

# IZRAŽAJ NEKTINA-2 U TKIVIMA KARCINOMA DOJKE

---

**Herceg, Petra**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:835517>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-10**

*Repository / Repozitorij:*



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA  
Prijediplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Petra Herceg

IZRAŽAJ NEKTINA-2 U TKIVIMA KARCINOMA DOJKE

Završni rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA  
Prijediplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Petra Herceg

IZRAŽAJ NEKTINA-2 U TKIVIMA KARCINOMA DOJKE

Završni rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ilija Brzić

Komentorica rada: doc. dr. sc. Paola Kučan Brlić

UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT  
Undergraduate university study  
„Biotechnology and drug research“

Petra Herceg  
NECTIN-2 EXPRESSION IN BREAST CANCER TISSUES  
Bachelor's thesis

Rijeka, 2024.

Mentor: assoc. prof. Ilija Brzić, PhD.

Comentor: asst.prof. Paola Kučan Brlić, PhD.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ilija Brizić

Komentorica rada: doc. dr. sc. Paola Kučan Brlić

Završni rad obranjen je dana

---

pred povjerenstvom :

1.

2.

3.

Rad sadrži 34 stranice, 7 slika, 6 tablica i 40 literaturnih navoda

## **Zahvale**

Želim se zahvaliti mentoru izv. prof. dr. sc. Iliji Brziću na prilici te svoj pomoći, uloženom vremenu i trudu komentorice doc. dr. sc. Paole Kučan Brlić i mag. educ. biol. et chem. Eme Bellulovich. Velike zahvale obitelji na vječitoj potpori, osobitu bratu Luki na tehničkoj podršci. Također se zahvaljujem svim djelatnicima i suradnicima Medicinskog Fakulteta i Fakulteta biotehnologije i razvoja lijekova u Rijeci. Veliko hvala kolegama i prijateljima na pomoći, posebice Dori, Korini i Paoli.

## **Sažetak:**

**Cilj istraživanja:** Nektin-2 (Nec2) je adhezijska molekula sa značajnom ulogom u imunom odgovoru. Pretpostavlja se da povišen izražaj Nec2 na brojnim solidnim tumorima ima ulogu u razvoju karcinoma tako što omogućuje izbjegavanje imunološkog nadzora. Stoga interakcije Nec2 s imunološkim sustavom čine ovu molekulu obećavajućom metom za ciljanu imunoterapiju usmjerenu na poticanje imunološkog odgovora protiv stanica tumora. Istraživanja na ograničenoj skupini pacijentica utvrdila su da stanice karcinoma dojke imaju povišenu razinu izražaja Nec2. Ovo istraživanje nastoji nadopuniti dosadašnja saznanja, te na većoj skupini pacijentica kvantificirati izražaj membranskog Nec2 i utvrditi povezanost izražaja Nec2 i kliničko-patoloških podataka pacijentica.

**Materijali i metode:** Uzorci biopsija dojke pacijentica zajedno s odgovarajućim kliničko-patološkim podacima prikupljeni su iz arhiva Zavoda za patologiju i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Od ukupno 131 uzoraka izrađeni su tkivni mikroareji (eng. tissue microarray, TMA) te se provelo imunohistokemijsko bojanje membranskog Nec2. Kako bi kvantificirali razinu Nec2 izraženog na membranama stanica korišten je parametar H-ocjena za procjenu imunoreaktivnosti.

**Rezultati:** Uočena je visoka incidencija Nec2 pozitivnih uzoraka karcinoma dojke. Iako je uočen izražaj Nec2 i na netumorskim uzorcima razina izraženog Nec2 značajno je viša u tumorskim uzorcima. Nije uočena statistički značajna ovisnost izražaja Nec2 u stanicama sa sljedećim kliničko-patološkim podacima pacijentica: tip karcinoma, stadij proširenosti karcinoma, dob te hormonski HER2 status.

**Zaključak:** Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je razina izražaja Nec2 povećana u tkivima karcinoma dojke u odnosu na zdravo tkivo, međutim, nije uočena veza izražaja Nec2 s analiziranim kliničko-patološkim parametrima pacijentica.

**Ključne riječi:** Nektin-2, karcinom dojke, imunoterapija

## **Summary:**

**Research goal:** Nectin-2 (Nec2) is an adhesion molecule with a significant role in the immune response. Elevated expression of Nec2 in many solid tumors is presumed to play a role in cancer development through evasion of immune surveillance. Interactions of Nec2 with the immune system make this molecule a promising target for targeted immunotherapy aimed at regulating the immune response against tumor cells. Research on breast cancer cells determined an increased level of genetic and protein expression of Nec2, but in a limited group of patients. The current study aims to complete the previous findings by quantifying the expression of membrane Nec2 in a larger group of patients and to establish the connection between the expression of Nec2 and the clinical and pathological data of the patients.

**Materials and methods:** Samples of breast biopsies of female patients along with corresponding clinical and pathological data were collected from the archives of the Department of Pathology and Cytology, Rijeka Clinical Hospital Center. From a total of 131 samples, tissue microarrays (TMA) were made and immunohistochemical staining of membrane Nec2 was performed. In order to quantify the level of Nec2 expressed on cell membranes, the H-score parameter was used to assess immunoreactivity.

**Results:** A high incidence of Nec2 positive breast cancer samples was observed. Although Nec2 expression was also observed in non-tumor samples, the level of expressed Nec2 was significantly higher in tumor samples. No statistically significant dependence of Nec2 expression and following clinical and pathological data was observed: type of cancer, stage of cancer extension, age and hormonal HER2 status.

**Conclusion:** The results show an increased level of expressed Nec2 in breast cancer tissues compared to healthy tissue, however, no link between Nec2 expression and any clinical-pathological parameters of the patients was observed.



**Key words:** Nectin-2, breast cancer, immunotherapy

## Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Epidemiologija karcinoma dojke .....	1
1.2. Etiologija karcinoma dojke.....	1
1.3. Klasifikacija i stadiji karcinoma dojke .....	2
1.4. Načini liječenja i nuspojave.....	3
1.5. Napredak u dijagnostici i liječenju .....	4
1.6. Nektin-2 .....	5
1.7. Nektin-2 u imunološkom sustavu.....	5
1.8. Nektin-2 u tumorima .....	6
3. Materijali i metode .....	9
3.1. Kliničko-patološki podaci .....	9
3.2. Tkivni mikroarej (TMA) .....	10
3.3. Imunohistokemijsko bojanje i dodjela H-ocjene .....	10
3.4. Statistička obrada podataka.....	12
4. Rezultati .....	13
5. Rasprava .....	25
6. Zaključak .....	30
Literatura.....	31

# **1. Uvod**

## **1.1. Epidemiologija karcinoma dojke**

Karcinom dojke maligna je bolest žljezdanog parenhima dojke od koje većinom obolijevaju žene. Karcinom dojke najčešće je dijagnosticiran karcinom te je vodeći uzrok smrti od karcinoma kod žena (1). Tijekom godina zabilježen je konstantni rast stope učestalosti karcinom dojke, kako u svijetu tako i u Hrvatskoj (1). Usprkos rastu učestalosti, u posljednjih pet godina zabilježena je smanjena stopa mortaliteta od karcinoma dojke (2). Smanjena stopa mortaliteta prepisuje se kombinaciji dizanja javnozdravstvene svijesti o karcinomu dojke i važnosti redovitih mamografija te napretku u liječenju i dijagnostici.

## **1.2. Etiologija karcinoma dojke**

Dojka je žlijezda smještena na gornjem dijelu prsnog koša, sastavljena od 15 do 20 režnjeva (lat. *lobus*) mliječnih žlijezda koji se sastoje od još manjih anatomskih podjedinica, režnjića (lat. *lobulus*), okružene vezivnim masnim i mišićnim tkivom. Tijekom trudnoće i dojenja, pod utjecajem majčinih hormona, lobuli proizvode i izlučuju mlijeko. Svaki lobulus ima izvodni kanal (lat. *ductus*) koji prenosi mlijeko do bradavice.

Maligni tumori dojke gotovo su isključivo epitelni karcinomi koji nastaju iz mutacija epitelnih stanica duktalnih ili lobularnih elemenata. Maligno transformirane stanice mogu se proširiti u druge dijelove tijela putem tkiva, limfe ili krvi. Iako je točan uzrok karcinoma dojke nepoznat, postoje brojni rizični faktori, uključujući obiteljsku povijest bolesti, reproduktivnu povijest, izlaganje estrogenu, dob, pretilost i nasljedne mutacije, osobito u genima BRCA1 i BRCA2. Karcinom dojke je izrazito heterogena bolest, s raznolikom

morfologijom na molekularnoj i kliničkoj razini, što može značajno utjecati na dijagnozu i ishode liječenja (3).

