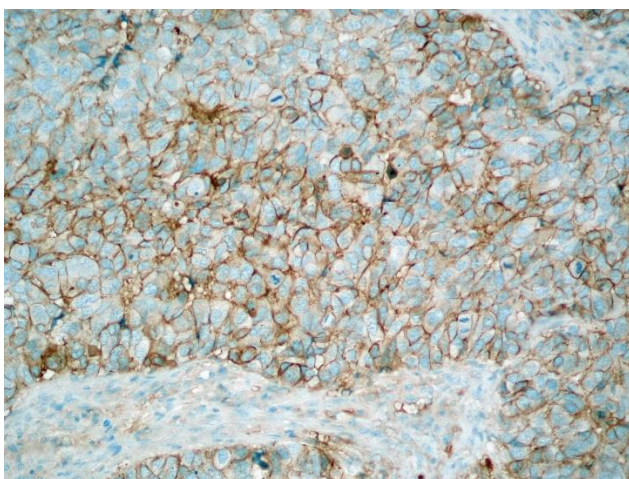
Slika 77. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 8741/2010, e-cadherin, $\times 200$.



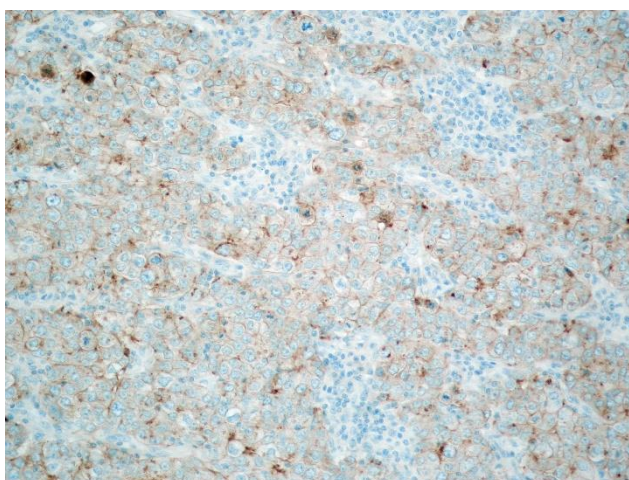
Slika 78. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 9486/2011, e-cadherin, $\times 200$.



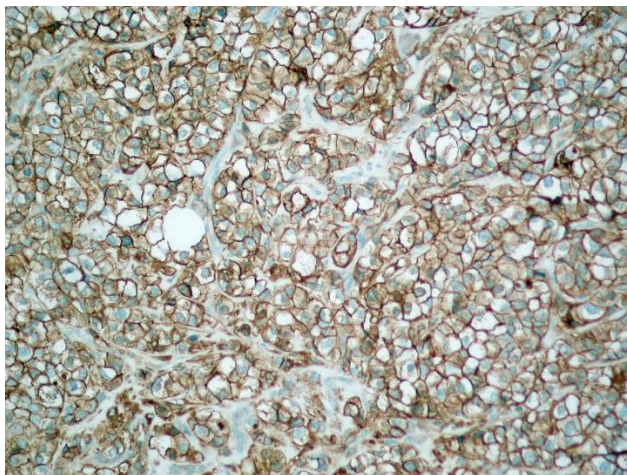
Slika 79. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 9490/2011, e-cadherin, $\times 200$.



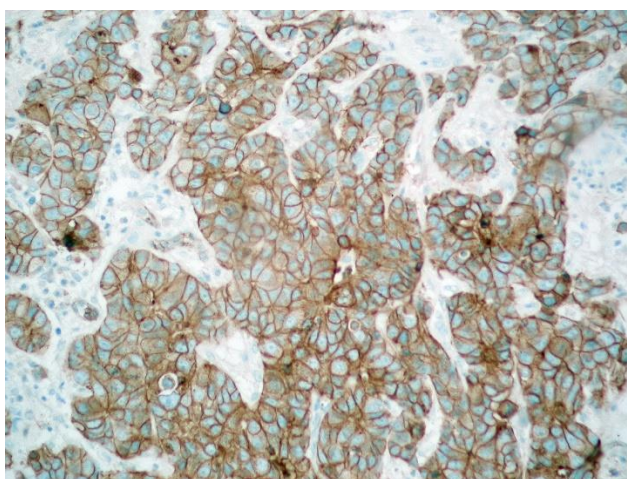
Slika 80. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 10089/2010, e-cadherin, $\times 200$.



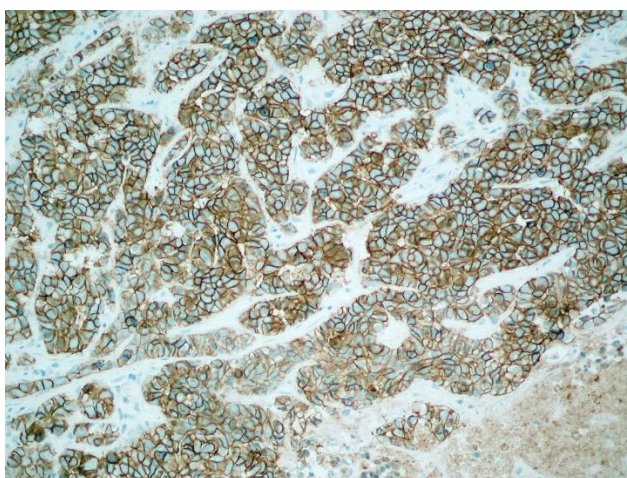
Slika 81. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 10285/2010, e-cadherin, $\times 200$.



