

PIK3CA mutacije u luminalnim, HER2 negativnim metastatskim karcinomima dojke

Krželj, Domagoj

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:171:224654>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-15**



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIOURUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Domagoj Krželj

**PIK3CA MUTACIJE U LUMINALNIM, HER2
NEGATIVnim METASTATSKIM KARCINOMIMA DOJKE**

Diplomski rad

Akademска godina:
2021./2022.

Mentor:
Prof. dr. sc. Snježana Tomić, dr. med.

Split, srpanj 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Domagoj Krželj

PIK3CA MUTACIJE U LUMINALNIM, HER2

NEGATIVNIM METASTATSKIM KARCINOMIMA DOJKE

Diplomski rad

Akademска година:

2021./2022.

Mentor:

Prof. dr. sc. Snježana Tomić, dr. med.

Split, srpanj 2022.

SADRŽAJ

1.UVOD	1
1.1 Anatomija i fiziologija dojke	2
1.2 Epidemiologija i definicija raka dojke	2
1.3 Etiologija raka dojke	3
1.4 Klinička slika	4
1.5 Patologija raka dojke	5
1.5.1 Histologija raka dojke	5
1.5.2 Molekularne karakteristike raka dojke	7
1.5.3. Prognostička i prediktivna obilježja raka dojke	8
1.6. Dijagnostički postupak za otkrivanje raka dojke	9
1.7. Liječenje raka dojke	11
1.7.1. Liječenje ranog oblika raka dojke	11
1.7.2. Liječenje uznapredovalog oblika raka dojke	12
1.7.3. Liječenje hormonskog ovisnog raka dojke	12
1.7.3.1. Hormonska terapija	13
1.8. Endokrina rezistencija	14
1.9. PI3K/Akt/mTOR signalni put	15
1.10. PIK3CA mutacije	15
1.10.1. Detekcija PIK3CA mutacija	16
1.10.2. PI3K inhibitor	16
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	17
3.ISPITANICI I POSTUPCI	19
3.1.Organizacija studije	20
3.2.Ispitanici	20
3.3.Metode istraživanja	20
3.4.Etička načela	21
3.5.Statistička analiza	21
4.REZULTATI.....	22
4.1.Obilježje pacijenata po spolu i dobi	23
4.2.Prisutnost PIK3CA mutacije	25
4.3. Distribucija vrste PIK3CA mutacija	26
5.RASPRAVA	29
6.ZAKLJUČCI.....	32
7.LITERATURA.....	34

8.SAŽETAK.....	38
9.SUMMARY.....	40
10.ŽIVOTOPIS	42

*Zahvaljujem se mojoj dragoj mentorici, prof.dr.sc. Snježani Tomić na stručnim savjetima,
posvećenom vremenu i nesebičnoj podršci prilikom izrade diplomskog rada.*

*Najveće hvala mojim roditeljima, Diani i Josipu, sestri Tini i psu Hugu bez vaše ljubavi i
podrške ne bih bio tu gdje jesam.*

POPIS KRATICA

AKT – serin/treonin kinaza

BRCA1 – gen za rak dojke (engl. *breast cancer gene 1*)

BRCA2 – gen za rak dojke (engl. *breast cancer gene 2*)

CDK4/6 – kinaze 4/6 ovisne o ciklinima (engl. *cyclin dependent kynase 4/6*)

CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

EGFR – receptor za epidermalni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor factor receptor*)

ER – estrogenski receptor

HER2 – receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

IQR – interkvartilni raspon

MAPK – mitogenom aktivirana proteinska kinaza (engl. *mitogen activated protein kinases*)

mTOR – mehanicistička meta rapamicina (engl. *mechanistic target of rapamycin*)

PCR – polimerazna lančana reakcija (engl. *polymerase chain reaction*)

PR – progesteronski receptor

PI3K – fosfatidil- 3-kinaza (engl. *phosphatidyl-3-kinases*)

PIP2 – fosfatidil-inozitol-4,5-bifosfat (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*)

PIP3 – fosfatidil-inozitol-3,4,5-fosfat (engl. *phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate*)

χ^2 test – hi kvadrat test

1. UVOD

1.1 Anatomija i fiziologija dojke

Dojka je modificirana parna i najveća žljezda kože koja u žena čini funkcionalnu jedinicu, a u muškaraca ostaje rudimentarni organ. Dojka, koja se nalazi na prednjoj strani prsnog koša, se sastoji od mlijecnih žljezda koje su uklopljene u vezivnu stromu. Dojka je povezana s pektoralnom fascijom pomoću ligamenata (*lat. ligg. suspensoria mammae*) (1). Između srednje aksilarne i parasternalne linije nalazi se anatomska regija dojke. Navedena regija se pruža od drugog do šestog rebra. Postranični rub sternuma čini medijalnu granicu, dok srednja aksilarna linija čini lateralnu granicu. Veliki i mali prsni mišić čine podlogu dojci (2).

Embriološko podrijetlo dojke čini mlijecna pruga nastala iz epidermisa. Tijelo dojke (*lat. corpus mammae*) čini 90% topografske anatomije. U anatomskim atlasima, tijelo dojke je prikazano kao sustav od 15 do 25 žljezdanih lobusa (*lat. lobi glandulae mammariae*). Na bradavici (*lat. papilla mammae*) preko proširenog dijela (*lat. sinus lactiferus*) se otvaraju mlijeci kanalići (*lat. ductus lactiferus*) (1). Građu same bradavice čine kružno raspoređene glatke mišićne niti. Na koži postoji tamniji krug koji okružuje bradavicu (*lat. areola mammae*). Zaobljeni oblik dojci daje masno tkivo uklopljeno u režnjeve (2).

Dojka krvlju opskrbljuje bogata anastomotska mreža koja potječe iz aksilarnih, unutarnje torakalne i interkostalnih arterija (1). Unutarnja prsna arterija (*lat. A. thoracica interna*) je glavna arterija koja dojku opskrbljuje kisikom dok aksilarna, unutarnja i lateralna torakalna vena čine venski splet dojke. Regija dojke je bogata limfnim čvorovima te aksilarni limfni čvorovi čine glavni limfski splet (2).

Nagli razvoj dojke počinje u pubertetu i to bujanjem žljezdanog tkiva. Na navedeno prvenstveno utječe ženski spolni hormoni poput estrogena i progesterona. U djevojčica, rast dojki je prvi pokazatelj puberteta. Spolni hormoni uzrokuju nagomilavanje masnog tkiva i grananje samih žljezdanih tračaka. Tek u trudnoći žljezdano tkivo je sposobno za sekreciju mlijeka. Majčino mlijeko je bogato proteinima sirutke koji čine 70% svih proteina. Osnovni sastojak mlijeka je voda. Također je bogato ugljikohidratima i vitaminima (2).

1.2 Epidemiologija i definicija raka dojke

Rak dojke je zloćudna bolest koja nastaje u tkivu dojke i to prvenstveno u kanalićima ili u režnjićima (2). Drugi po je prema učestalosti zloćudni tumor u žena (3). U zemljama „Zapada“ incidencija raka je najviša, dok je najniža u Aziji(3). Rak dojke najčešće je sijelo raka u žena u Republici Hrvatskoj. Prema posljednjim objavljenim podacima Registra za rak u

Hrvatskoj u 2019. zabilježeno je 2999 slučajeva raka dojke (stopa 143,2/100.000), a u 2020. umrle su 722 žene (stopa 34,7/100.000). U svijetu, prema podacima studije Globalnog opterećenja bolešću iz 2019., zabilježeno je više od 2 milijuna novih slučajeva raka dojke te više od 700.000 smrti od istog. Rak dojke se najčešće javlja u dobi iznad 50 godina, ali se može javiti i u mladih žena (4).

1.3 Etiologija raka dojke

Starija životna dob najznačajniji je čimbenik rizika za nastanak raka dojke. Učestalost raka dojke počinje zamjetnije rasti u dobi od 35 do 40 godina (3). Sljedeći čimbenik rizika za razvoj raka dojke je pozitivna obiteljska anamneza. U navedenu skupinu pripada obiteljski rak dojke. Genetska predispozicija može se dokazati u 10% uzoraka raka dojke. Mutacije koje se najčešće mogu dokazati jesu BRCA1 i BRCA2. To su tumor supresor geni. Žene s prethodnom navedenom mutacijom imaju češće obostran tumor koji se učestalo razvija u mlađoj životnoj dobi (4). Dugotrajna i kronična izloženost organizma estrogenu: duga reproduktivna dob (rana menarha i kasna menopauza), uzimanje hormonalne nadomjesne terapije, oralnih kontraceptiva i debljina povezani su s povećanim rizikom za nastanak raka dojke (3). Nalaz atipične duktalne hiperplazije povećava rizik nastanka raka dojke za 4 do 5 puta. Štetno i opasno ionizirajuće zračenje je još jedan rizik za nastanak raka dojke. Relativni rizici za nastanak raka dojke su prikazani u Tablici 1 (3).