### **1.3. Klasifikacija i stadiji karcinoma dojke**

Karcinom dojke klasificira se na nekoliko načina, s obzirom na anatomsku lokalizaciju, lokalnu ekspanziju i malignost. S obzirom na anatomsku lokalizaciju, karcinomi dojke dijele se primarno na lobularne ili duktalne. Većina karcinoma dojke duktalnog je podrijetla. S obzirom na lokalnu ekspanziju, karcinom dojke dijeli se na invazivni i mikroinvazivni, kada se stanica karcinoma proširila na susjedni parenhim dojke te na neinvazivni, kada stanica karcinoma ostaje unutar duktusa ili lobula.

Invazivni duktalni karcinom (IDC) najčešće je dijagnosticiran karcinom dojke, čineći približno 80% slučajeva (4). IDC nastaje u duktusima te je histološki karakteriziran kohezivnim čvrstim nakupinama stanica, koje se na tkivu manifestiraju kao čvorić. Vidljivost čvorića prilikom mamografije pomaže u dijagnostici karcinoma. Invazivni lobularni karcinom (ILC) nastaje u lobulima i čini oko 15% svih dijagnosticiranih invazivnih karcinoma (5). ILC karakterizira gubitak stanične adhezije u stanicama lobularnog karcinoma, što pridonosi nastanku raspršenih nakupina tumorskih stanica. Pojava tih raspršenih struktura znatno otežava dijagnosticiranje mamografijom. Mikroinvazivni karcinom relativno je rijedak oblik karcinoma dojke te čini manje od 1% svih slučajeva. Karakteriziran je širenjem stromalnih stanica karcinoma izvan bazalne membrane u susjedno tkivo, no sa žarištem invazije manjim od 1 mm (7).

Za razliku od invazivnih, neinvazivni (*in situ*) karcinomi (CIS) nemaju izraženu tumorsku invaziju kroz bazalnu membranu u okolne stromalne stanice, nego su ograničeni na mjesto nastanka. Prema mjestu nastanka, *in situ* karcinomi se primarno dijele na duktalni *in situ* karcinom (DCIS), također znan kao intraduktalni karcinom (6), ili lobularni *in situ* karcinom (LCIS) (5).

Određivanje stadija karcinoma dojke temelji se na TNM sustavu, koji uzima u obzir veličinu tumora (T), broj zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova (N), i prisutnost ili odsutnost metastaza (M) izvan regionalnih limfnih čvorova. Korištenjem ovog sustava, karcinom dojke može imati stadij od 0 do IV gdje stadij 0 podrazumijeva karcinom *in situ*, dok stadiji od I do IV označavaju invazivni karcinom, a stadij IV podrazumijeva i metastatsko širenje u udaljene organe (8).

Dodatno, imunohistokemijskom klasifikacijom, karcinomi dojke klasificiraju se u četiri skupine s obzirom na imunohistokemijsku izraženost receptora za estrogen i progesteron (hormonski status, HR status), HER2 receptor i proliferacijski biljeg Ki-67.

#### **1.4. Načini liječenja i nuspojave**

Za liječenje karcinoma dojke koristi se nekoliko različitih pristupa: kirurško odstranjivanje karcinoma, kemoterapija, radioterapija, hormonska terapija, i imunoterapija. Svaka od ovih terapija ima svoje prednosti kao i nedostatke. Kirurško odstranjivanje karcinoma, iako i dalje na prvom mjestu kao strategija liječenja karcinoma dojke, nije uvijek izvedivo te može dovesti do brojnih nuspojava i povećanog rizika od infekcije (9). Kemoterapija, odnosno sustavna primjena citostatika, koristi se kao metoda kojom se nastoji izbjeći kirurški pristup. Međutim, primjena citostatika povezana je s akutnom toksičnošću u organizmu jer su ti lijekovi nespecifični te prilikom uništavanja tumorskih stanica može doći i do oštećivanja zdravog tkiva, osobito u stanicama koje brzo proliferiraju (10). Radioterapija se najčešće koristi kao adjuvantna terapija nakon kirurškog odstranjivanja dojke u svrhu odstranjivanja preostalih tumorskih stanica (11). Hormonska terapija rjeđe je korištena metoda koja se primjenjuje u karcinomima s HR pozitivnim statusom te je također povezana s brojnim nuspojavama poput povećanog rizika od osteoskleroze ili razvijanja otpornosti na hormonsku terapiju (12,13). Jedan od novijih pristupa liječenja karcinoma dojke je imunoterapija, temeljena na uporabi

monoklonskih protutijela na HER2 receptor (engl. *human epidermal growth factor receptor*) koji je nerijetko pojačano izražen na tumorskim stanicama te pridonosi rastu tumora. Primjena monoklonskih protutijela dovodi do inhibicije rasta tumorskih stanica. HER2 imunoterapija koristi se samo u karcinomima s visokom razinom izražaja HER2 (HER2+) te najčešće u kombinaciji s kemoterapijom (14). Razvoj novih pristupa liječenja karcinoma dojke od izrazite je važnosti kako bi se prevladala ograničenja i nuspojave dosadašnjih terapija, pružila opcija pacijenticama koje ne odgovaraju na trenutne terapije ili dale nove mogućnosti kombinirane terapije kojom se može postići pozitivan aditivan odgovor.

### **1.5. Napredak u dijagnostici i liječenju**

Rastući interes za personaliziranu medicinu kao i napredak u molekularnoj medicini omogućili su razvoj dijagnostičkih metoda prilagođenih individualnim biološkim karakteristikama tumorskih stanica, uključujući i stanice karcinoma dojke. Molekularni biomarkeri, koji mogu predvidjeti odgovor na terapiju i progresiju bolesti, od posebnog su interesa jer omogućuju odabir optimalne terapije za svakog pacijenta. Osim dijagnostičkih aspekata, istražuje se sve veći broj biomarkera karcinoma dojke kao potencijalne mete za ciljanu antigensku imunoterapiju usmjerenu na pokretanje imunološkog odgovora. Jedan od značajnih uspjeha u takvoj ciljanoj imunoterapiji su inhibitori kontrolnih točaka, poput anti-CTLA-4 i anti-PD-L1, koji djeluju na istoimene inhibicijske Nec2 receptore, čime omogućuju regulaciju odgovora T-limfocita protiv stanica karcinoma. Učinkovitost te vrste imunoterapije dokazana je na brojnim solidnim tumorima, poput karcinoma pluća i melanoma (15). Uspjeh ciljane imunoterapije povećao je interes za istraživanje molekula izraženih na karcinomu dojke koje bi potencijalno mogle potaknuti imunološki antitumorski odgovor, pri čemu je jedna od tih molekula Nektin-2 (Nec2).

## **1.6. Nektin-2**

Nektin-2 (Nec2, PVRL2, CD112) je član obitelji nektina, koja pripada transmembranskim glikoproteinima iz superobitelji imunoglobulina. Proteini ove obitelji, ključni su za staničnu adheziju putem kadherina, kao i za mnoge druge stanične procese poput stanične proliferacije ili migracije. Proteini iz obitelji nektina, uključujući Nec2, imaju karakterističnu strukturu koja se sastoji od izvanstanične regije s tri imunoglobulinske domene, transmembranske regije te citoplazmatskog repa. Zahvaljujući posebnoj strukturi citoplazmatske regije, nektini mogu vezati afadin, molekulu koja povezuje ključnu komponentu citoskeleta, aktin, s drugim međustaničnim spojevima. Do sada su identificirana četiri člana obitelji nektina (16).

Nec2 primarno je opisan na površini epitelnih stanica, fibroblasta i neurona, gdje djeluje kao molekula koja uspostavlja heterofilične i homofilične adhezije između stanica (11). Tijekom homofilične interakcije, Nec2 uspostavlja trans-dimere s molekulama Nec2 na susjednoj stanici, dok tijekom heterofilične interakcije najčešće stupa u veze s ostalim članovima nektinske obitelji. Adhezijska uloga Nec2 očituje se u brojnim staničnim procesima, primjerice u spermatogenezi Sertolijevih stanica, gdje je ključan za održavanje integriteta sjemenih kanalića (16).

## **1.7. Nektin-2 u imunološkom sustavu**

Iako su primarno otkriveni kao adhezijske molekula, članovi Nektinske obitelji, pa tako i Nec2, imaju i značajnu ulogu u imunološkom odgovoru, kroz interakciju s inhibicijskim i aktivacijskim receptorima na imunološkim stanicama.