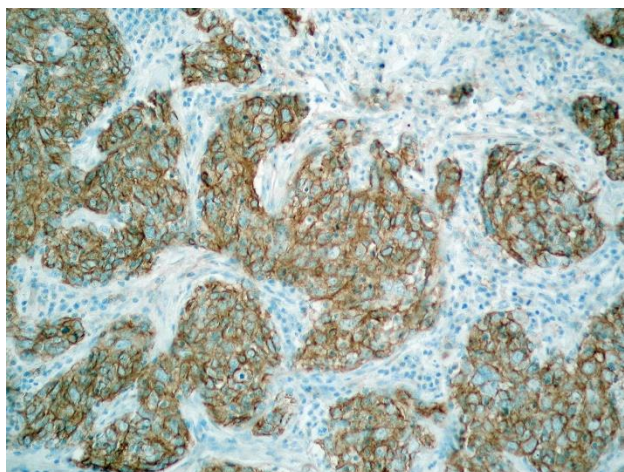
Slika 82. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11042/2011, e-cadherin, $\times 200$.



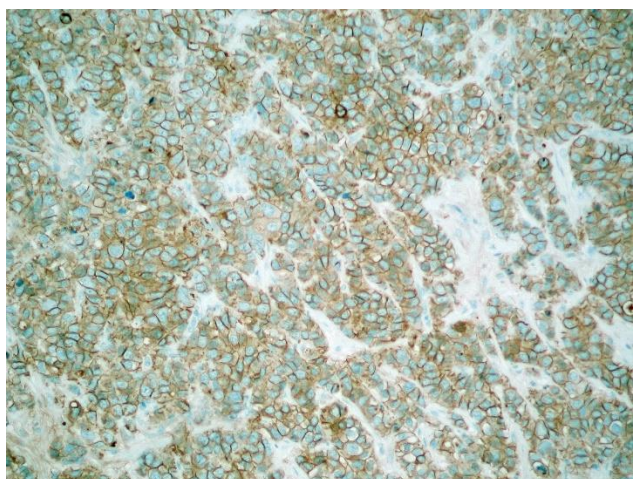
Slika 83. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11137/2011, e-cadherin, $\times 200$.



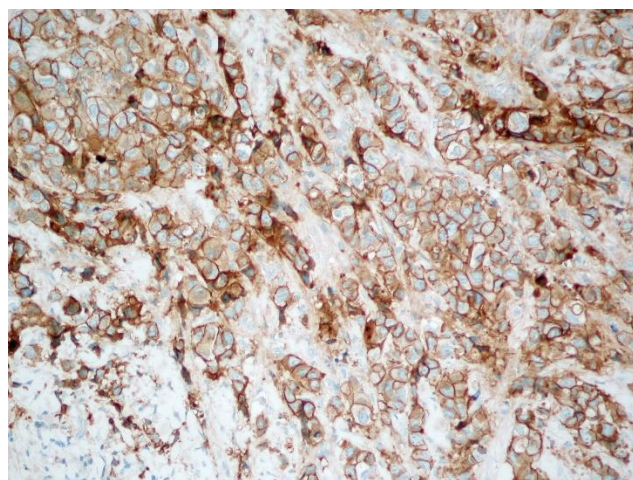
Slika 84. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11318/2010, e-cadherin, $\times 200$.



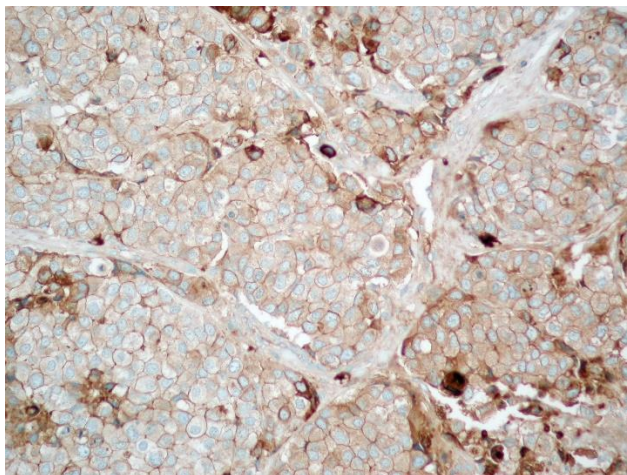
Slika 85. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11392/2010, e-cadherin, $\times 200$.



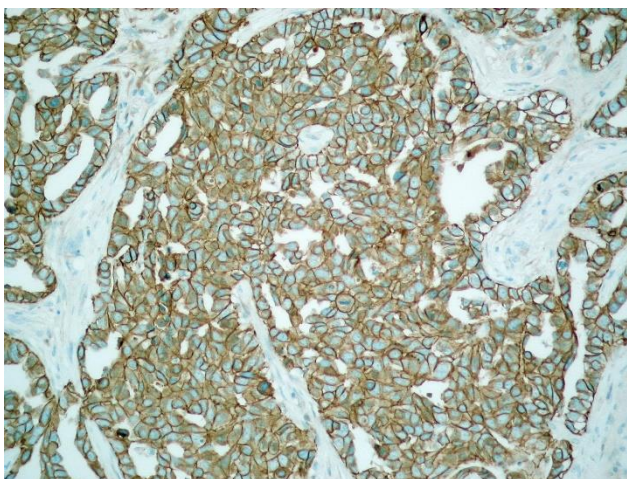
Slika 86. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 11959/2011, e-cadherin, $\times 200$.