Tablica 1. Rizični čimbenici i relativni rizici oboljevanja od raka dojke

Čimbenik rizika	Relativni rizik za nastanak raka dojke
Dob	15 puta
Pozitivna obiteljska anamneza	8 puta
Starija životna dob prvorodilje	4 puta
Nerotkinja	4 puta
Rana menarha i kasna menopauza	2,5 puta
Zračenje	5 puta
Debljina	3 puta
Oralni kontraceptivi	1,8 puta
Hormonska nadomjesna terapija	1,4 puta
Dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih bolesti dojke	5 puta

1.4 Klinička slika

Rak dojke najčešće se očituje kao bezbolan čvor u dojci. Rjeđe se nalazi smeđasto-krvavi iscjadak, uvlačenje bradavice, te otok i crvenilo kože dojke u predjelu tumora (6). U višim kliničkim stadijima mogu se naći povećani limfni čvorovi u pazuzu, ponekad s otokom ruke. Kod inflamacijskog raka dojke koža ima izgled kore naranče, a crvenilo i otok kože moraju zahvaćati najmanje 2/3 dojke (3).

Novonastala ili *de novo* metastatska bolest se očituje u 5-10% pacijentica. Bolest se prezentira simptomima udaljenih presadnica, poput boli u kostima ili može biti asimptomatska (5). Oko 50% tumora dojke nastaje u desnom lateralnom kvadrantu dok u ostalim kvadrantima tumor dojke čini 10%. Bradavica čini središnji kvadrant i tu se nalazi oko 20% tumora. Rak je multicentričan ili obostran u više od 4% oboljelih.

Tumori dojke šire se limfogene i hematogeno, a osim u limfne čvorove, mogu dati i udaljene metastaze. Najčešće se šire u pluća, jetru, kosti, mozak i nadbubrežne žljezde (6). U razvijenim zemljama, uvođenjem programa probira, prisutan je stalni trend smanjenja veličine primarnog tumora dojke (3).

1.5 Patologija raka dojke

Rak dojke zločudni je epiteln tumor dojke koji najčešće nastaje proliferacijom epitela terminalnih kanalića ili duktulo-lobularnih jedinica (6). Tumori mogu biti maligni i benigni. Klasifikacije raka dojke se baziraju po histološkim, molekularnim i kliničkim karakteristikama. U laboratorijskoj dijagnostici u upotrebi su klasični molekularni markeri. Također se određuje kliničko-patološki stadij tumora. ER, PR i HER2 status su izrazito važni i neizostavni su dio pretraga pri čemu tumore diferenciramo po skupinama. Osim navedenog, procjena histološkog statusa, biljega Ki-67 i stupnja diferencijacije imaju važnu ulogu (3).

1.5.1 Histologija raka dojke

Rak dojke se može klasificirati po stupnju invazivnosti. U Tablici 2 je prikazana histološka klasifikacija po skupinama. Osnovne skupine su neinvazivni, mikroinvazivni i invazivni tumori (6).

Tablica 2. Histološka klasifikacija karcinoma dojke

Neinvazivni karcinom	
Duktalni <i>in situ</i> karcinom	
Lobularni <i>in situ</i> karcinom	
Intraduktalni papilarni karcinom	
Mikroinvazivni karcinom	
Invazivni karcinom	
Karcinom dojke nespecificiranog podtipa (NST)	
Lobularni	
Karcinom s apokrinom diferencijacijom	
Mucinozni	
Tubularni	
Kribiformni	
Adenoid-cistični	
Metaplastični karcinom	
Mikropapilarni	
Rijetki tipovi karcinoma dojke	
Neuroendokrine neoplazme	

U skupini invazivnih karcinoma određuje se histološki stupanj diferenciranosti. Nottinghamski sustav se koristi u širokoj primjeni. Na temelju navedenog sustava tumori se razlikuju po tri stupnja zloćudnosti: niski ili dobro diferenciran (3-5 bodova), srednji ili srednje diferenciran (6 i 7 bodova) i visoki ili slabo diferenciran tumor (8 i 9 bodova). Ova klasifikacija se temelji na morfološkim obilježjima tumora (7). Od navedenih tumora iz Tablice 2 najčešći je invazivni karcinom nespecifiranog podtipa (NST) i čini 70-80% svih tumora. Invazivni lobularni čini 10-15% tumora dok se ostali rjede dijagnosticiraju (3).

1.5.2 Molekularne karakteristike raka dojke

U novije vrijeme, osim histološke podjele, koristi se podjela na temelju imunohistokemijskih i genskih obilježja (3). Izuzetno je važna biologija tumora. Tumore dojke je moguće grupirati u skupine na temelju ekspresije gena i statusu hormonalnih receptora čija je podjela prikazana u Tablici 3. Ovakva podjela je moguća usprkos dokazanim činjenicama da svaki pojedinačni tumor ima vlastiti genski profil (8).

Tablica 3. Molekularni tipovi raka dojke

	Luminalni A	Luminalni B	HER2 pozitivni	Trostruko negativni
Ekspresija gena	Ekspresija citokeratina	Ekspresija citokeratina i 2/neu gena; niska ekspresija gena za hormonske receptore	Ekspresija HER 2/neu gena; niska ekspresija gena za ER	Visoka ekspresija bazalnih epitelnih citokeratina, niska ekspresija gena za ER i HER 2 i njima pridruženih gena
Učestalost	40% raka dojke	15% raka dojke	15% raka dojke	20% raka dojke
ER [*] /PR [†] status	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.
HER2 [‡] /neu status	Neg.	Variabilno	Poz.	Neg.
Biološke osobitosti	Niski proliferacijski indeks	Izražena proliferacija u odnosu na Luminalni A	Visoki proliferacijski indeks	Visoki proliferacijski indeks

* estrogenski receptor

† progesteronski receptor

‡ engl. Human epidermal growth factor receptor 2

1.5.3. Prognostička i prediktivna obilježja raka dojke

Prognostički čimbenici određuju prognozu, dok prediktivni čimbenici ukazuju na terapijski odgovor samog tumora. Prognostički čimbenici jesu:

- Veličina primarnog tumora: veći je tumor povezan s lošijom prognozom preživljavanja (6).
- Status regionalnih limfnih čvorova: sama pozitivnost čvora na tumor ukazuje na lošu prognozu. Status čvorova se određuje u TNM klasifikaciji. Što je veći broj limfnih čvorova zahvaćen metastatskim tumorskim tkivom to je klinička prognoza lošija (3). Takve bolesnice imaju kraće preživljenje od onih bez zahvaćenih limfnih čvorova (6).
- Ki-67 mitotički indeks: viši je indeks povezan s lošijom prognozom. Pokazatelj je diobe malignih stanica (3).
- Stupanj diferencijacije tumora: vrlo važan prognostički čimbenik, slabije diferencirani tumori povezani su s lošom prognozom (6).
- Vaskularna invazija predstavlja negativni prognostički čimbenik (9).
- Dob bolesnice: mlada životna dob (manje od 35 godina) je povezana s lošijom prognozom (3).
- Histološki tip tumora: tubularni, kribiformni, mucinozni i adenoid cistični podtipovi invazivnih karcinoma imaju bolju prognozu u usporedbi s karcinomom dojke nespecificiranog podtipa (9).

Važni prediktivni čimbenici raka dojke jesu:

- Učinkovitost hormonalne terapije određena je statusom hormonalnih receptora: negativan nalaz hormonskih receptora definira neučinkovitost ovakvog načina liječenja (10).
- HER2 status: prekomjerna izraženost HER 2 izdvaja bolesnice s učinkovitim odgovorom na anti-HER2 ciljanu terapiju (3).