Nec2 stupa u interakciju s imunološkim receptorima DNAM1, TIGIT i PVRIG. DNAM1 (CD226) je aktivacijski receptor izražen na brojnim stanicama imunološkog sustava poput T-limfocita (CD4+ i CD8+), stanica NK, B-limfocita i monocita. Aktivacija receptora DNAM1 uslijed vezanja Nec2 može dovesti do pojačanog citotoksičnog učinka stanica NK i CD8 T-limfocita. TIGIT je inhibicijski receptor koji, poput DNAM1, ima izražaj na mnogim stanicama poput T-limfocita (CD4+ i CD8+) i stanica NK, te je osobito izražen na regulacijskim T-limfocitima. Za razliku od receptora DNAM1, TIGIT ima ulogu inhibicijskog receptora. Vezanjem Nec2 i TIGIT dolazi do inhibicije imunoloških stanica. Istraživanja su pokazala da se TIGIT veže za molekulu Nec2 s većim afinitetom nego DNAM1. CD112R (PVRIG) je inhibicijski receptor nektinske obitelji koji veže Nec2 s najjačim afinitetom. CD112 je uglavnom izražen na CD8+ T-limfocitima i stanicama NK. Kao i TIGIT, CD112R ima inhibicijsku ulogu u imunom sustavu pa vezanjem Nec2 na CD112R dolazi do inhibicije citotoksičnog odgovora CD8+ T-stanica.

Osim što Nec2 interakcijom s navedenim receptorima može doprinijeti aktivaciji ili inhibiciji imunološkog odgovora, nova istraživanja pokazala su da se Nec2 pojavljuje i na određenim stanicama imunološkog sustava, osobito na CD14+ tumorskim makrofazima (eng. *tumor associated macrophages*, TAM) (17)

### **1.8. Nektin-2 u tumorima**

Prekomjerni izražaj Nec2, opisan kod brojnih tumora, omogućuje tumorskim stanicama da izbjegnu nadzor imunološkog sustava kroz interakciju Nec2 s inhibicijskim receptorima (18). Primjeri uloge Nec2 u razvoju tumora uključuju: kolorektalni karcinom (19) i neuroblastom (20). U kolorektalnom karcinomu, pokazano je da prekomjerni izražaj Nec2 na tumorskim stanicama pridonosi inhibiciji T-staničnog odgovora. Slično tome, u neuroblastomu interakcija Nec2 s inhibicijskim receptorom TIGIT



smanjuje citotoksični učinak stanica NK, čime se omogućuje daljnja progresija karcinoma. Ova istraživanja sugeriraju ulogu Nec2 kao inhibitora kontrolnih točaka imunološkog sustava (TIGIT i CD112R) te ga čine atraktivnom metom za ciljanu imunoterapiju u Nec2 pozitivnim karcinomima (21). Terapijske mogućnosti ciljane imunoterapije na Nec2 već su pokazale obećavajuće rezultate u eksperimentalnom pretkliničkom istraživanju karcinoma ovarija (23). Sukladno tome, trenutno su u tijeku klinička istraživanja inhibitora Nec2 receptora CD112R, s obećavajućim rezultatima na uglavnom solidnim karcinomima (22).

Potencijalna uloga Nec2 u karcinomu dojke potvrđena je u nekoliko istraživanja, i pokazuje obećavajuće rezultate. Pretkliničko istraživanje Oshime i suradnika jedno je od prvih koje je utvrdilo prekomjerni izražaj Nec2 na stanicama karcinoma dojke te potvrdilo antitumorski učinak protutijela na Nec2 (24). Prekomjerni izražaj Nec2 na genetskoj kao i na proteinskoj razini (17,25,26) utvrđen je i na drugim studijama, ukazujući na potencijal Nec2 kao biomarkera karcinoma dojke. Ova studija nastoji doprinijeti dosadašnjim istraživanjima o izražaju Nec2 u karcinomu dojke te dodatno istražiti poveznicu izražaja Nec2 na tumorskim stanicama i određenih kliničko-patoloških parametrima.

## 2. Cilj istraživanja

Na temelju dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da Nec2 kao adhezijska molekula i osobito kao regulator imunskog sustava ima značajnu ulogu u razvoju tumora. Povećan izražaj Nec2 prethodno je identificiran u karcinomu dojke na genetskoj i proteinskoj razini, što ističe važnost Nec2 u dijagnostici te kao potencijalu metu u ciljanoj imunoterapiji. Stoga je glavni cilj ovog istraživanja utvrditi izražaj proteina Nec2 na membranama stanica karcinoma dojke te usporediti izražaj Nec2 po različitim kliničko-patološkim podacima pacijentica.

U okviru glavnog cilja postavljeni su specifični ciljevi:

- kvantifikacija izražaja membranskog Nec2 na uzorcima biopsije dojke pacijentica
- usporedba incidencije i razine izražaja Nec2 između uzoraka tumorskih i netumorskih tkiva dojke
- usporedba incidencije i razine izražaja Nec2 po različitim kliničko-patološkim podacima pacijenticama

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Kliničko-patološki podaci

Ova retrospektivna studija obuhvatila je 131 uzorak biopsija dojke, prikupljenih u razdoblju od 2006. do 2021. godine, koji su sadržavali tkiva benignih lezija i tumora dojke. Uzorci su donirani iz arhive Zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Tkivo je obrađeno prema standardnom protokolu odnosno fiksirano u 10% puferiranom formalinu (Kemika, Zagreb, Hrvatska), uklopljeno u parafin i obojeno hemalaun-eozinom (HE). Kliničku i histološku kategorizaciju pacijentica obavio je ovlašteni patolog te su u analizu uključeni samo uzorci koji su sadržavali dostatnu količinu reprezentativnog tkiva te odgovarajuće kliničke podatke pacijentica. Klinički podaci koji su uključeni u analizu su sljedeći: dob, vrsta karcinoma, status pacijentica s obzirom na izražaj hormonalnih receptora i HER2 receptora te veličina i proširenost tumora prema TNM sustavu. Za određivanje veličine i proširenosti tumora korišten je parametar pT, dio TNM sustava karakteriziran u Tablici 1.

**Tablica 1.** Kriteriji za određivanje stadija tumora preuzeti i prilagođeni iz (27)

Primarni tumor (T)	Opis
T1	Tumor ≤20 mm u najvećem promjeru Tumor >1 mm, ali ≤5 mm u najvećem promjeru (T1a) Tumor >5 mm, ali ≤10 mm u najvećem promjeru (T1b) Tumor >10 mm, ali ≤20 mm u najvećem promjeru (T1c) Tumor >20 mm, ali ≤50 mm u najvećem promjeru
T2	
T3	Tumor >50 mm u najvećem promjeru Tumor bilo koje veličine s izravnim prodorom u stijenku prsnog koša i/ili kožu (ulceracije ili makroskopski čvorovi na koži)
T4	

### **3.2. Tkivni mikroarej (TMA)**

Od prethodno odabranih parafinskih blokova prikupljeni su pripadajući HE mikroskopski preparati te je patolog odredio reprezentativno područje tumorskog tkiva. Odabrano područje označilo se na staklu voodootpornim flomasterom i prenijelo na pripadajući parafinski blok davatelj. Pomoću aparata MTA Booster OI (Alphelys, Plaisir, Francuska) s označenog mjesta na bloku davatelju, uzela su se 2 cilindra tumorskog tkiva promjera 1,5 mm te su se umetnuli u parafinski blok primatelj (TMA blok). Cilindri tumorskog tkiva umetnuti su u smjeru x i y koordinatnih osi te je na svaki TMA blok dodan cilindar zdravog tkiva jetre koji služi kao orijentacijski uzorak. TMA blok inkubiran je preko noći u termostatu na 40°C kako bi se cilindri povezali i uklopili u parafinski blok primatelj. Na mikrotomu LeicaRM2125RT (Leica Biosystems, Illinois, USA) izrađeni su rezovi debljine 4 µm radi daljnje imunohistokemijske analize (eng. *immunohistochemistry*, IHC).