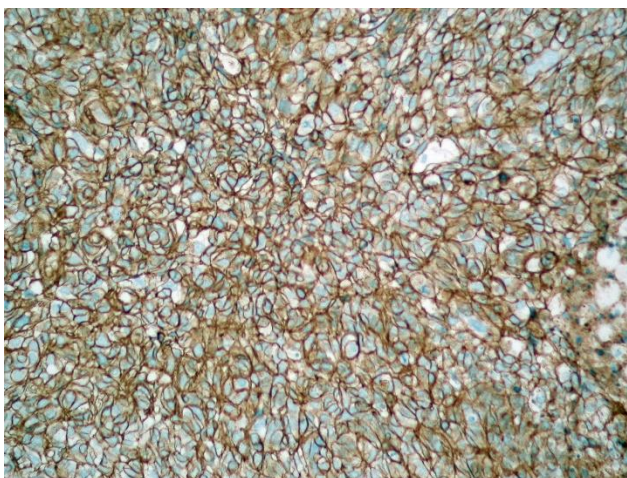
Slika 87. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 12115/2010, e-cadherin, $\times 200$.



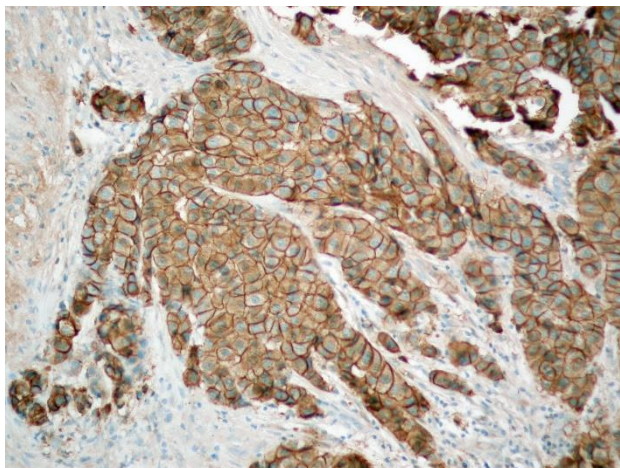
Slika 88. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 13970/2010, e-cadherin, $\times 200$.



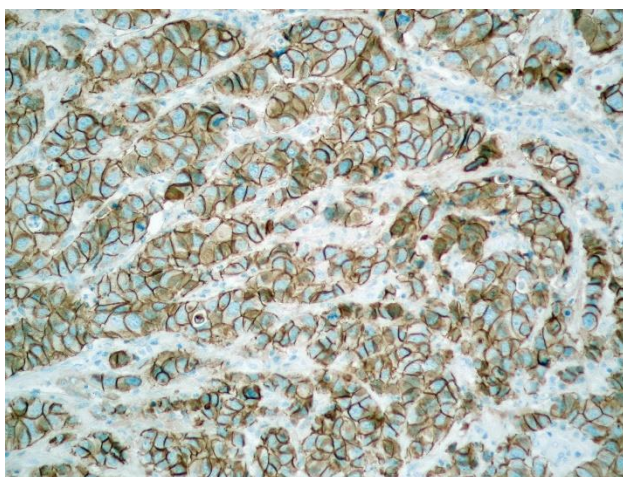
Slika 89. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 13973/2011, e-cadherin, $\times 200$.



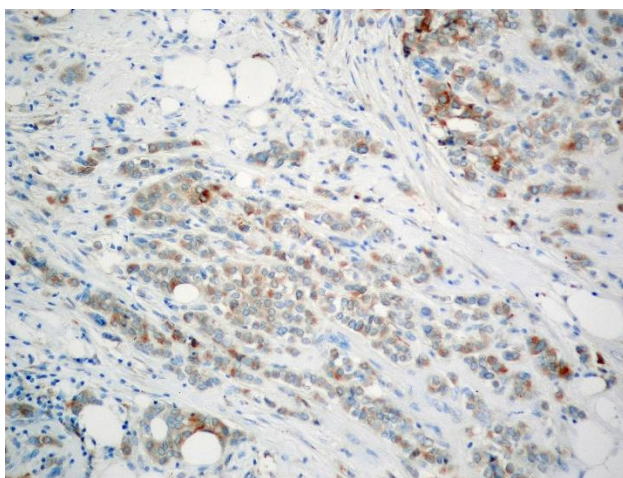
Slika 90. Skupina trostruko negativnih karcinoma, 14088/2011, e-cadherin, $\times 200$.



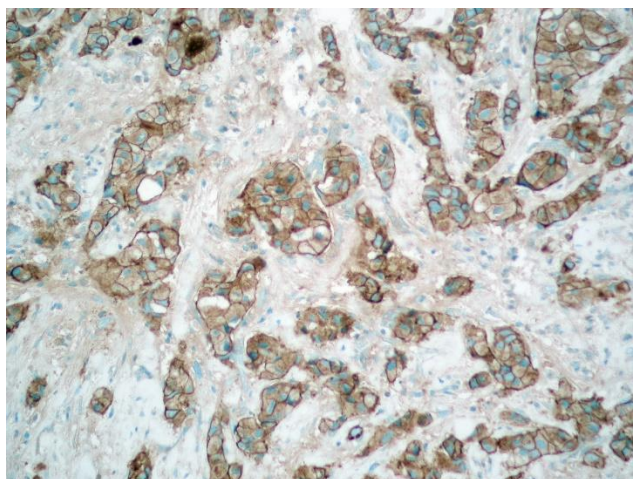
Slika 91. Kontrolna skupina, 46/2010, e-cadherin, $\times 200$.