1.6. Dijagnostički postupak za otkrivanje raka dojke

Anamneza i klinički pregled su početni postupci kojim se započinje dijagnoza raka dojke. Pregled žene sa sumnjom na rak dojke počinje se vizualnom inspekcijom. Njome se ispituje postojanje nepravilnosti, simetrija, navlačenje kože i povećanje limfnih čvorova (3). Važno je da se dojka palpira unutrašnjom stranom prstiju i to u sjedećem i ležećem položaju. Osim navedenoga nužna je laboratorijska obrada krvi (kompletna i diferencijalna krvna slika i biokemijske pretrage). Od radioloških dijagnostičkih pretraga koristi se mamografija. Primjenjujemo je za ranu detekciju tumora dojke kao i za potvrdu palpabilnog nalaza. Najviše primjenjivana pretraga u dijagnozi raka dojke jest ultrazvučni pregled. Ova pretraga je manje specifična i senzitivna od mamografije, osobito u slučaju postmenopauzalnih žena. Ultrazvučne zrake ne prodiru dobro kroz masno tkivo koje je prisutno u dojkama postmenopauzalnih žena. Zato je ova pretraga metoda izbora za ranu detekciju raka dojke u premenopauzalnih žena (5). Za definitivni dokaz bolesti potreban je patohistološki nalaz uzorka tkiva. Potrebno je napraviti biopsiju širokom iglom ili ako, to nije moguće otvorenu kiruršku biopsiju tumora (11).

U patohistološkom nalazu raka dojke moraju biti navedena sljedeće stavke: veličina samog tumora, Ki-67 indeks, status hormonskih i HER2 receptora, stupanj diferencijacije tumora, odnos tumora prema reznim ranama te broj pozitivnih limfnih čvorova aksile. Nakon cijelog navedenog postupka, potrebno je odrediti TNM status (3). TNM status opisuje kolika je veličina samog tumora (T-tumor), jesu li zahvaćeni limfni čvorovi i koliko ih je zahvaćeno (N-node) te nalaze li se metastaze ili ne (M-metastasis). Nova, revidirana verzija TNM klasifikacije objavljena je 2017.godine. Navedenu klasifikaciju nalazimo u Tablici 4 (12).

Tablica 4. TNM klasifikacija raka dojke

T* X	Nije moguće procijeniti postojanje tumora
T0	Tumor ne postoji
Tis(DCIS)	Duktalni karcinom <i>in situ</i>
Tis(Paget)	Pagetova bolest bradavice
T1	Tumor \leq 20 mm u najvećem promjeru
T1mi	Tumor \leq 1 mm u najvećem promjeru
T1a	Tumor >1 mm, ali \leq 5 mm najvećem promjeru
T1b	Tumor >5 mm, ali \leq 10 mm u najvećem promjeru
T1c	Tumor >10 mm, ali \leq 20 mm u najvećem promjeru
T2	Tumor >20 mm, ali \leq 50 mm u najvećem promjeru
T3	Tumor >50 mm u najvećem promjeru
T4	Tumor bilo koje veličine s direktnom invazijom stijenke prsnog koša i/ili kože
T4a	Proboj tumora na stijenu prsnog koša; invazija ili adherencija pektoralnog mišića u odsutnosti invazije na ostale okolne strukture
T4b	Ulceracija i/ili ipsilateralni makroskopski satelitski čvor i/ili edem kože
T4c	Oba kriterija T4a i T4b
T4d	Inflamirani karcinom
N [†] X	Nema procjene
N0	Nema prisutnih metastaza u limfnim čvorovima
N1mi	Mikrometastaze (>0.2 mm)
N1	Metastaze u aksilarne limfne čvorove
N2a	Metastaze u 4-9 aksilarnih limfnih čvorova
N2b	Metastaze klinički detektirane u internim mamarnim limfnim čvorovima, sa ili bez mikroskopske potvrde
N3a	Metastaza u 12 ili više pazušnih limfnih čvorova ili metastaza u infraklavikularne limfne čvorove
N3b	N1a ili N2a u prisutnosti N1b
N3c	Metastaze u ipsilateralne supraklavikularne limfne čvorove
M [‡] 0	Ne postoje metastaze

* veličina primarnog tumora

† status regionalnih limfnih čvorova

‡ udaljene metastaze

1.7. Liječenje raka dojke

Rak dojke se najčešće liječi različitim kombinacijama više vrsta liječenja. Za liječenje raka dojke potreban je multidisciplinarni pristup. Tri su osnovna načina liječenja: kirurško liječenje, lijekovi i radioterapija. Od lijekova se koristi kemoterapija, ciljana biološka terapija, imunoterapija i hormonska terapija (13). Ciljevi liječenja jesu poboljšanje duljine i kvalitete života (3).

1.7.1. Liječenje ranog oblika raka dojke

Kirurški zahvat je primarni terapijski postupak u slučaju ranog i operabilnog raka dojke. U kirurške zahvate pripadaju mastektomija, kvadrantektomija i segmentektomija, kao i rekonstruktivni zahvati: subkutana mastektomija sa ili bez poštede bradavice. Poslijeoperacijska radioterapija se ordinira nakon poštedenih operacija radi smanjenja učestalosti lokalnog recidiva. Tijekom operacije mora se obaviti biopsija limfnog čvora u aksili (*engl. sentinel lymph node biopsy*). To je prvi drenirajući limfni čvor u aksili (11).

Nakon kirurškog zahvata i definitivnog patohistološkog nalaza procjenjuje se stadij bolesti. Ako je bolesnica sa srednjim i visokim stupnjem rizika ponovne pojave bolesti dodaje se adjuvantna terapija (13).

Adjuvantna radioterapija se ordinira nakon cijeljenja rane, obično mjesec dana poslije kirurške operacije. Cilj ove terapije je spriječiti ponovnu pojavu tumora u operiranoj dojci ili u regionalnoj limfnoj drenaži (3).

Adjuvantna hormonska terapija se provodi u onih pacijentica čiji je rak dojke pozitivan na hormonske receptore. Približno polovica metastatskih karcinoma dojke koji eksprimiraju ER i/ili PR reagira na endokrinu terapiju. Standardna terapija za premenopauzalne pacijentice je tamoksifen, odnosno selektivni estrogenski receptor modulator (SERM), dok je zlatni standard za postmenopauzalne žene primjena aromataznog inhibitora poput anastrozola (15). Minimalno trajanje endokrine terapije iznosi 5 godina.

Adjuvantna kemoterapija primjenjuje se u svih bolesnica sa srednjim i visokim rizikom za ponovnu pojavu tumora(14).

Adjuvantna imunoterapija primjenjuje se u bolesnica koje su HER2 pozitivne i s tumorom većim od 0,5 cm. Danas se primjenjuje trastuzumab u kombinaciji kemoterapijom istovremeno s radioterapijom i endokrinom terapijom (15).

1.7.2. Liječenje uznapredovalog oblika raka dojke

Danas se u bolesnica s metastatskim rakom dojke koristimo različitim terapijskim postupcima. Cilj je liječenja u navedenih bolesnica maksimalno produljenje života. Prosječno preživljenje bolesnica s metastatskom bolešću iznosi od 3 do 5 godina. Kod hormon ovisnih tumora koristimo endokrinu terapiju. Zlatni standard kod HER2 pozitivne metastatske bolesti jest kombinacija takсana i dva monoklonska protutijela trastuzumaba i pertuzumaba (14). Često se primjenjuje palijativna radioterapija. Osim lijekova koji djeluju na liječenje samog tumora, primjenjuje se i simptomatska-potporna terapija (13).

1.7.3. Liječenje hormonskog ovisnog raka dojke

Najzastupljeniji (75%) karcinomi dojke su luminalni karcinomi koji eksprimiraju alfa-estrogenske receptore (ER). Već nekoliko desetljeća njihova se ekspresija koristi kao terapijska meta u bolesnica s rakom dojke. Dostupni lijekovi imaju za cilj blokiranje ER ili inhibiranje sinteze liganda (16). Aktivacija ER potiče proliferaciju i preživljavanje normalnog i tumorski promijjenjenog tkiva dojke. Nakon vezanja za estrogen, ER se dimerizira i translocira u jezgru gdje ER dimeri vežu koaktivatore kako bi formirali transkripcijiski aktivni ER kompleks

(3). Razlikujemo četiri osnovne vrste hormonske terapije: ablativna, kompetitivna, aditivna i liječenje inhibitorima sinteze estrogena(15).