### **3.3. Imunohistokemijsko bojanje i dodjela H-ocjene**

Rezovi TMA blokova prebačeni su na adhezijska stakla (DakoREALTM, Glostrup, Danska) te ostavljeni preko noći u termostatu na 37 °C kako bi se dodatno poboljšala adhezija tkiva za staklo. Deparafinacija tkiva izvršena je u supstituciji za ksilen (Tissue-Tek, Sakura, UK) tri puta po sedam minuta. Rehidracija tkiva izvršena je dva puta po pet minuta u 100% etanolu, pet minuta u 90% i pet minuta u 70% etanolu. Zatim je tkivo isprano pet minuta u destiliranoj vodi. Za otkrivanje antigenskih epitopa (eng. *antigen retrieval*) primijenjen je toplinom inducirani pretretman, odnosno tkivo je tretirano Tris/EDTA pH 9 puferom u trajanju od 15 minuta u vodenoj kupelji na 97°C. Tkivo je zatim ohlađeno i isprano dva puta po tri minute u destiliranoj vodi i pet minuta u PBS-u. Nakon deparafinizacije i otkrivanja antigenskih epitopa proces imunohistokemijskog bojanja proveden je u automatskom imunobojaču (Dako Autostainer Plus,

DakoCytomationColorado Inc, Fort Collins, CO, SAD). Uzorci su inkubirani 30 minuta s primarnim Nektin-2 protutijelom, klon EPR21124 (Abcam, ab233384), razrijeđenim s komercijalnim otapalom za antitijela u omjeru 1:250 (SignalStain® Antibody Diluent #8112). Tkivo je tretirano s 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peroxidase-Blocking Solution, DakoREAL™, Glostrup, Danska) i inkubirano pet minuta na sobnoj temperaturi kako bi se blokirala endogena peroksidaza te je zatim isprano dva puta u puferu za ispiranje (Dako Wash Buffer 10x, Glostrup, Danska). Pufer za ispiranje je prethodno razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:10. Nakon toga primijenjen je vizualizacijski sistem DakoREAL™ EnVision™ Detection System, Rabbit/Mouse (35 minuta), a potom DakoREAL™ DAB+ Chromogen (sadržan u EnVision™ kitu), koji je korišten kao kromogen. Stakla su isprana s destiliranom vodom i potom kontrastirana Mayerovim hematoksilinom pet minuta. Hematoksilin je ispran u vodi iz slavine u trajanju od 15 minuta. Na samom kraju izvršena je dehidracija tkiva u etanolu, ispiranje u zamjeni za ksilen i montiranje pokrovnih stakalca s medijem za montiranje (Entellan®new Mounting Medium, Merck Millipore, Germany).

Gotovi preparati pregledani su i interpretirani od strane ovlaštenog patologa. Evaluacija imunoreaktivnosti Nec2 u promatranim stanicama, odnosno intenzitet membranskog i citoplazmatskog obojenja, ocjenjen je kao slab, umjeren ili jak. Nakon određivanja intenziteta bojenja, izračunata je H-ocjena (eng. *histoscore*, *H-score*) za membransko bojenje tumorskih stanica prema sljedećoj formuli:  $3 \times \text{postotak stanica s jako obojenim membranama} + 2 \times \text{postotak stanica s umjereno obojenim membranama} + \text{postotak stanica sa slabo obojenim membranama}$ .

### **3.4. Statistička obrada podataka**

Određivanje povezanosti između kategoričkih parametara mjerena je korištenjem Chi-kvadrat (eng. *Chi-square*) testa (28). Prema Cochranovom pravilu za parametre s manje od 30 ukupnih mjerenja i/ili s bar jednom očekivanom vrijednošću u kontingencijskoj tablici ispod pet, korišten je Fisherov egzaktni test (29). Obzirom da su dobiveni rezultati neravnomjerno raspodijeljeni, za usporedbu medijana vrijednosti H-ocjene Nec2 korišteni su neparametrijski testovi. Usporedba H-ocjene za kliničko-patološke karakteristike s dvije grupe analizirana je Mann-Whitney testom (30), a za one s više od dvije grupe Kruskal-Wallis testom s post-hoc Dunn testom (31). Rezultati s  $p < 0,05$  smatrani su statistički značajnima. Statističke analize provedene su korištenjem programa GraphPad Prism (verzija 10.2.3, Dotmatics, Insightful Science, LLC, UK), dok su pripreme, prilagodbe i finalno kreiranje izvršeni u MS Excel softveru.

## 4. Rezultati

Kako bi ispitali prisutnost i razinu Nec2 u dostupnim tkivima dojke, na blokovima tkivnih mikroareja dojke (engl. *tissue microarray*, TMA) napravljena je imunohistokemijska analiza. Ukupno je analiziran 131 uzorak tkiva dojke, od čega su 27 uzoraka benignih lezija (mikrokalcifikati) i 104 uzorka tumorskog tkiva. Tumorski uzorci su klasificirani prema sljedećim različitim patohistološkim kriterijima: histološki tip karcinoma (invazivni duktalni vs. lobularni karcinom), parametar pT, dio TNM klasifikacije (Tablica 1., sekcija Materijali i metode) i hormonalni/HER-2 status pacijentica. Kliničko-demografski podaci pacijentica prikazani su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Kliničko-patološke karakteristike analizirane kohorte

Parametra	Podgrupa	Broj pacijentica [n(%)]
Benigne lezije		27 (20.6%)
Dob		
	≤62	20 (74.1%)
	>62	7 (25.9%)
Tumori		104 (79.4%)
Dob		
	≤62	62 (59.6%)
	>62	42 (40.4%)
Vrsta tumora		
	Invazivni duktalni karcinom	90 (86.5%)
	Lobularni karcinom	11 (10.6%)
	Invazivni duktalni i lobularni karcinom	2 (1.9%)
	In situ	1 (1.0%)
Stadij tumora po pT parametru		
	pT1	52 (50%)
	pT2	38 (36.5%)
	pT3	5 (4.8%)
	pT4	2 (1.9%)
	*pTmic	1 (1.0%)
	**pT1cm	1 (1.0%)
	nepoznato	5 (4.8%)
HER2/HR status tumora		
	HR-/HER2-	10 (9.6%)
	HR-/HER2+	20 (19.2%)
	HR+/HER2-	68 (65.4%)

---

\* Mikroinvazivni duktalni karcinom

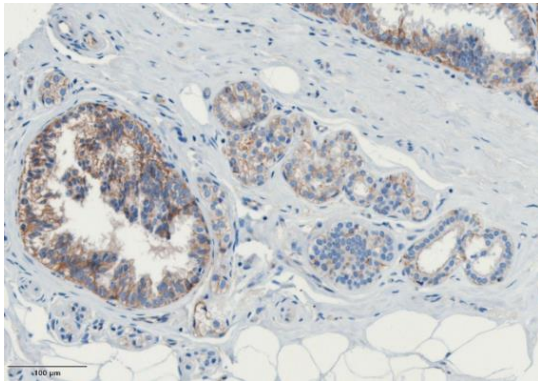
\*\*Invazivni duktalni karcinom s više žarišta

---

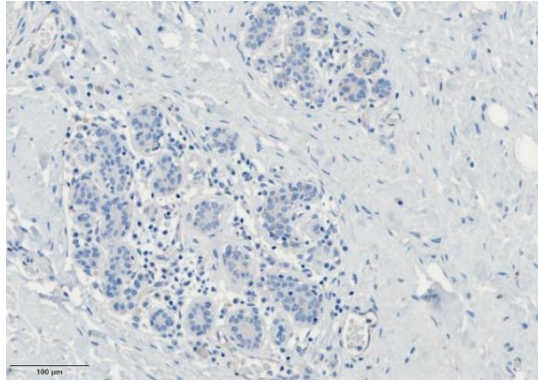
Za kvantifikaciju izražaja proteina Nec2 na membranama tumorskih stanica korišten je parametar H-ocjene koji se standardno koristi za interpretaciju imunoreaktivnosti u sklopu IHC analize, kao što je prethodno opisano u sekciji Materijali i metode. Imunoreaktivnost Nec2 u tumorskim tkivima kategorizirana je u četiri skupine s obzirom na vrijednost H-ocjene: Nec2 negativno (H-ocjena  $\leq 14$ ), Nec2 nisko (H-ocjena 15-99), Nec2 umjereno (H-ocjena 100-199) te Nec2 visoko (H-ocjena  $\geq 200$ ). Kriteriji navedenih kategorija preuzeti su iz dosadašnjih sličnih istraživanja (32). U uzorcima benignih lezija, H-ocjena nije određena. Umjesto toga, opisani su na osnovu prisutnosti ili odsutnosti imunoreaktivnosti te intenzitetu imunoreaktivnosti. Intenzitet Nec2 imunoreaktivnosti u benignim lezijama klasificiran je kao nizak, umjeren ili visok. Na Slici 1. prikazani su reprezentativni uzorci navedenih kategorija u tumorskim tkivima i benignim lezijama.