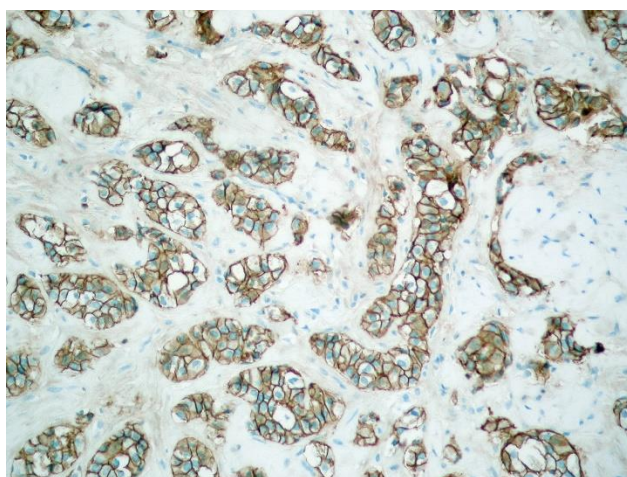
Slika 92. Kontrolna skupina, 113/2010, e-cadherin, $200\times$.



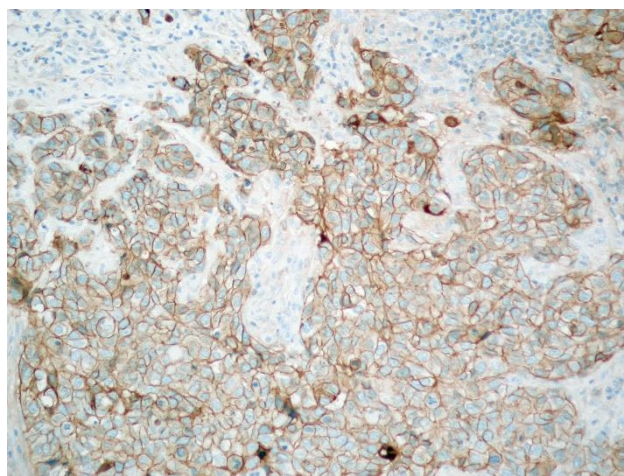
Slika 93. Kontrolna skupina, 645/2010, e-cadherin, $200\times$.



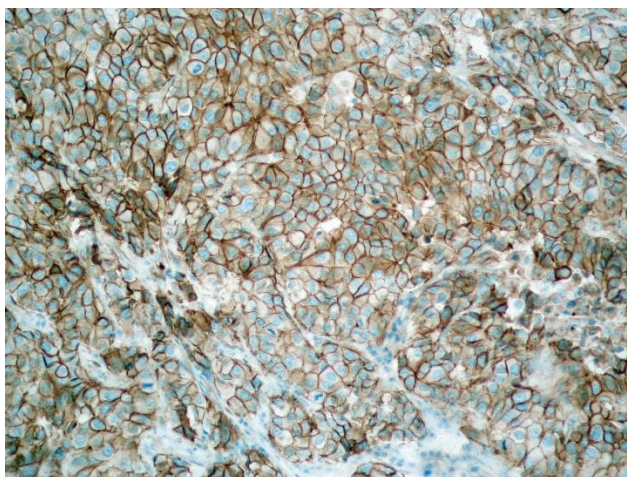
Slika 94. Kontrolna skupina, 656/2010, e-cadherin, 200×.



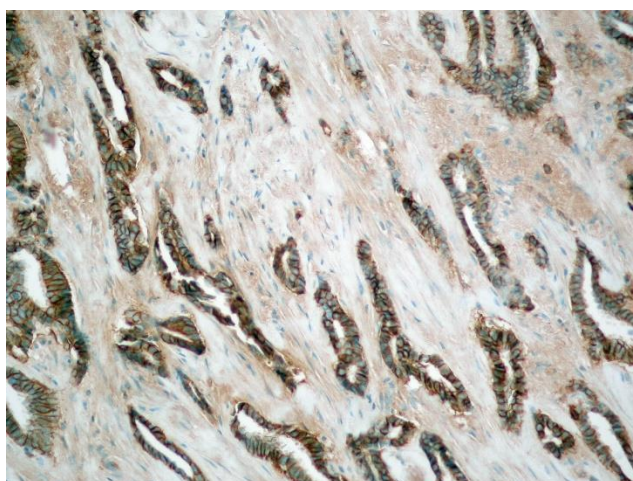
Slika 95. Kontrolna skupina, 839/2010, e-cadherin, 200×.



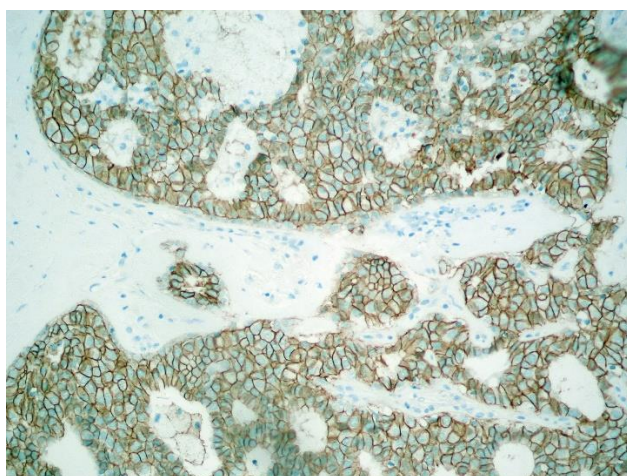
Slika 96. Kontrolna skupina, 903/2010, e-cadherin, 200×.



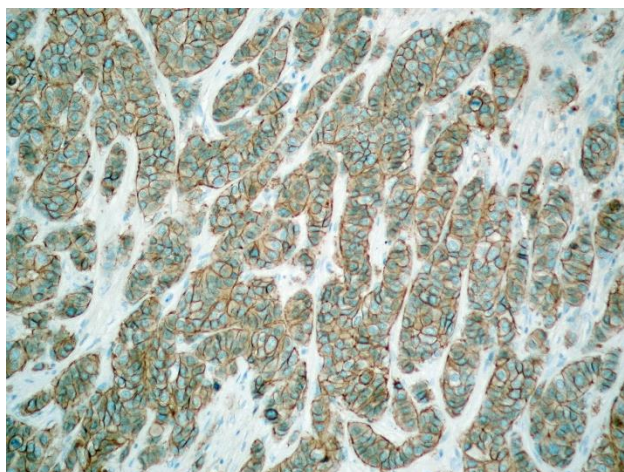
Slika 97. Kontrolna skupina, 1068/2010, e-cadherin, $\times 200$.