1.7.3.1. Hormonska terapija

U ablativnoj terapiji koriste se LHRH agonisti, ovariektomija, zračenje jajnika, adrenalektomija i hipofizektomija. Jajnik je glavni izvor estrogena u premenopauzalnih žena pa njegovim kirurškim uklanjanjem ili zračenjem dolazi do izrazitog pada razine estrogena u pacijentica (3). LHRH agonisti djeluju na način da u počecima njihove terapije stimuliraju izlučivanje gonadotropina što povećava razinu estrogena. Kasnije dolazi do paradoksalnog učinka koji rezultira prestankom izlučivanja gonadotropina i pada broja receptora za LHRH na hipofizi. Ovim načinom djelovanja LHRH agonista dolazi do smanjenja osjetljivosti hipofize što posljedično vodi do pada razine estrogena (17). Tamoksifen je najpoznatiji predstavnik kompetitivne terapije. Vezanjem na estrogenske receptore u stanicama tumora dojke onemogućuje vezanje estradiola i istodobno nema estrogenski učinak. Važno je napomenuti da tamoksifen djeluje kao selektivni estrogenski modulator. Antiestrogenski učinak ima na stanice tumora dojke, a estrogenski na kosti i endometrij. Koristi se kao adjuvantna terapija u premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena. Fulvestrant je još jedan lijek koji pripada u skupinu kompetitivne terapije. To je lijek koji ima isključivo antagonistički učinak na estrogenske receptore i time smanjuje njihovu izražajnost i potiče njihovu degradaciju. Sljedeća skupina jesu inhibitori sinteze estrogena. Aromataza je glavni enzim koji uzrokuje pretvorbu androstendiona u estrogen (15). Upravo se na navedeni način estrogen stvara u postmenopauzalnih žena. Postoje dvije podskupine ovih lijekova: nesteroidni i steroidni inhibitori aromataze. Anastrozol i letrozol pripadaju nesteroidnoj podskupini lijekova, dok je egzemestan pripadnik steroidne podskupine. U posljednjoj podskupini su aditivni lijekovi (15,17,18). Najčešće korišteni su gestageni. Uzrokuju smanjenje razine estrogena smanjenim oslobođanjem LH i FSH, potiču pretvorbu estradiola u manje aktivni spoj estriol i inhibiraju sekreciju ACTH. Na taj način smanjuju stvaranje androgenih prekursorsa koji se stvaraju u nadbubrežnoj žljezdi. Megestrol i medroksiprogesteron su najznačajniji predstavnici ove podskupine (18).

1.8. Endokrina rezistencija

Endokrino liječenje najučinkovitiji način liječenja hormon ovisnih karcinoma dojke. S vremenom, većina ovih tumora razvija rezistenciju na endokrinu terapiju (19). Primarna endokrina rezistencija definira se kao recidiv unutar 2 godine od početka adjuvantnog endokrinog liječenja ili kao napredovanje bolesti tijekom prvih 6 mjeseci tijekom prve linije endokrinog liječenja uznapredovalih ili metastatskih karcinoma dojke. Sekundarnu rezistenciju u ranom karcinomu dojke definiramo kao povrat bolesti koji se javlja nakon najmanje 2 godine od početka uzimanja endokrine terapije ili unutar prve godine od završetka uzimanja iste. U metastatskom ili uznapredovalom obliku raka, sekundarna rezistencija se definira kao progresija bolesti nakon više od 6 mjeseci od početka uzimanja endokrine terapije (10). Mehanizmi endokrine rezistencije uključuju promjene u ER/PgR signalom putu, poput poremećene regulacije ekspresije estrogenskih receptora, genomske i epigenetske promjene ERS1 gena, ispoljenost promijenjenih ER izoformi, posttranslacijske modifikacije, povećanu signalizaciju tirozin-kinaznih receptora i promijenjenu regulaciju staničnog ciklusa (20). Gubitak ER je jedan od glavnih uzroka *de novo* rezistencije na endokrino liječenje. Nekoliko studija je dokazalo da se ekspresija estrogenskih receptora može promijeniti iz ER-pozitivnog u ER-negativni karcinom dojke u 10-20% slučajeva. Zbog prethodnog navedenog uvijek je važno ponoviti imunohistokemijsku analizu ER u metastatskom tkivu kad god tkivni uzorak dostupan (19).

Mutacije gena ESR1, su rijetke kod primarnog raka dojke, ali su značajno češće u bolesnica s metastatskom bolesti dojke koje su prethodno primili endokrinu terapiju. Najčešće mutacije su D538G, Y537S, Y537C i E380. Navedene mutacije se nalaze na „hot spot“ u domeni ERA koja veže ligand što rezultira trajnom aktivacijom ER (19).

Mutacije gena za tirozin-kinazne receptore su jedan od uzroka endokrine rezistencije. Tirozin-kinazni receptori su obitelj receptora kojoj pripada receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR), receptor za faktor rasta sličan inzulinu (IGFR), receptor za vaskularni faktor rasta (VEGFR) kao i receptor za faktor rasta prijekla fibroblasta (FGFR). Prekomjerna ekspresija navedenih receptora povezana je s endokrinom rezistencijom. Nakon vezanja liganda na receptore, dolazi do intracelularne transdukcije signalnih puteva kao MAPK i PI3K/AKT signalnog puta (22). Navedeni putevi mogu aktivirati transkripcijsku aktivnost ER u odsutnosti estrogena i time dovode do stanične proliferacije i rasta tumora (10).

Poremećaj signalnog puta ciklin D/ciklin ovisne kinaze 4/6 (CDK4/6) je također još jedan mehanizama koji dovode do endokrine rezistencije.

U normalnim okolnostima primarni mehanizam aktivacije CDK je spajanje s ciklinom. Cilj aktiviranih CDK je regulacija staničnog ciklusa, transkripcija i popravak DNA (21). CDK4 zajedno s kompleksom ciklina D pogoduje progresiji stanice kroz G1 fazu staničnog ciklusa. U navedenoj fazi stanica se priprema za sintezu DNA. Retinoblastomski protein (pRb) kojeg sintetizira tumor supresorski Rb gen protein koji kontrolira napredovanje staničnog ciklusa na način da regulira G1 i S kontrolne faze ciklusa (19). Trajna aktivacija CDK 4, CDK6 i ciklina D uzrokuje fosfoliraciju pRb-a i time dovode do njegove inaktivacije omogućavajući stanicama neprestani ulazak u diobu (21).

1.9. PI3K/Akt/mTOR signalni put

PI3K/Akt/mTOR stanični signalni put se smatra središnjim signalnim putem koji zadužen za regulaciju staničnog rasta, preživljavanja, migraciju i proliferaciju stanica. Neodgovarajuća regulacija ovog puta doprinosi progresiji tumora i endokrinoj rezistenciji (22). Aktivacijom fosfatidil-inozitol-3-kinaze (PI3K) fosforilira se fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfat (PIP2) te nastaje fosfatidil-inozitol-3,4,5-fosfat (PIP3) koji dovodi do fosforilacije te posljedične aktivacije protein kinaze B (Akt). Akt fosforilira i koči aktivnosti negativnih regulatora mTOR-a (engl. mammalian target of rapamycin) te tako potiče aktivaciju mTOR signalnog puta. Različite mutacije PI3K gena koje kodiraju različite komponente tog puta poput: PIK3CA, PIK3CB, PIK3R1, AKT1 dovode do prekomjerne aktivacije PIK3 signalnog puta (23). Prekomjerna aktivnost PI3K/AKT/mTOR signalnog puta potiče transkripciju estrogenskih receptora unatoč njihovoj inhibiciji endokrinom terapijom što pridonosi nastanku endokrine rezistencije (24). Određene studije, poput SOLAR-1 studije, pokazale su da se kod bolesnica kod kojih se pojavila endokrina rezistencija kao posljedica poremećaja ovog signalnog puta, može premostiti davanjem inhibitora PI3K signalnog puta (25).

1.10. PIK3CA mutacije

PIK3CA mutacije su druga najčešća vrsta mutacije karcinomu dojke i to nakon BRCA 1/2 mutacija. Određene studije navode da se u 40% bolesnica s karcinomom dojke luminalnog tipa nalazi PIK3CA mutacije. U HER2 pozitivnim karcinomima dojke ova se mutacija nalazi u oko 25% bolesnica, a najrjeđa je (u oko 10%) bolesnica s trostruko negativnim karcinomima dojke (24).

Gen PIK3CA se nalazi na kromosomu 3q26.32 te kodira katalitičku podjedinicu

p110 α enzima PI3K skupine IA. Najčešće mutacije u PIK3CA genu u tumorima dojke su H1047X, E542K i E545K (26).