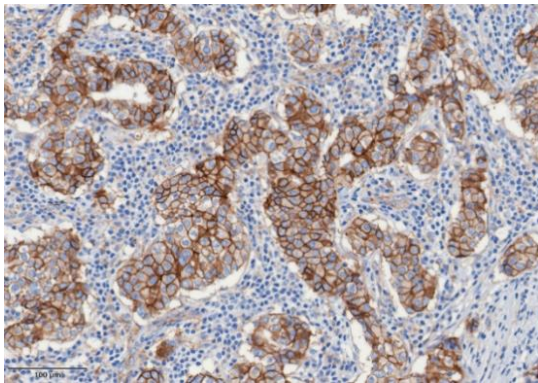
A)



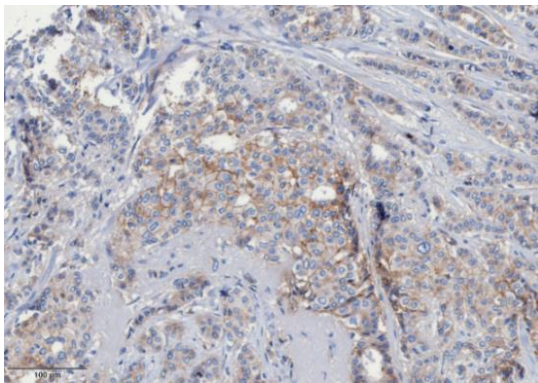
B)



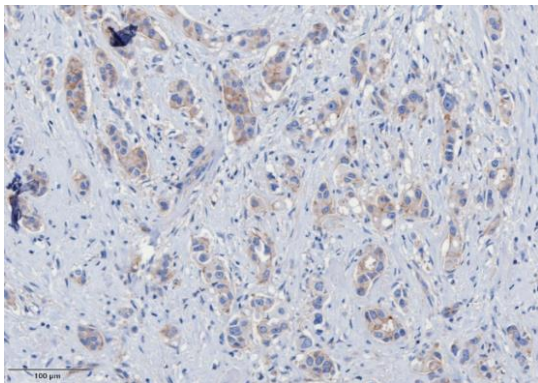
C)



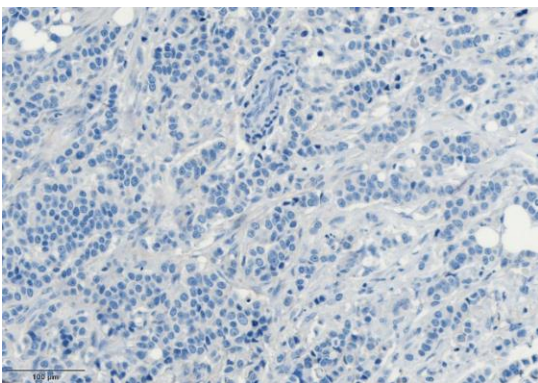
D)



E)

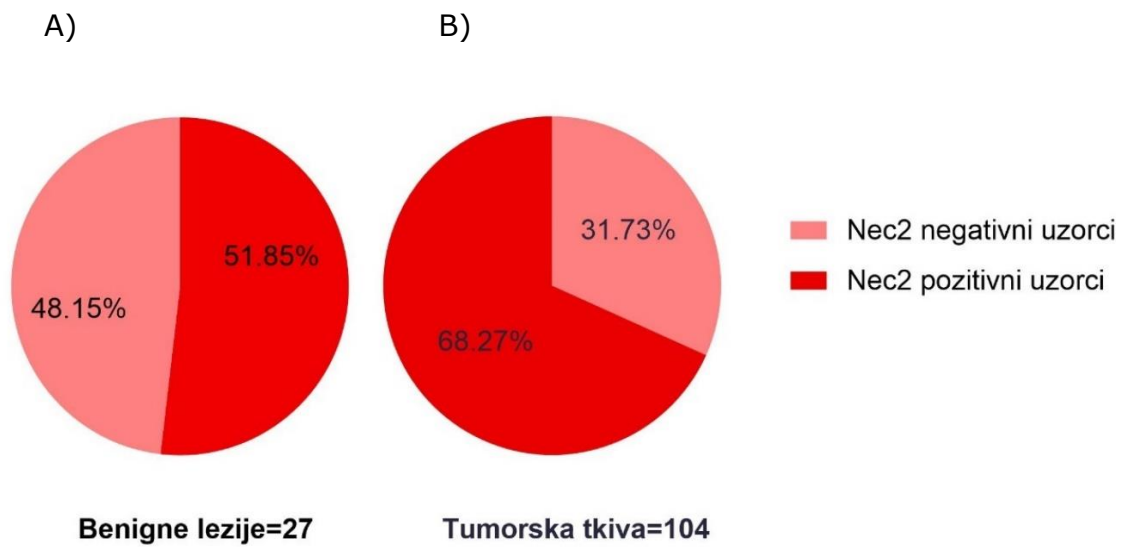


F)



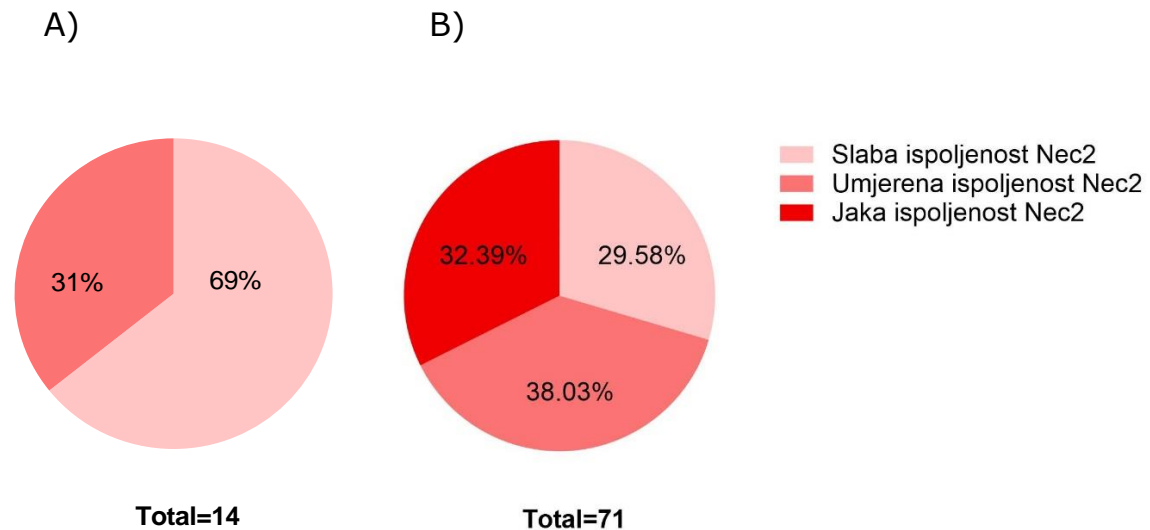
**Slika 1. Reprezentativni prikaza izražaja Nektina-2 u tumorima dojke i benignim lezijama.** (A) Nec2 pozitivna benigna lezija, (B) Nec2 negativna benigna lezija, (C) Invazivni duktalni tumor visokog izražaja Nec2, (D) Invazivni duktalni tumor umjerenog izražaja Nec2, (E) Invazivni duktalni tumor niskog izražaja Nec2, (F) Nec2 negativan invazivni duktalni tumor. Izvorno povećanje  $\times 400$ , skala 100  $\mu\text{m}$

Najprije smo odredili incidenciju Nec2 imunoreaktivnosti u uzorcima benignih lezija i tumorskih tkiva. Utvrđeno je da je 51.9% uzoraka u kohorti benignih lezija Nec2 pozitivno (Slika 2A), dok je 68.3% uzoraka u kohorti tumorskih lezija bilo Nec2 pozitivno (Slika 2B). Statističkom analizom nije utvrđena statistički značajna razlika u incidenciji Nec2 imunoreaktivnosti između dviju analiziranih kohorti (Fisherov test,  $p=0.1198$ , ns).



**Slika 2. Incidencija Nec2 imunoreaktivnosti u benignim lezijama i tumorskim tkivima.** (A) benigne lezije, (B) tumorska tkiva.

Međutim, analiza incidencije Nec2 pozitivnih uzoraka s obzirom na intenzitet bojanja pokazala je da su tumorski uzorci podjednako učestali u svim kategorijama (Slika 3B), dok su benigne lezije uglavnom klasificirane kao Nec2 slabo ili umjereno imunoreaktivne, bez uzoraka sa snažnim membranskim bojenjem (Slika 3A). Statističkom analizom utvrđena je značajnost ove razlike (Chi-square test,  $p=0.01$ ).



**Slika 3. Raspodjela Nec2 imunoreaktivnih tkiva po kategorijama određenim s obzirom na intenzitet Nec2 bojenja.** (A) Nec2 pozitivne benigne lezije, (B) Nec2 pozitivna tumorska tkiva.