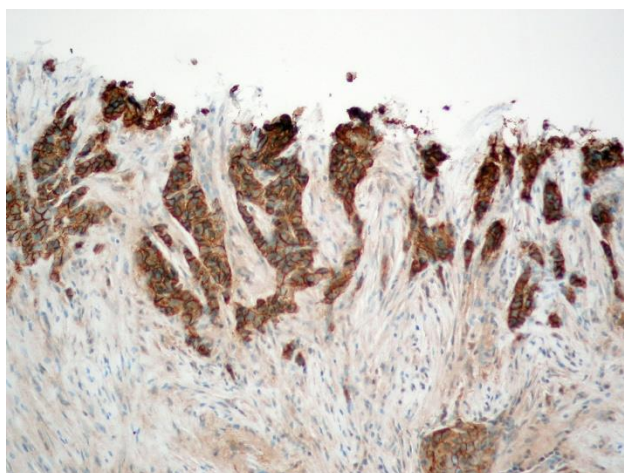
Slika 98. Kontrolna skupina, 1124/2010, e-cadherin, $\times 200$.



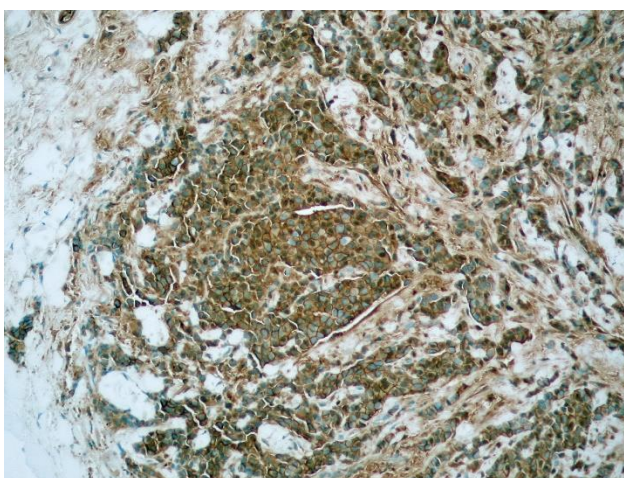
Slika 99. Kontrolna skupina, 1182/2010, e-cadherin, $\times 200$.



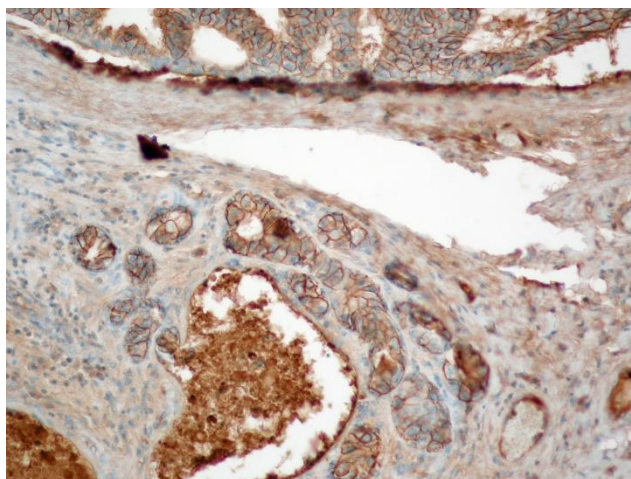
Slika 100. Kontrolna skupina, 1253/2010, e-cadherin, $\times 200$.



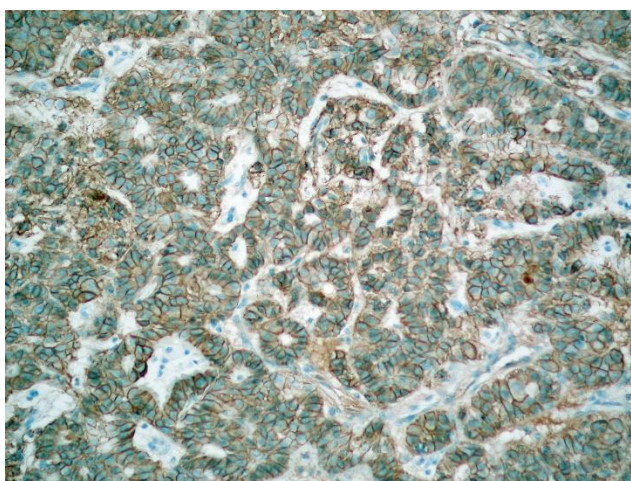
Slika 101. Kontrolna skupina, 1409/2010, e-cadherin, $\times 200$.



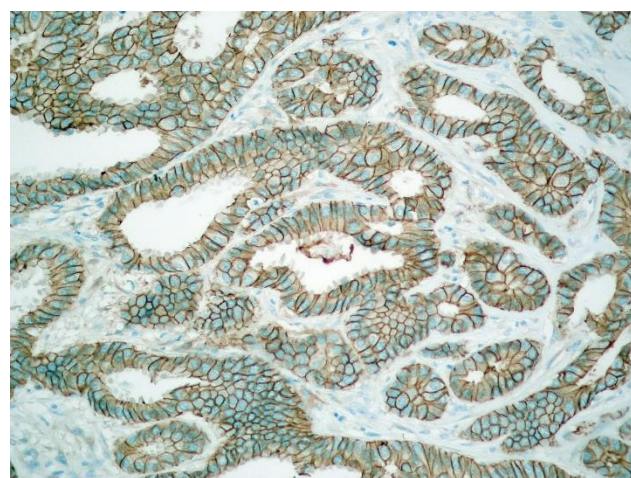
Slika 102. Kontrolna skupina, 1533/2010, e-cadherin, $\times 200$.