1.10.1. Detekcija PIK3CA mutacija

Za detekciju PIK3CA mutacija koristi se DNA dobivena iz primarnog ili metastatskog tumorskog tkiva ili iz krvi. Dobivena DNA dalje se može analizirati različitim molekularnim metodama koristeći RT-PCR, te sekvencioniranje primjenom Sangera ili sekvencioniranje nove generacije (NGS) (27).

1.10.2. PI3K inhibitor

Alpelisib (Piqray) je jedini PI3K inhibitor odobren za liječenje karcinoma dojke. Indiciran je za liječenje postmenopauzalnih žena koje imaju HR+/HER2 negativni rak dojke s dokazanom PIK3CA mutacijom (25). Način na koji alpelisib djeluje je da selektivno inhibira p110 α katalitičku izoformu PI3K enzima PI3K/AKT signalnog puta te time inhibira preživljjenje i rast tumorskih stanica. Efikasnost ovog lijeka je utvrđena u SOLAR-1 studiji. Alpelisib se koristi u kombinaciji s fulvestrantom. Maksimalna doza alpelisiba koju pacijent može tolerirati iznosi 400mg dnevno (28).

SOLAR-1 studija navodi da je medijan preživljjenja pacijenata koji su primali alpelisib plus fulvestrant iznosi 9,1 mjeseci za razliku od grupe pacijenata koji su primali placebo u kombinaciji s fulvestrantom u kojih je iznosio 5,4 mjeseca (25).

Najčešće nuspojave lijeka jesu hiperglikemija i makulopapularni osip. U 22% žena je zapažena hiperglikemija, dok je u 13% pacijentica prijavljen makulopapularni osip (28).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti udio bolesnica s luminalnim, HER2 negativnim, metastatskim karcinom dojke rezistentnim na endokrino liječenje s nalazom PIK3CA mutacija KBC Split u 2020. i 2021. godini.
2. Odrediti zastupljenost pojedinih mutacija.
3. Dobivene rezultate usporediti s podacima iz literature.

Hipoteza istraživanja: rezultati testiranja uzoraka bolesnica s luminalnim, HER2 negativnim, metastatskim karcinomom dojke rezistentnim na endokrino liječenje s nalazom PIK3CA mutacija KBC Split bit će usporedivi s rezultatima dobivenim u SOLAR-1 studiji.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Organizacija studije

Podaci su prikupljeni analizom elektroničke baze podataka Kliničkog zavoda za patologiju, sudske medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split gdje je i provedena studija. Studija je provedena u suradnji s Klinikom za onkologiju i radioterapiju KBC-a Split. Studija je retrospektivne prirode. Etičko povjerenstvo KBC-a Split je odobrilo istraživanje rješenjem broj: 2181-147/01/06/M.S.-22-02

3.2. Ispitanici

Prikupljeni su podaci o PIK3CA mutacijskom statusu u 99 bolesnika s dijagnosticiranim luminalnim, HER2 negativnim metastatskim karcinomima dojke, rezistentnim na endokrino liječenje u vremenskom periodu od 2020. do 2021. godine.

Kriteriji uključenja su: pacijenti sa HER2 negativnim luminalnim, metastatskim karcinomima dojke rezistetni na endokrinu terapiju u kojih je bio dostupan uzorak tumorskog tkiva s odgovarajućom količinom i kvalitetom DNK.

Kriteriji isključenja: pacijenti s prethodnom navedenim vrstom raka dojke kod kojih nije bio dostupan uzorak tumorskog tkiva s odgovarajućom količinom i kvalitetom DNK.

3.3. Metode istraživanja

Za potrebe izrade empirijskog dijela ovog diplomskog rada pristupljeno je medicinskoj dokumentaciji i elektroničkoj bazi podataka Kliničkog zavoda za patologiju, sudske medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

U bazu podataka uvrštene su dob, spol, prisutnost PIK3CA mutacije i distribucija hotspot mutacija u pacijenata u kojih je nađena PIK3CA mutacija.

Za detekciju mutacija korištena je metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) na aparatu Cobas V480 uz primjenu Cobas®PIK3CA mutacijskog testa, kojim su analizirane specifične mutacije na egzonima 1, 4, 77, 9 i 20 .

3.4. Etička načela

Plan ovog istraživanja je usklađen sa Zakonom o zaštiti pacijenata (NN169/04,37/08), Zakonom o provedbi Opće uredbe o zaštiti podataka (NN42/18), te odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije (NN55/08,139/15) i pravilima Helsinške deklaracije WMA 1964-2013. Etičko povjerenstvo KBC-a Split je odobrilo istraživanje rješenjem broj: 2181-147/01/06/M.S.-22-02

3.5. Statistička analiza

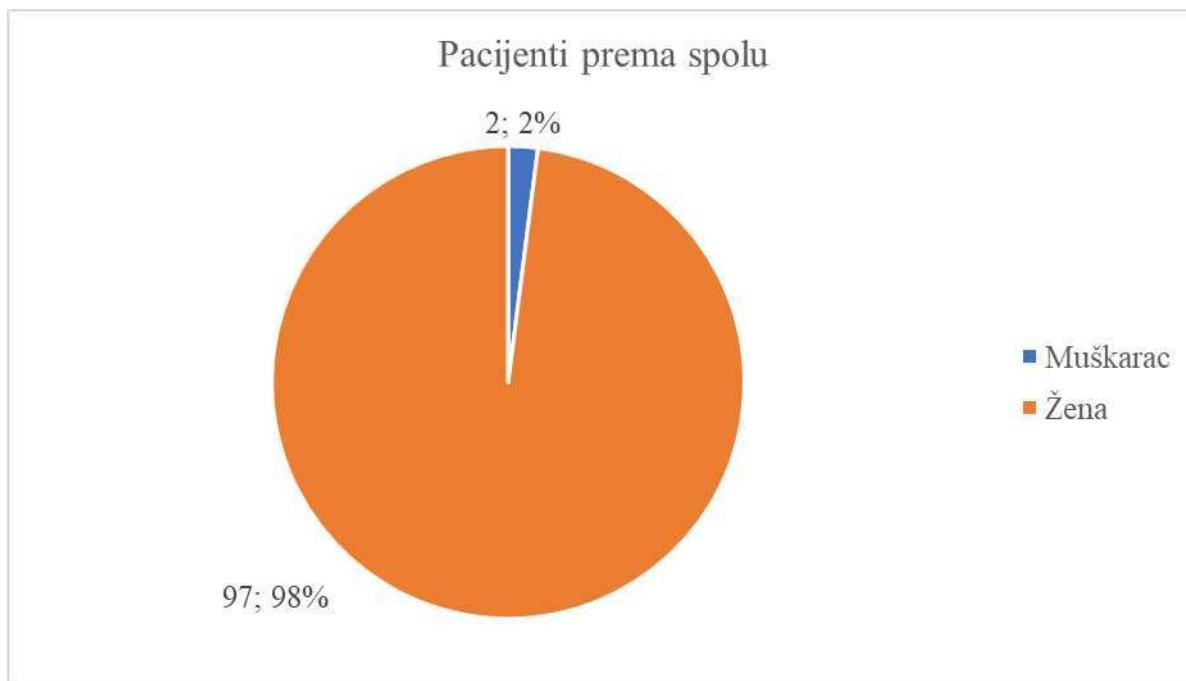
U radu se koriste metode grafičkog i tabelarnog prikazivanja kojima se prezentira struktura pacijenata upotrebom apsolutnih i relativnih frekvencija. Numeričke vrijednosti se prezentiraju upotrebom medijana kao srednje vrijednosti, te interkvartilnog raspona kao pokazatelja odstupanja oko srednjih vrijednosti. Razlika u strukturi pacijenata prema promatranim obilježjima se ispituje χ^2 testom, dok se u slučaju neispunjena uvjeta za provođenje χ^2 testa koristi Fisherov egzaktni test. Razlika u zastupljenosti pacijenata ispituje se Z testom razlike proporcija. Razlika u numeričkim vrijednostima se ispituje T-testom za nezavisna mjerena. Statistička značajnost postavljena je na P<0,05. Analiza je rađena u statističkom softwareu STATISTICA 12 (Tibco, Kalifornija).

4. REZULTATI

4.1. Obilježje pacijenata po spolu i dobi

Analizom elektronske baze podataka s Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju pronađeno je 99 bolesnika dijagnosticiranih s luminalnim, HER2 negativnim metastatskim karcinomima dojke rezistentnih na endokrinu terapiju, kod kojih je provedeno testiranje na PIK3CA mutaciju.

Većina pacijenata je ženskog spola (N=97, 98%) (Slika1).