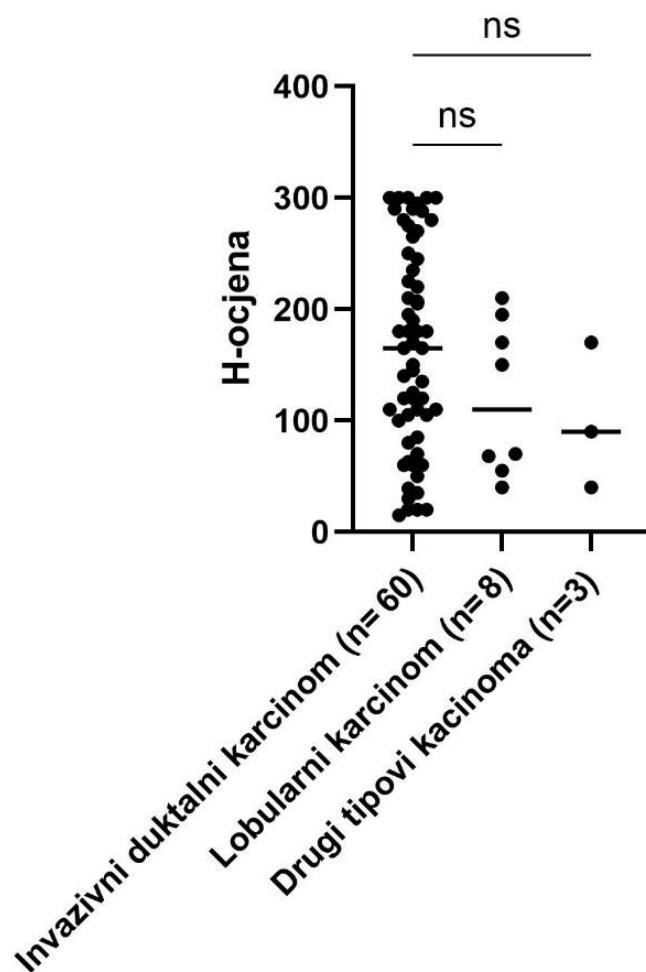
S obzirom na to da je prethodnom analizom uočena povezanost između intenziteta Nec2 imunoreaktivnosti i malignosti, sljedeći cilj bio je ispitati dijagnostički potencijal Nec2 s obzirom na dostupne kliničko-demografske parametre.

Prvo je uspoređena učestalost Nec2 imunoreaktivnosti s obzirom na tip tumora, pri čemu je provedena analiza incidencije Nec2 imunoreaktivnih uzoraka među različitim tipovima karcinoma dojke. Uzorci su klasificirani prema tipu tumora u tri kategorije: invazivni lobularni karcinom, invazivni duktalni karcinom i uzorke koji se ne mogu svrstati u ove kategorije (Tablica 2). Iako je analizom uočen nešto viši postotak Nec2 imunoreaktivnosti u uzorcima invazivnog lobularnog karcinoma (72%) u usporedbi s invazivnim duktalnim karcinomom (66%) (Tablica 3), povezanost između incidencije i tipa karcinoma nije bila statistički značajna (Chi-square test,  $p=0.4489$ , ns).

**Tablica 3.** Incidencija Nec2 pozitivnih i negativnih uzoraka s obzirom na tip karcinoma dojke.

<b>Vrsta karcinoma</b>	<b>Nec2 - uzorci [n(%)]</b>	<b>Nec2 + uzorci [n(%)]</b>
Invazivni duktalni karcinom	30 (33.3%)	60 (66.7%)
Lobularni karcinom	3 (27.3%)	8 (72.7%)
Drugi tipovi karcinoma	0 (0.0%)	3 (100%)

S druge strane, usporedbom intenziteta bojenja Nec2 među Nec2 pozitivnim uzorcima različitih tipova tumora, primijećeno je da uzorci invazivnog duktalnog karcinoma pokazuju snažniji izražaj Nec2. Međutim, razlike između pojedinih skupina nisu bile statistički značajne (Slika 4).



**Slika 4. H-ocjena imunoreaktivnosti Nec2 u različitim tipovima karcinoma dojke.** Svaka točka označava H-ocjenu za jednu pacijenticu, crnom linijom označen je medijan za svaku podskupinu, ns - razlika nije statistički značajna (Kruskal-Wallis test,  $p= 0.2698$ ).

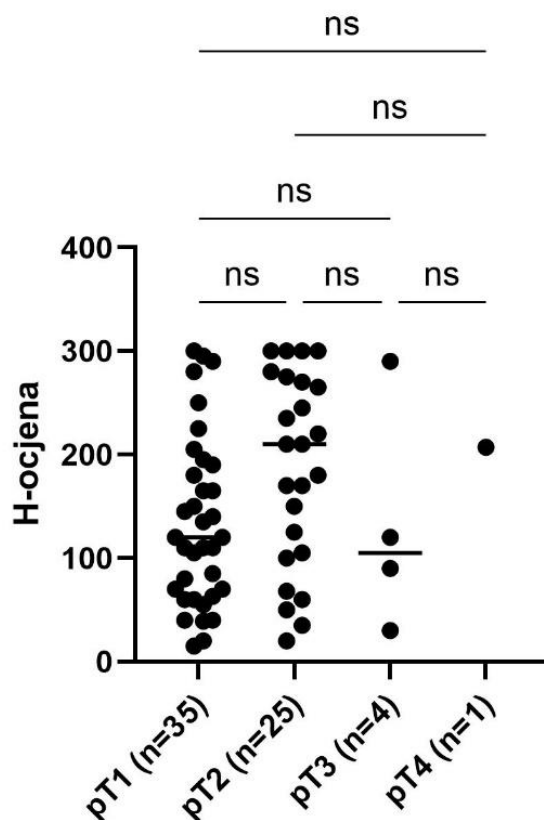
Zatim je ispitana povezanost između izražaja Nec2 i kliničkog stadija primarnog tumora, određenog parametrom pT, koji je dio TNM skale i opisuje veličinu i prodor primarnog tumora. Detalji podjele tumora prema pT parametru opisani su u sekciji Materijali i metode. Važno je napomenuti da je iz analize izuzeto pet uzoraka kojima nije bio određen pT, pTmic uzorak koji označava mikroinvazijski tumor te uzorak tkiva stupnja razvoja pT1cm koji označava višezarišni tumor koji se ne može svrstati u postojeću kohortu. Analizom je primijećeno da najveći broj Nec2 imunoreaktivnih

tumora pripada skupini pT3 (Tablica 4), no povezanost između incidencije i pT stadija nije bila statistički značajna (Chi-square test,  $p=0.8800$ , ns).

**Tablica 4.** Incidencija Nec2 imunoreaktivnosti s obzirom na klinički parametar pT.

<b>Stadij tumora</b>	<b>Nec2 - [n(%)]</b>	<b>Nec2 + [n(%)]</b>
pT1	17 (32.7%)	35 (67.3%)
pT2	13 (34.2%)	25 (65.8%)
pT3	1 (20%)	4 (80%)
pT4	1 (50%)	1 (50%)

Slično tome, nije utvrđena statistički značajna razlika u intenzitetu Nec2 bojenja među Nec2 pozitivnim uzorcima koji pripadaju različitim pT stadija (Slika 5).



**Slika 5. H-ocjena imunoreaktivnosti Nec2 s obzirom na klinički parametar pT.** Svaka točka označava H-ocjenu za jednu pacijenticu, crnom linijom označen je medijan za svaku podskupinu, ns - razlika nije statistički značajna (Kruskal-Wallis test,  $p=0.1578$ )

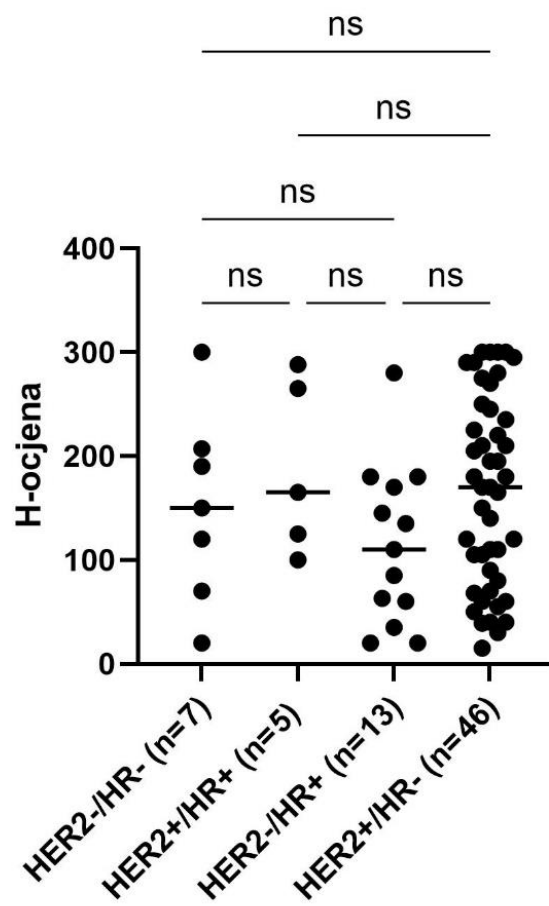
Nadalje, kako bi se ispitala povezanost između izražaja Nec2 te hormonskog i HER2 statusa pacijentica (HER2/HR status), provedena je usporedba incidencije Nec2 i H-ocjene s obzirom na HER2/HR status. Hormonski status odnosi se na prisutnost hormonskih receptora za estrogen i progesteron u stanicama raka dojke i često se povezuje s kliničkim ishodom bolesti. Uzorci su podijeljeni u četiri skupine: HER2- HR- (trostruko negativni), HER2+ HR-, HER2+ HR+, i HER2- HR+. Kao što je prikazano u Tablici 5, uočena je povećana incidencija Nec2 pozitivnih uzoraka kod pacijentica s HER2+ HR+ statusom u odnosu na ostale skupine, iako razlika nije bila statistički značajna (Chi-square test,  $p = 0.8606$ , ns).