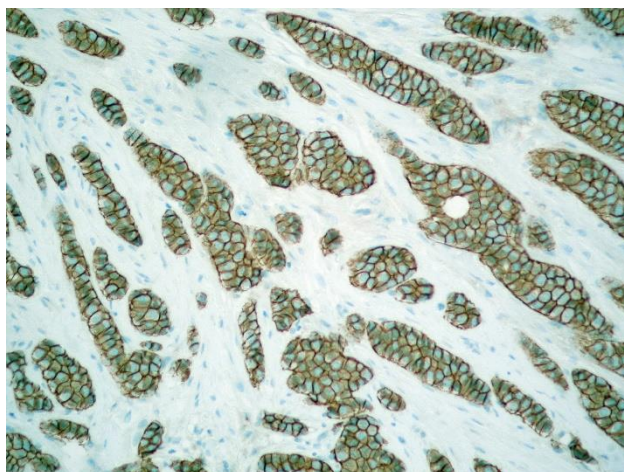
Slika 103. Kontrolna skupina, 1658/2010, e-cadherin, $\times 200$.



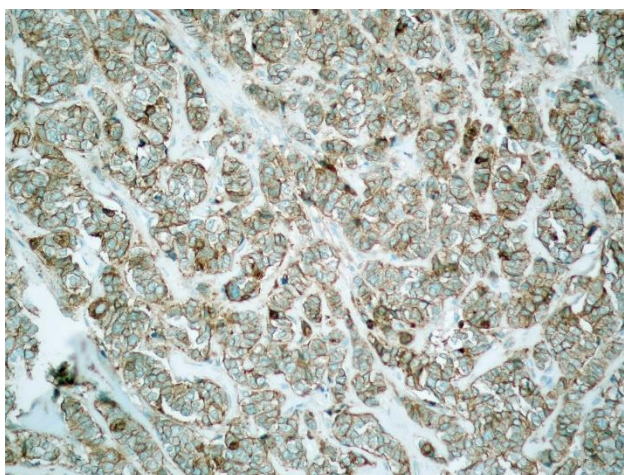
Slika 104. Kontrolna skupina, 1841/2010, e-cadherin, $\times 200$.



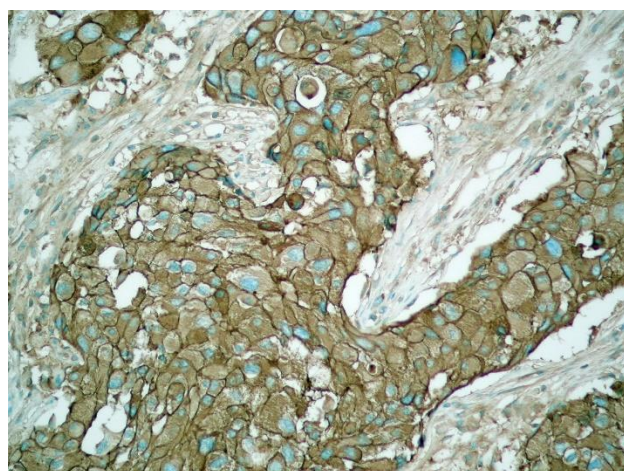
Slika 105. Kontrolna skupina, 1925/2010, e-cadherin, $\times 200$.



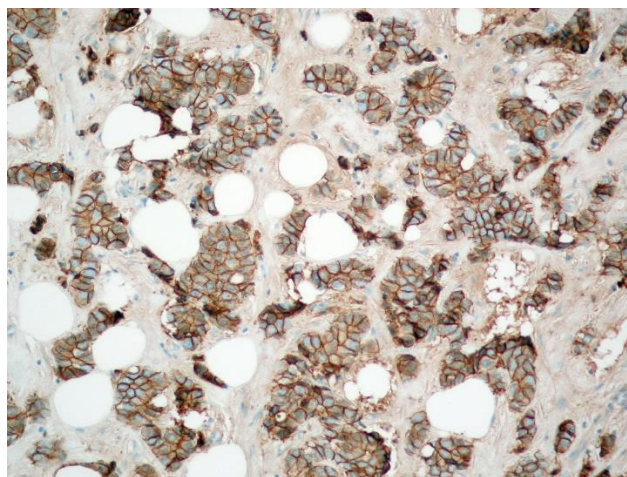
Slika 106. Kontrolna skupina, 2200/2011, e-cadherin, $\times 200$.



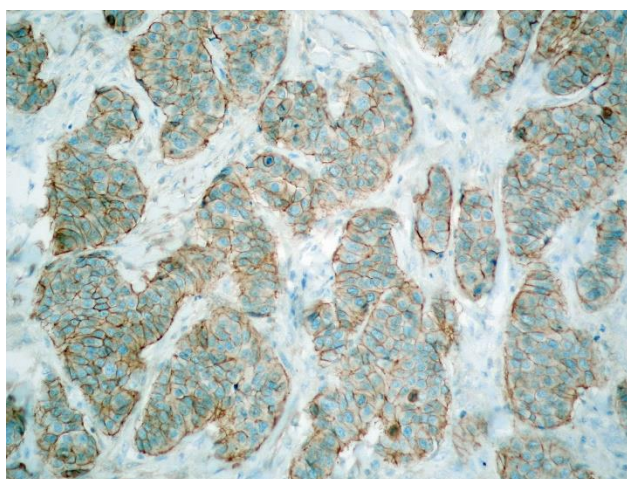
Slika 107. Kontrolna skupina, 2227/2010, e-cadherin, $\times 200$.