Slika 1. Grafički prikaz pacijenata prema spolu

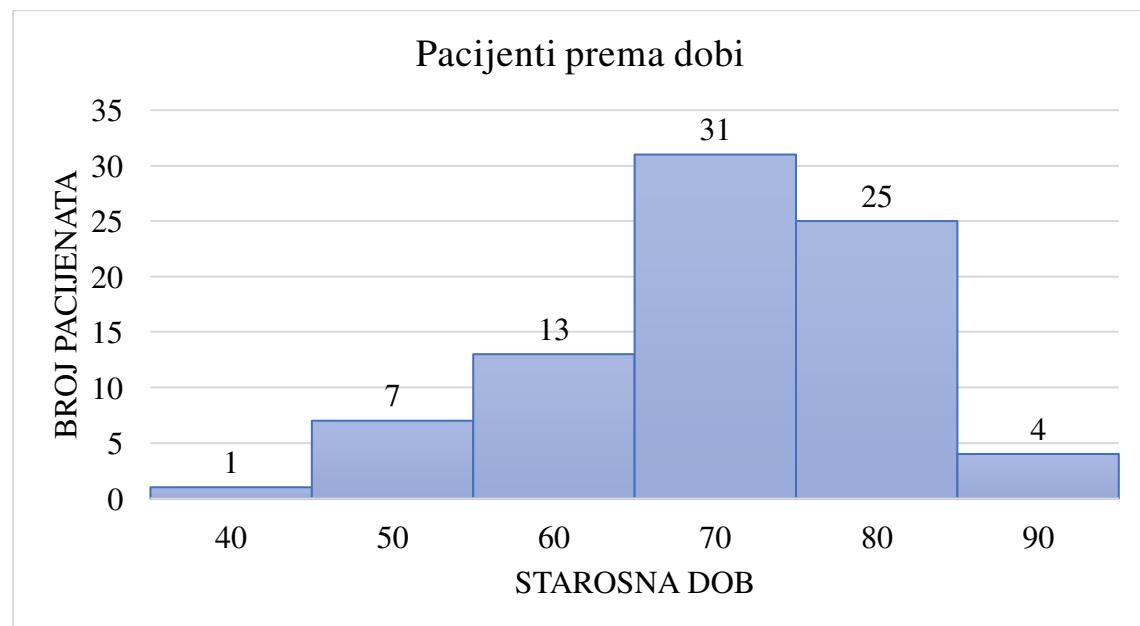
Medijan životne dobi bolesnica uključenih je 67 godina (IQR=59-72).

Najveći broj bolesnica je u dobnoj skupini od 60 do 70 godina (Slika 2). Ispitivanjem je utvrđena prisutnost statistički značajne razlike zastupljenosti pacijenata prema dobnoj strukturi ($\chi^2=53,89$; $P<0,001$) (Tablica 5).

Tablica 5. Pacijenti prema starosnoj skupini

Dobna skupina	N (%)	χ^2	P*
30-40	1 (1,23)		
40-50	7 (8,64)		
50-60	13 (16,05)		
60-70	31 (38,27)		
70-80	25 (30,86)		
80-90	4 (4,94)	53,89	<0,001

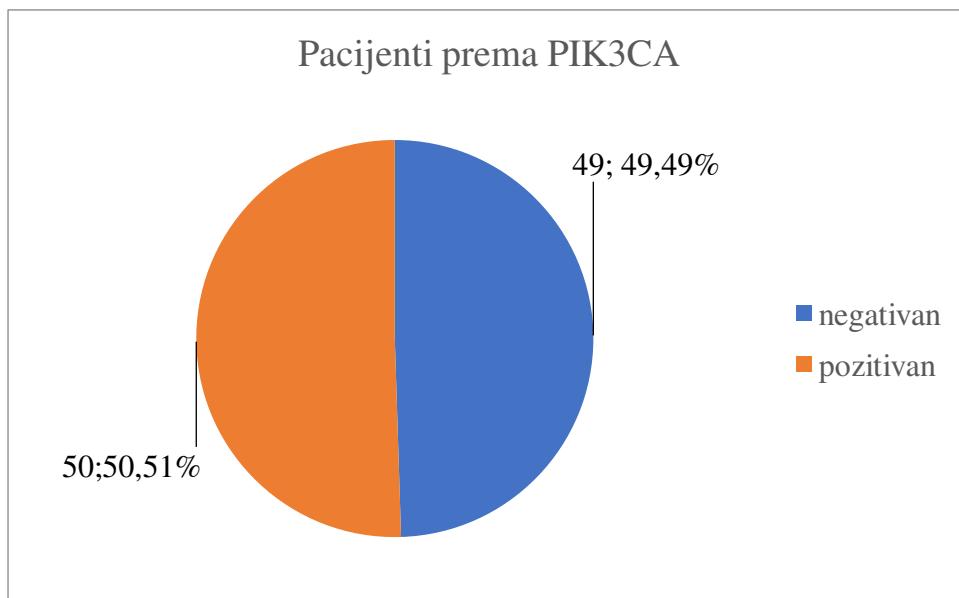
*Fisherov egzatni test



Slika 2. Histogram pacijenata prema životnoj dobi

4.2. Prisutnost PIK3CA mutacije

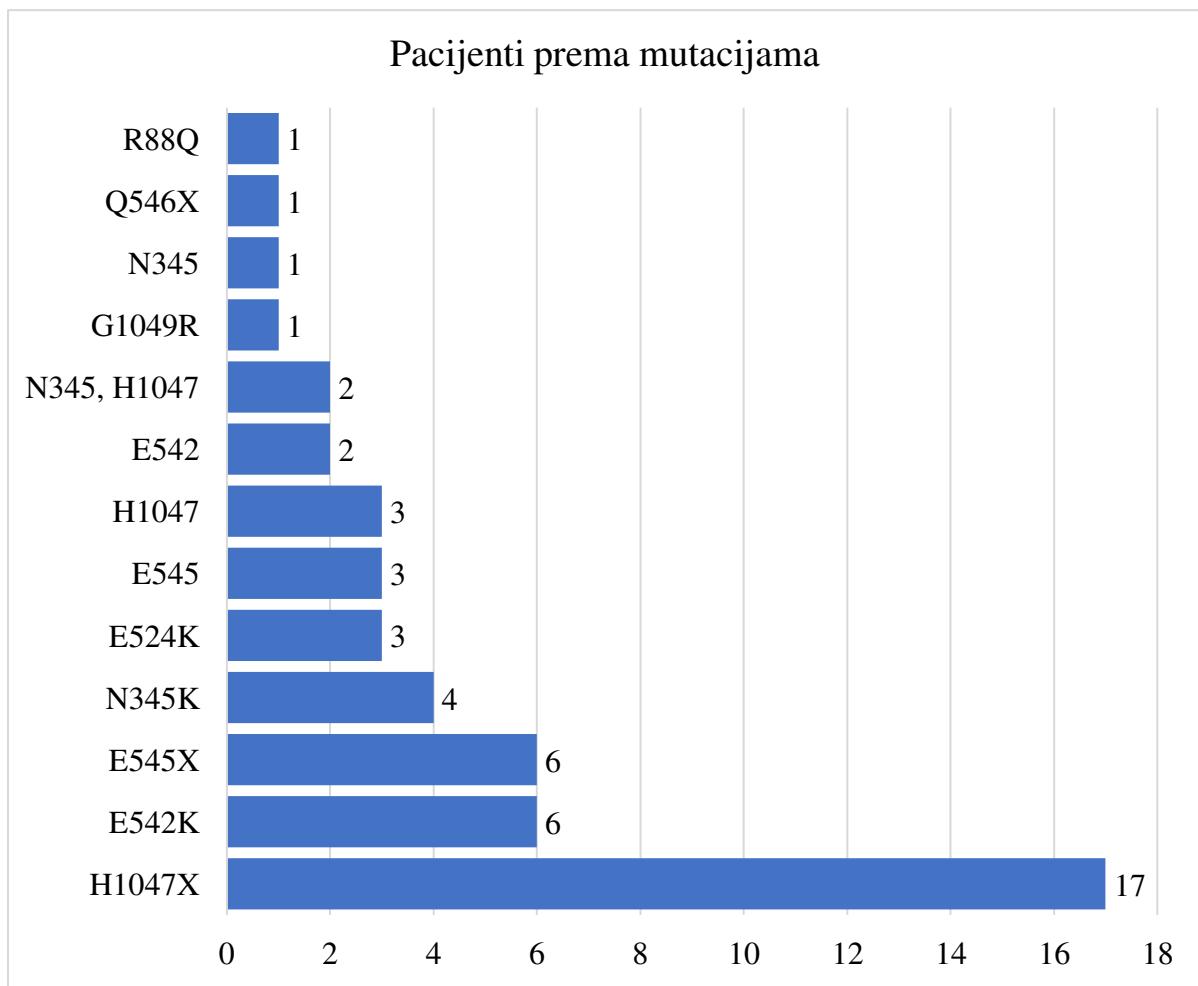
Svi uzorci od 99 pacijenata testirani su u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za patologiju, sudske medicinu i citologiju KBC-a Split. Prema rezultatima prisutnost PIK3CA mutacija je nađena u 50 bolesnika (51%) (Slika 3).