**Tablica 5.** Incidencija Nec2 pozitivnih tkiva po HR/HER2 statusu pacijentica.

<b>HR/HER2 status</b>	<b>Nec2 – [n(%)]</b>	<b>Nec2+ [n(%)]</b>
<b>HR-/HER2-</b>	3 (30%)	7 (70%)
<b>HR-/HER2+</b>	7 (35%)	13 (65%)
<b>HR+/HER2-</b>	22 (32.4%)	46 (67.6%)
<b>HR+/HER2+</b>	1 (16.6%)	5 (83.4%)

Slično tome, usporedbom razine izražaja Nec2 kod Nec2 pozitivnih uzoraka, nije primijećen veći izražaj u nijednoj od HER2/HR kategorija tumora (Slika 6).



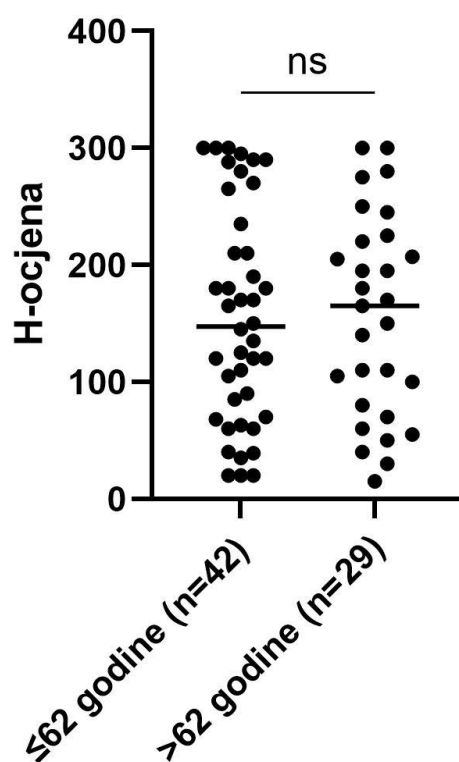


**Slika 6. H-ocjena imunoreaktivnosti Nec2 s obzirom na HER2/HR status pacijentice.** Svaka točka označava H-ocjenu za jednu pacijenticu, crnom linijom označen je medijan za svaku podskupinu, ns - razlika nije statistički značajna. (Kruskal-Wallis test,  $p=0,2729$ ).

Na kraju, provedena je analiza izražaja Nec2 u odnosu na dob pacijentica. Kohorta je podijeljena na pacijentice do 62 godine i iznad 62 godine po uzoru na dosadašnje studije podatak da je prosječna dob dijagnoze 62 godine (1). Analiza incidencije Nec2 imunoreaktivnosti nije pokazala povezanost s dobi pacijentica (Tablica 6, Fisherov test,  $p>0.9999$ , ns), kao ni razlike u razini izražaja Nec2 među Nec2 pozitivnim uzorcima u odnosu na dob (Slika 7).

**Tablica 6.** Incidencija Nec2 imunoreaktivnosti s obzirom na dob pacijentice.

Dob	Nec2 - uzorci [n(%)]	Nec2 + uzorci [n(%)]
≤62 godine	20 (32.3%)	42 (67.7%)
>62 godine	13 (30.9%)	29 (69.1%)



**Slika 7. H-ocjena imunoreaktivnosti Nec2 s obzirom na dob pacijentice.**

Svaka točka označava H-ocjenu za jednu pacijenticu, crnom linijom označen je medijan za svaku podskupinu, ns - razlika nije statistički značajna (Mann-Whitney test,  $p=0.9884$ )

## 5. Rasprava

Noviji pristupi u liječenju karcinoma dojke, glavnog uzroka smrti od karcinoma među ženama, temelje se na ciljanoj imunoterapiji usmjerenoj na regulaciji imunološkog odgovora protiv stanica tumora. Primjeri te vrste imunoterapije poput inhibicije kontrolnih točaka CTLA4 i PD-L1 pokazale su uspjehe u liječenju solidnih tumora te se njihova učinkovitost trenutno testira i na karcinomu dojke.

Paralelno s time, istražuju se i nove potencijalne mete: molekule izražene na stanicama karcinoma koje mogu utjecati na imunološki odgovor. Neke od tih molekula su članovi Nektinske obitelji, primjerice Nec2, primarno opisan kao adhezijska molekula s utjecajem na brojne stanične procese poput proliferacije i diferencijacije. No, utjecaj Nec2 na imunološki sustav, putem interakcija s receptorima TIGIT, DNAM i CD112R, čini ga potencijalno važnom molekulom za ciljanu imunoterapiju.

Brojni radovi već su pokazali prognostički i dijagnostički potencijal Nec2 kao biomakera za kolorektalni karcinom i neuroblastomu. U kolorektalnom karcinomu ne samo da je utvrđena povećana razina izražaja Nec2 (35) već je i potvrđena uloga Nec2 u inhibiciji odgovara T-limfocita, te time i razvoju karcinoma što čini Nec2 atraktivnom metom za ciljanu inhibiciju (19). Sukladno tome, utvrđena je i uloga Nec2 u razvoju neuroblastoma (36) te je interakcija Nec2 s imunoreceptorom TIGIT opisana kao važna kontrolna točka u razvoju neuroblastoma (20).

S druge strane, istraživanja Nec2 u karcinomu dojke do sada su obrađena u svega nekoliko radova. Rad Oshime i suradnika (24) bavi se istraživanjem Nec2 kao potencijalne imunoterapijske mete u karcinomima jajnika i dojke. Analiza genskog izražaja i imunohistokemijska analiza (IHC) različitih tipova karcinoma dojke, pokazale su povišen izražaj Nec2 u karcinomu u odnosu na zdravo tkivo, iako nije određen intenzitet Nec2 izražaja. U istom istraživanju, utvrđen je i potencijal terapijskog ciljanja Nec2 s obzirom da je korištenje anti-Nektin-2 protutijela rezultiralo antitumorskim učinkom na

staničnu liniju karcinoma dojke u mišjem modelu. Slično tome, istraživanje Martina i suradnika (26), temeljeno je na ispitivanju izražaja članova obitelji Nektina (Nec1-4) u karcinomu dojke korištenjem genetske analize i IHC analize. Rezultati studije utvrdili su povišen genski izražaj Nec2 u karcinomu dojke u odnosu na zdravo tkivo, iako razlika nije bila statistički značajna. Nadalje, iako je u navedenom istraživanju korišten veći broj uzoraka tumora nego u prethodno opisanom istraživanju, iz članka nije jasno na kolikom broju uzoraka je napravljena analiza izražaja Nec2 na razini proteina odnosno metodom IHC. Dodatno je bitno spomenuti da je u istraživanju ispitivanje povezanosti različitih kliničkih parametara sa razinama Nec2 rađeno isključivo na razini genske ekspresije.

Stoga smo ovim istraživanjem željeli nadomjestiti manjak istraživanja o povezanosti kliničkih parametara i membranskog izražaja Nec2 u karcinomu dojke te kvantificirati membranski izražaj Nec2 kako bi proširili postojeće nalaske iz literature.

Prvo, rezultati ove studije pokazali su visoku incidenciju Nec2 pozitivnih uzoraka u kohorti karcinoma dojke (68%) što je slično radu Oshima i suradnici gdje je uočeno 87% pozitivnih uzoraka. Nešto manji postotak mogao bi se pripisati različitoj metodologiji s obzirom da je u ovom istraživanju primijenjena kvantitativna skala temeljena na H-ocjeni prema kojoj se uzorci koji pokazuju membransko bojanje H-ocjene niže od 14 svrstavaju u negativne, dok je u radu Oshima i suradnika jedini kriterij prisutnost membranskog bojanja. Ostali mogući razlozi razlike u rezultatima je manja kohorta korištena u radu Oshima i suradnika, koja je obuhvatila 54 pacijentice.

Nešto novije istraživanje Whelan i suradnika (17) na kohorti od 30 pacijentica utvrdilo je incidenciju Nec2 pozitivnih tumorskih tkiva od 63%, od čega je 46% pokazalo razinu izražaja koja odgovara umjerenoj razini u trenutnoj studiji (H-ocjena između 50 i 100).