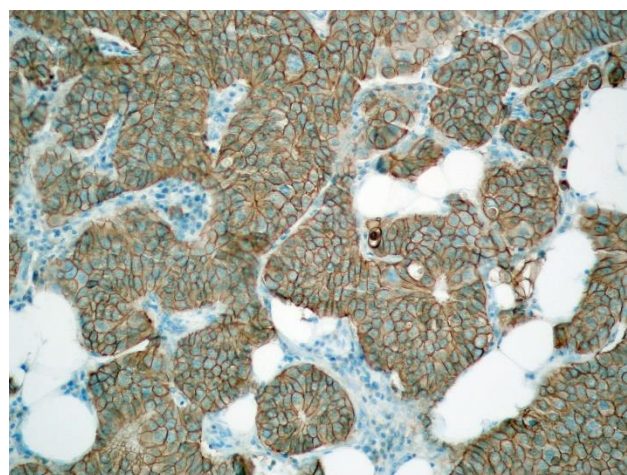
Slika 108. Kontrolna skupina, 2266/2010, e-cadherin, $\times 200$.



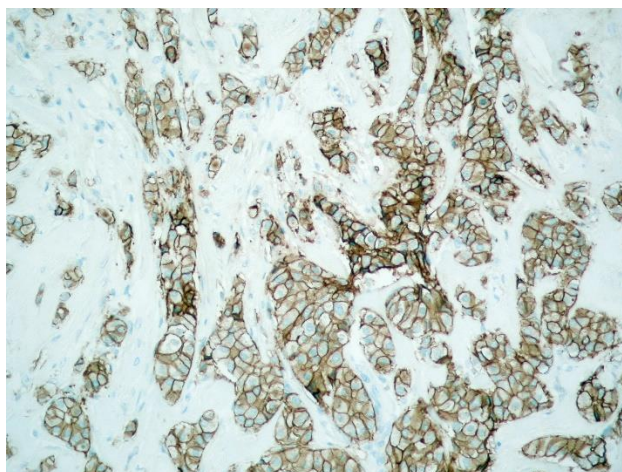
Slika 109. Kontrolna skupina, 2363/2010, e-cadherin, $\times 200$.



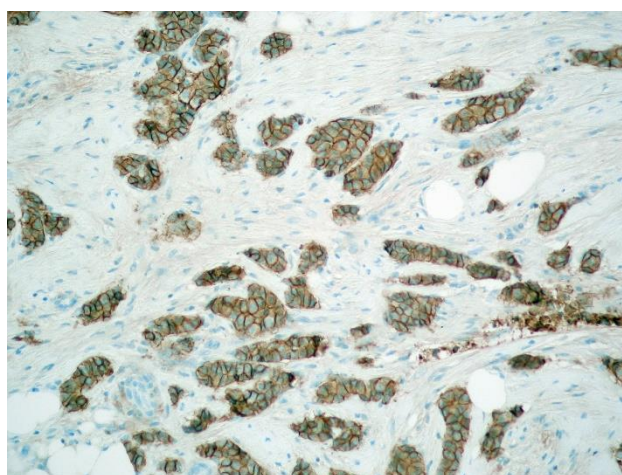
Slika 110. Kontrolna skupina, 2781/2010, e-cadherin, $\times 200$.



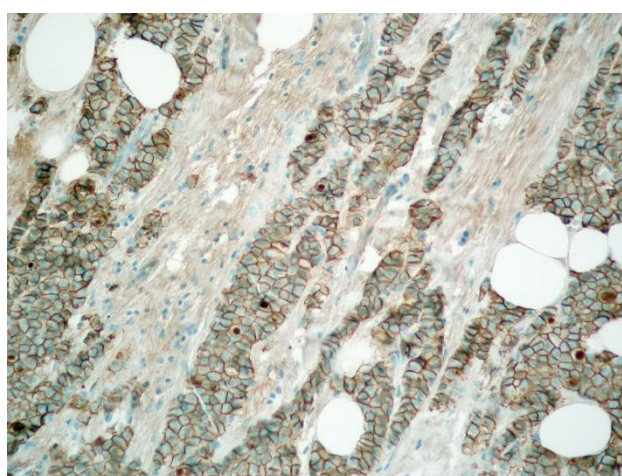
Slika 111. Kontrolna skupina, 2953/2010, e-cadherin, $\times 200$.



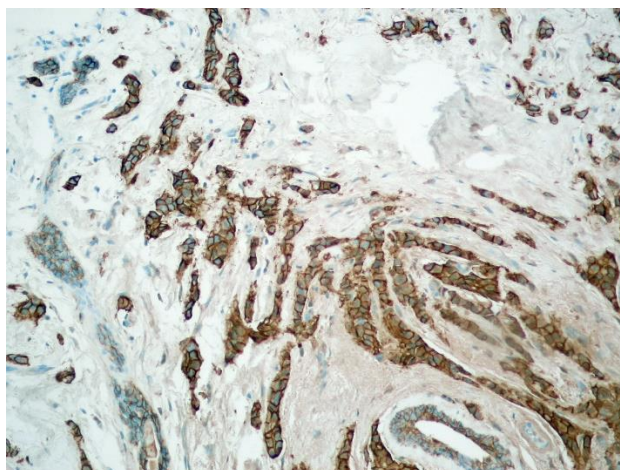
Slika 112. Kontrolna skupina, 3025/2010, e-cadherin, $\times 200$.