Slika 3. Grafički prikaz prisutnosti PIK3CA mutacije

4.3. Distribucija vrste PIK3CA mutacija

U pacijenata pozitivnih na PIK3CA mutaciju, u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za patologiju, sudske medicinu i citologiju određena je i vrsta PIK3CA mutacije. Najčešća mutacija je H1047X koja je utvrđena u 17 pozitivnih pacijenata (Slika 4).



Slika 4. Slikovni prikaz distribucije PIK3CA mutacija

5. RASPRAVA

Karcinom dojke je najčešći maligni tumor i vodeći uzrok smrtnosti u žena. Bez obzira na napredak u dijagnostici i liječenju metastatskih karcinoma dojke, riječ je o neizlječivoj bolesti. U posljednjih nekoliko godina, neke kliničke studije su identificirale nove molekularne ciljeve, terapijske mogućnosti i biomarkere na temelju kojih se može predvidjeti odgovor na ciljano liječenje.

U liječenju metastatskih, hormon pozitivnih, HER2 negativnih tumora dojke, endokrina je terapija metoda izbora (19). Tijekom vremena, veći broj žena razvija rezistenciju na ovakav oblik liječenja.

Oko 40% hormon receptor pozitivnih, HER2 negativnih karcinoma dojke imaju mutacije koje rezultiraju poremećajem PI3K/Akt/TOR signalnog puta. Ovaj je signalni put jedan od temeljnih puteva u progresiji malignih tumora dojki čija je prekomjerna aktivacija udružena s proliferacijom i preživljjenjem tumorskih stanica, te s poticanjem neoangiogeneze (23).

Blokada ovog puta primjenom alfa selektivnog PIK3CA inhibitora, alpelisiba, u kombinaciji s fulvestrantom koji je selektivni modulator estrogenskih receptora povezana je sa statistički značajnim produženjem preživljavanja do povrata bolesti i ukupnim preživljavanjem u žena sa hormon ovisnim, HER2 negativnim tumorima dojke, koje su razvije endokrinu rezistenciju (28).

Da bi se izdvojile bolesnice koje će imati koristi od primjene ovog lijeka ključno je odrediti mutacijski status PIK3CA gena u uzorcima tumora ili krvi bolesnice nekom od prihvaćenih i validiranih molekularnih metoda kao što su RT-PCR ili NGS (28). Djelovanje ovog lijeka kod žena s hormon pozitivnim, HER2 negativnim tumorima koje su razvije endokrinu rezistenciju, analiziran je u SOLAR-1 registracijskoj studiji (25).

U našem istraživanju napravljena je PIK3CA mutacijska analiza uzoraka tumorskog tkiva u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za patologiju, sudske medicinu i citologiju KBC-a Split primjenom RT-PCR metode.

U ukupnom uzorku od 99 pacijenata bilo 97 žena i dva muškarca, što je u skladu s značajno većim udjelom karcinoma dojke u žena u odnosu na muškarce (1:100) (6).

Srednja životna dob promatranih pacijenata bila je 67 godina, sa interkvartilnim rasponom između 59 do 72 godine. Najveći broj pacijenata bio je u dobi od 60 do 70 godina. U SOLAR-1 studiji, analizirano je 67 uzoraka postmenopauzalnih žena, a muškarci nisu bili uključeni u studiju. Prosječna dob i medijan pacijenata u SOLAR-1 studiji iznose 58 godina (IQR=37-79) te su navedeni pacijenti statistički značajno mlađi u odnosu na pacijente uključene u naše istraživanje.

U 99 uzoraka tkiva pacijenata liječenih u KBC-u Split, u njih 50 je nađena PIK3CA mutacija (51,51%). U SOLAR-1 studiji učestalost PIK3CA mutacija detektiranih RT-PCR metodom iznosila je 41,1% od testiranih bolesnica te su naši rezultati podudarni rezultatima iz navedene studije (25).

Analizom distribucije PIK3CA mutacija na pacijentima liječenih u KBC-u Split pokazala je da u 17 (34%) pacijenata pozitivnih na PIK3CA mutaciju (N=50) utvrđena mutacija H1047X na egzonu 20, te 14 (28%) mutacija na egzonu 9 (E542,545X i 545K). Ove mutacije predstavljaju 62% svih PIK3CA mutacija, što odgovara rezultatima SOLAR-1 studije, u kojoj su mutacije također nađene najčešće na egzonima 9 i 20 (25).

Na temelju navedenog, rezultati koji su dobiveni u KBC Split usporedivi su s rezultatima SOLAR-1 studije (25).

Uvođenje ciljanih lijekova, zasnovanih na biomarkerima, među kojima je i PI3K inhibitor Alpelisib, značajno je utjecalo na produljenje života i bolju kvalitetu života u bolesnica s metastatskim karcinomima dojke. Osnovni preduvjet personaliziranog liječenja oboljelih od karcinoma dojke je i precizno i pouzdano definiranje biomarkera standardiziranom metodologijom koja obuhvaća sve klinički značajne promjene gena kako bi se izdvojile bolesnice koje će imati najveći korist od liječenja.

Ograničenje ove studije je retrospektivni dizajn i relativno mali broj uzoraka, uključenost samo jednog centra i nedostatak korelacije s kliničkim podacima odgovora na liječenje alpelisibom u bolesnica s dokazanim PIK3CA mutacijama. Ono što je novo i značajno u ovom istraživanju jest prikaz mutacijskog statusa i distribucije specifičnih PIK3CA mutacija u bolesnica s hormon ovisnim metastatskim karcinomom dojke, rezistentnim na endokrino liječenje u KBC Split.

Na temelju rezultata ove studije, usporedivih s rezultatima registracijske studije SOLAR-1, RT-PCR metodologija korištena za detekciju PIK3CA mutacija je efikasna, specifična i senzitivna metoda za odabir bolesnica za liječenje PI3K inhibitorom, koja se može implementirati u većem broju laboratorija uz redovite vanjske i unutarnje provjere kvalitete i točnosti testiranja.

6. ZAKLJUČCI

- Od 99 analiziranih uzoraka tkiva pacijenata s metastatskim, hormon receptor pozitivnim, HER2 negativnim karcinomom dojke, koji su rezistentni na endokrinu terapiju liječenih u KBC-u Split, u njih 50 je nađena PIK3CA mutacija (51,51%).
- U 17 uzoraka tkiva pozitivnih na PIK3CA mutaciju (N=50) utvrđena mutacija H1047X na egzonu 20, te 14 mutacija na egzonu 9 (E542,545X i545K). Ove mutacije predstavljaju 62% svih PIK3CA mutacija, što odgovara rezultatima SOLAR-1 studije, u kojoj su mutacije također nađene najčešće na egzonima 9 i 20.
- Na temelju rezultata ove studije, usporedivih s rezultatima registracijske studije SOLAR-1, RT-PCR metodologija korištena za detekciju PIK3CA mutacija je efikasna, specifična i senzitivna metoda za odabir bolesnica za liječenje PI3K inhibitorom, koja se može implementirati u većem broju laboratorijskih ustanova uz redovite vanjske i unutarnje provjere kvalitete i točnosti testiranja.