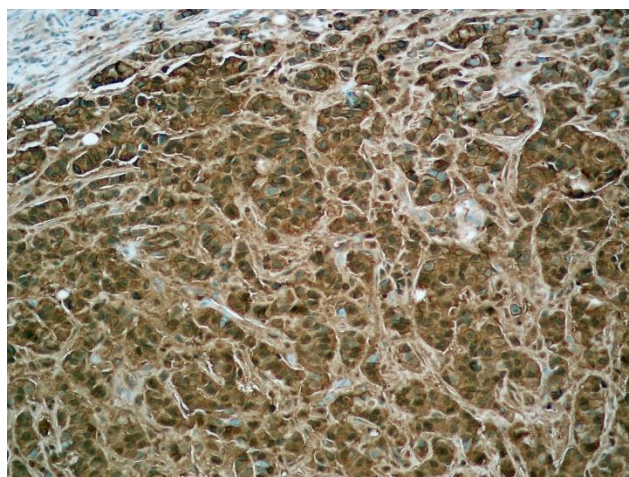
Slika 113. Kontrolna skupina, 3030/2010, e-cadherin, $\times 200$.



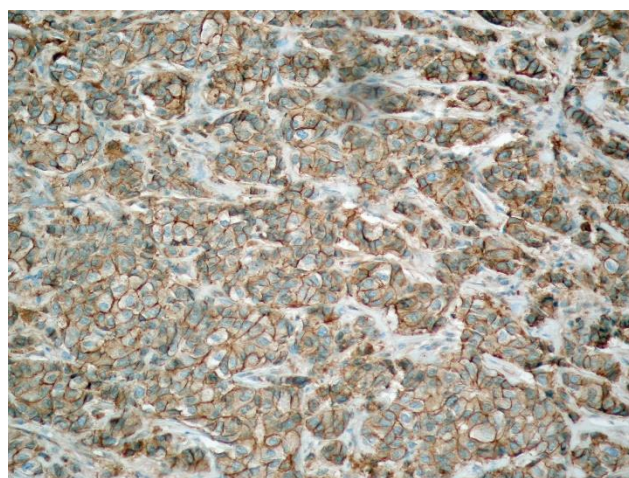
Slika 114. Kontrolna skupina, 3140/2010, e-cadherin, $\times 200$.



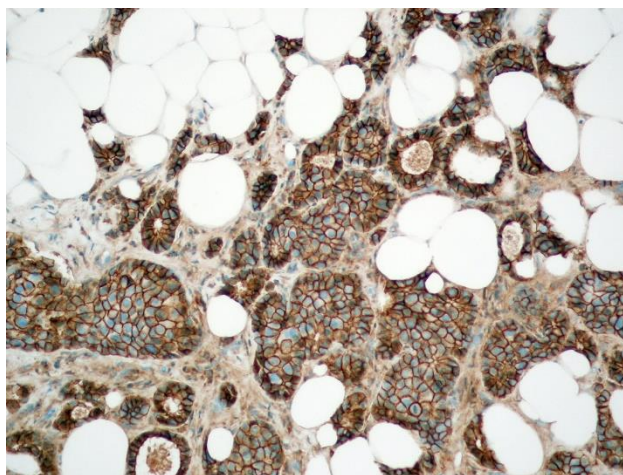
Slika 115. Kontrolna skupina, 3287/2010, e-cadherin, $\times 200$.



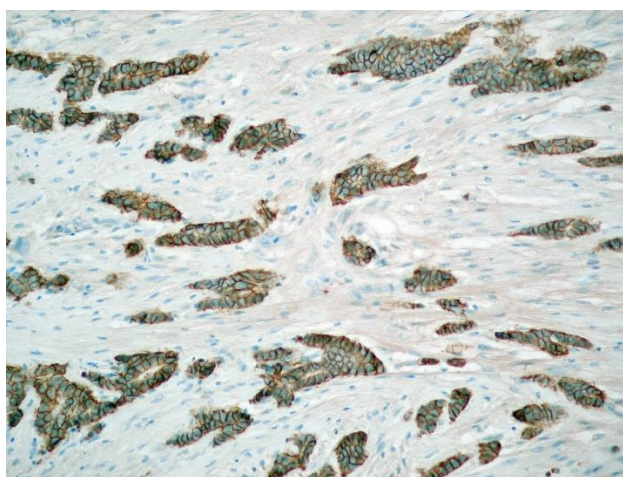
Slika 116. Kontrolna skupina, 3405/2010, e-cadherin, $\times 200$.



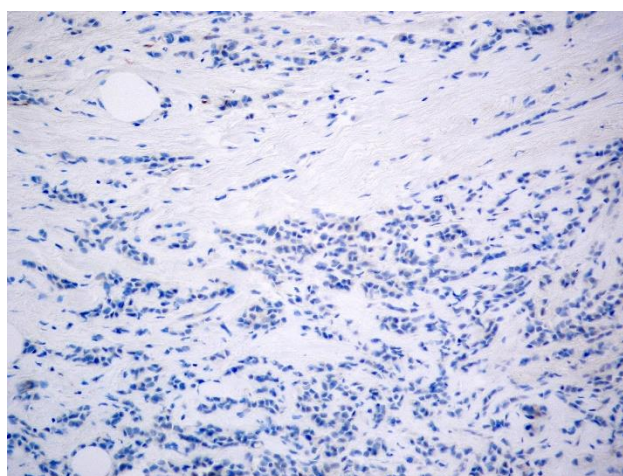
Slika 117. Kontrolna skupina, 3578/2010, e-cadherin, $\times 200$.



Slika 118. Kontrolna skupina, 3973/2010, e-cadherin, $\times 200$.



Slika 119. Kontrolna skupina, 3992/2010, e-cadherin, $\times 200$.



Slika 120. Kontrolna skupina, 4036/2010, e-cadherin, $\times 200$.