7. LITERATURA

1. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Topografske regije prednje i lateralne strane prsnog koša. U: Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 2002. str. 203-6.
2. Reißig D, Salvetter J. Koža i kožni derivati. U: Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A i sur. Duale Reihe Anatomija. 3. prerađeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 1273-77.
3. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kustić Z, Gugić D, Juretić A, Tomić S. Rak dojke. U: Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kustić Z, Gugić D, Juretić A. Klinička onkologija. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 203-13.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo/ Služba za epidemiologiju i prevenciju kroničnih nezaraznih bolesti. Odjel za programe probira raka dojke [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2022. [citirano 20. svibnja 2022.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/odjel-za-programe-probira-raka-dojke/>
5. da Costa Vieira RA, Biller G, Uemura G, Ruiz CA, Curado MP. Breast cancer screening in developing countries. Clinics (Sao Paulo). 2017;72:244-53
6. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Bolesti dojke. U: Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija. 5. izdanje. Zagreb; Medicinska naklada; 2018. str. 639-57.
7. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V i sur. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. Breast Cancer Res. 2010;12:207.
8. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L i sur. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. Breast. 2015;24:26-35.
9. Truong PT, Yong CM, Abnousi F, Lee J, Kader HA, Olivotto I i sur. Lymphovascular invasion is associated with reduced locoregional control and survival in women with nodenegative breast cancer treated with mastectomy and systemic therapy. J Am Coll Surg. 2005;200:912-21.
10. Hanker A, Sudhan D, Arteaga C. Overcoming endocrine resistance in breast cancer. Cancer cell. 2020; 37:10.1016.
11. Šoša T, Sutlić Ž, Stanec Z, Tonković I. i sur. Dojka. U: Šoša T, Sutlić Ž, Stanec Z, Tonković I. i sur. Kirurgija. Drugo izdanje. Zagreb: Naklada lijevak; 2007. str. 884-89.
12. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. Springer link. 2018; 472:697-703.

13. Šeparović R, Tomić S, Ban M, Petrić Miše B, Stanec Z. i sur. Kliničke upute hrvatskoga onkološkog društva za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnica/ka oboljelih od invazivnog raka dojke. Liječnički vjesnik. 2015;137:172699.
14. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. Am Fam Physician. 2010;81:1339-46.
15. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Hormonska terapija. U: Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Klinička onkologija. Treće izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 83-6.
16. Lamb Caroline A, Vanzulli S, Lanari CLM. Hormone receptors in breast cancer: more than estrogen receptors. Conicet. 2019;79:540-45.
17. Drăgănescu M, Carmocan C. Hormone therapy in breast cancer. Chirurgia. 2017;112:413-17.
18. Katzung B, Masters S, Trevor A, Chrousos G. Spolni hormoni i njihovi inhibitori. U: Katzung B, Masters S, Trevor A. Temeljna i klinička farmakologija. Četrnaesto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2020. str. 699-726.
19. Hartkopf A, Grischke EM, Brucker S. Endocrine-resistant breast cancer: mechanisms and treatment. Breast care. 2020;15:347-54.
20. Alluri P, Speers C, Chinnaiyan A. Estrogen receptor mutations and their role in breast cancer progression. Breast cancer. 2014;16:494.
21. Roberto M, Astone A, Botticelli A, Carbognin L, Cassano A, D'Auria G. i sur. CDK4/6 inhibitor treatments in patients with hormone positive, HER 2 negative advanced breast cancer: potential molecular mechanisms, clinical implications and future perspectives. Cancers. 2021;13:332-52.
22. Ciruelos Gil EM. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. Elsevier. 2014;03004.
23. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. Apoptosis. 2004;9:667-76.
24. Keegan N, Gleeson J, Hennessy B, Morris P. PI3K inhibition to overcome endocrine resistance in breast cancer. Taylor and Francis. 2018;27:1-15.
25. Jurić D, Janku F, Rodón J, Burris H, Mayer I, Schuler M. i sur. Alpelisib plus fulvestrant in PIK3CA-wild type estrogen receptor-positive advanced breast cancer. JAMA Oncology. 2018;5:e184475.

26. Martínez-Saéz O, Chic N, Adamo B, Vidal M, González-Farré B. i sur. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast cancer research*. 2020;22:32404150.
27. Nagahashi M, Shimada Y, Ichikawa H, Nakagawa S, Sato N, Kaneko K. i sur. Formalin-fixed paraffin-embedded sample conditions for deep next generation sequencing. *J.Surg res.* 2017;220:125-32.
28. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo H.S. i sur. Alpelisib for PIK3CA-mutated,hormone receptor-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2019;380:20.

8. SAŽETAK

Ciljevi: U bolesnica s luminalnim, HER2 negativnim, metastatskim karcinomima dojke rezistentnim na endokrinu terapiju, liječenim u KBC Split u 2020. i 2021. godini u uzorcima tkiva tumora odrediti udio i tip PIK3CA mutacija, te dobivene podatke usporediti s rezultatima iz registracijske SOLAR-1 studije.

Ispitanici i postupci: Prikupljeni su podaci o 99 bolesnika s dijagnosticiranim luminalnim, HER2 negativnim, metastatskim karcinomima dojke u vremenskom periodu od 2020. i 2021. godine. To je retrospektivna analiza. Za potrebe izrade empirijskog dijela ovog diplomskog rada pristupljeno je medicinskoj dokumentaciji i elektroničkoj bazi podataka Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split. U bazu podataka uvršteni su dob, spol, prisutnost PIK3CA mutacije i distribucija specifičnih mutacija. Uzorci tumorskog tkiva analizirani su primjenom RT-PCR metode.

Rezultati: Utvrđena je značajna razlika u zastupljenosti pacijenata prema spolu u uzorku od 99 pacijenata. Najveći broj pacijenata nalazi se u dobroj skupini od 60 do 70 godina, dok srednja životna dob iznosi 67 godina. U 99 uzoraka tkiva pacijenata s metastatskim, hormon receptor pozitivnim, HER2 negativnim karcinomom dojke, koji su rezistentni na endokrinu terapiju liječenih u KBC-u Split, u njih 50 je nađena PIK3CA mutacija (51,51%). U 17 uzoraka tkiva pozitivnih na PIK3CA mutaciju (N=50) utvrđena mutacija H1047X na egzonu 20, te 14 mutacija na egzonu 9 (E542,545X i545K). Ove mutacije predstavljaju 62% svih PIK3CA mutacija, što odgovara rezultatima SOLAR-1 studije, u kojoj su mutacije također nađene najčešće na egzonima 9 i 20.

Zaključak: Na temelju rezultata ove studije, usporedivih s rezultatima registracijske studije SOLAR-1, RT-PCR metodologija korištena za detekciju PIK3CA mutacija je efikasna, specifična i senzitivna metoda za odabir bolesnica za liječenje PI3K inhibitorom, koja se može implementirati u većem broju laboratorija uz redovite vanjske i unutarnje provjere kvalitete i točnosti testiranja.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: PIK3CA mutations in luminal, HER2 negative metastatic breast cancer

Objectives: In patients with luminal, HER2-negative, metastatic breast cancers resistant to endocrine therapy, treated at KBC Split in 2020 and 2021, the proportion and type of PIK3CA mutations in tumor tissue samples was determined, and the obtained data was compared with the results from the registration SOLAR-1 study.

Subjects and methods: Retrospective analysis collected data on 99 patients diagnosed with luminal, HER2-negative, metastatic breast cancer in the period from 2020 to 2021. For the purposes of creating the empirical part of this thesis, the medical documentation and electronic database of the Clinical Institute for Pathology, Forensic Medicine and Cytology of the University Hospital of Split were accessed. Age, gender, presence of PIK3CA mutation and distribution of specific mutations were included in the database. Tumor tissue samples were analyzed using the RT-PCR method.

Results: A significant difference in the representation of patients according to gender was found in the sample of 99 patients. The largest number of patients is in the age group of 60 to 70 years, while the average age is 67 years. In 99 tissue samples from patients with metastatic, hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer, who are resistant to endocrine therapy treated at the University Hospital of Split, PIK3CA mutation was found in 50 of them (51.51%). In 17 tissue samples positive for the PIK3CA mutation (N=50), the H1047X mutation on exon 20 and 14 mutations on exon 9 (E542,545X and 545K) were found. These mutations represent 62% of all PIK3CA mutations, which corresponds to the results of the SOLAR-1 study, in which mutations were also found most frequently in exons 9 and 20.

Conclusion: Based on the results of this study, comparable to the results of the registration study SOLAR-1, the RT-PCR methodology used for the detection of PIK3CA mutations is an efficient, specific and sensitive method for selecting patients for PI3K inhibitor treatment, which can be implemented in a larger number of laboratories with regular external and internal checks on the quality and accuracy of testing.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Domagoj Krželj

Datum i mjesto rođenja: 14. travnja 1995., Split, Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: 21000 Split

Obrazovanje:

2010.-2014. IV. Gimnazija Marko Marulić Split, smjer opća gimnazija

2015.-2022. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studijski program Medicina