Visoka razina učestalosti Nec2 pozitivnih tumorskih uzoraka od 68% svakako ide u korist terapijskom ciljanju Nec2, ali ukazuje i na nužnost probira kod odabira pacijentica koje bi mogle imati korist od terapije.

Suprotno istraživanju Oshime i suradnika te Whelan i suradnika u kojima nije uočeno bojanje zdravih tkiva dojke, u ovom istraživanju primijećena je i incidencija Nec2 pozitivnih tkiva u 50% benignih lezija, što je pak u skladu s istraživanjem Martina i suradnika koji opisuje prisutnost Nec2 bojanja u endotelnim stanicama ne-tumorskog tkiva. Međutim, važna je činjenica da je razina Nec2 imunoreaktivnosti kod benignih lezija značajno niža nego u tumorskim tkivima, odnosno najčešće je kategorizirana kao niska, dok je razina Nec2 u 70% tumorskih tkiva kategorizirana kao umjerena ili jaka. Ova spoznaja također ide u korist terapijskom ciljanju Nec2 u karcinomu dojke, ali ukazuje i na mogućnost probira pacijentica s obzirom na razine Nec2. Međutim, potrebno je provesti istraživanja kako bi se pokazalo je li to relevantno za učinkovitost terapije.

Nadalje, usporedbom intenziteta i incidencije Nec2 imunoreaktivnosti s različitim kliničko-demografskim parametrima, kao što su tip tumora, klinički stadij ili hormonski status, nije uočena statistički značajna razlika ni za jedan od parametara, iako je kod nekih primijećen određen trend. Primjerice, primijećen je povećan izražaj proteina Nec2 u invazivnom duktalnom karcinomu (IDC) u odnosu na lobularni karcinom, no bez statističke značajnosti ( $p > 0.05$ ). IDC, koji čini oko 80% svih slučajeva raka dojke (37), također dominira u ovom istraživanju, dijagnosticiran kod 86% pacijentica u kohorti. Veći izražaj Nec2 kod IDC u skladu je s prethodno spomenutim istraživanjem Martin i sur. (26), gdje je utvrđen povećan izražaj Nec2 mRNA u duktalnom karcinomu u usporedbi s drugim tipovima karcinoma dojke.

U istoj studiji, Martin i suradnici (26), utvrđeno je da izražaj mRNA za Nec2 raste s povećanjem TNM stadija bolesti, s najvećim izražajem u TNM3. U ovom istraživanju nisu prisutni svi podaci za TNM klasifikaciju već samo

parametar pT za određivanje veličine i invazije tumora, te nije uočena razliku u incidenciji ili intenzitetu Nec2 bojanja s obzirom na pT stadij.

Tumori raka dojke bez hormonskih receptora, odnosno HR negativni tumori (HR-), obično imaju lošiji ishod u usporedbi s HR pozitivnim tumorima (HR+) (33). S druge strane, tumori HER2 negativnog statusa (HER2-) obično su povezani s nešto boljim ishodom HER2 pozitivnih (HER2+), osim u kombinaciji s HR- statusom (34). U ovom istraživanju najviša incidencija Nec2 pozitivnih uzoraka primijećena je u pacijentica HR+/HER2+ statusa (83%) te HR-/HER2- statusa (70%), iako bez statističke značajnosti. HR-/HER2- status povezuje se s najgorom prognozom, pa je incidencija Nec2 imunoreaktivnosti u 70% slučajeva obećavajuća za eventualne terapije zasnovane na Nec2. U prethodnim istraživanjima nije utvrđena povezanost između hormonskog i HER2 statusa pacijentica i izražaja Nec2, iako istraživanje Martina i suradnika navodi povećan genski izražaj Nec2 u estrogen receptor pozitivnim (ER+) karcinomima (26).

Dob je jedan od rizika asociranih s nižom stopom preživljavanja zbog kasnog otkrivanja te je čak pola smrtnih slučajeva karcinoma dojke u žena starijih od 70 godina (38). U ovoj studiji, nije uočena razlika između broja Nec2 pozitivnih uzoraka ili izražaja Nec2 s obzirom na dob pacijentica što govori u prilog tome da bi imunoterapija zasnovana na Nec2 terapija mogla biti primjenjiva na pacijentice svih dobnih skupina.

Prikladnost imunoterapijskih meta često se procjenjuje na temelju njihova utjecaja na preživljene odnosno povezanosti ishoda bolesti s razinama izražaja. S obzirom na ulogu Nec2 u proliferaciji i migraciji stanica karcinoma, kao inhibicijski učinak Nec2 na imunološke stanice, očekivano je da će veći izražaj Nec2 biti povezan s lošijim ishodom, što je i potvrđeno kod karcinoma pluća (12), jajnika (39) i glijalnih tumora (28). Nažalost, u ovom istraživanju, podaci o preživljavanju pacijentica nisu bili dostupni te nije bilo moguće odrediti imaju li pacijentice s višim izražajem membranskog Nec2 bolji ili gori ishod. Već spomenuto istraživanje Martina i suradnika (26), pokazalo je da na razini genske ispoljenosti, nema

značajne razlike u preživljavanju između pacijentica s visokom i niskom razinom Nec2.

Brojna istraživanja su pokazala kako Nec2, osim u membranskom obliku, postoji i kao solubilna molekula, te može služiti kao dijagnostički ili prognostički marker (40). Nedavno istraživanje solubilnog Nec2 i Nec2 mRNA u serumima pacijentica s karcinomom dojke pokazalo je povišene razine Nec2 mRNA u tumorima stadija 3 u usporedbi s tumorima stadija 1 i 2. (25) Ovi rezultati sugeriraju potencijalnu primjenu Nec2 mRNA kao dijagnostičkog markera, iako su potrebna daljnja istraživanja kako bi se potvrdila važnost i povezanost tih parametara s Nec2 prisutnim na tumorskim stanicama.

Zaključno, ovom studijom, koja je obuhvatila kohortu od 131 pacijentice, ispitana je i kvantificirana razina membranskog Nec2 te potom analizirana njegova povezanost s odabranim kliničkim parametrima. Ovo je prva studija s ovako velikim uzorkom koja istražuje ekspresiju Nec2 na razini proteina u karcinomu dojke. Iako studija donosi važne rezultate, prvenstveno ukazujući da Nec2 predstavlja potencijalnu metu antitumorskih imunoterapija zbog visoke incidencije i izražaja, ima i nekoliko ograničenja. Prvo, analiza je temeljena na retrospektivnom pristupu, zbog čega uzorci nisu ravnomjerno raspoređeni po kategorijama, što je rezultiralo da u nekim kategorijama ima mali broj uzoraka, što može smanjiti vjerodostojnost rezultata. Drugo, određene važne informacije o kohorti nisu bile dostupne za sve pacijentice. Naposljetku, iako rezultati sugeriraju visoku ekspresiju Nec2 u većini karcinoma dojke, neovisno o tipu, kliničkom stadiju ili hormonalnom statusu, potrebne su daljnje studije kako bi se utvrdilo mogu li različite razine Nec2 rezultirati različitim odgovorom na terapiju usmjerenu na Nec2 te koliko je Nec2 zaista obećavajuća meta za protutumorske pristupe.

## **6. Zaključak**

- Izražaj Nec2 u tkivima karcinoma dojke znatno je veći nego u zdravom tkivu
- Nije uočena značajna razlika u izražaju Nec2 po analiziranim kliničko-patološkim podacima o pacijenticama

Rezultati pokazuju prekomjerni izražaj Nec2 u stanicama karcinoma dojke. Značajno povećana razina izražaja Nec2 u uzorcima karcinoma u usporedbi s benignim lezijama dojke upućuje na vezu izražaja Nec2 i malignosti. Ipak, nije uočena ovisnost izražaja Nec2 o tipu karcinoma, stupnju razvoja, hormonskom statusu niti ostalim analiziranim kliničko-patološkim podacima pacijentica. Usprkos tome, potrebna su daljnja istraživanja o izražaju Nec2 u različitim vrstama karcinoma dojke kako bi detaljnije utvrdili obećavajuću prognostičku, dijagnostičku i potencijalnu terapijsku ulogu Nec2.



## Literatura

1. Breast Cancer Facts and Statistics 2024 [Internet]. [cited 2024 Aug 1]. Available from: <https://www.breastcancer.org/facts-statistics>
2. Vlada Republike Hrvatske - Beroš: U Hrvatskoj smrtnost od raka dojke u padu za 25 posto [Internet]. [cited 2024 Aug 9]. Available from: <https://vlada.gov.hr/vijesti/beros-u-hrvatskoj-smrtnost-od-raka-dojke-u-padu-za-25-posto/35132?lang=hr>
3. Musani V, Ozretić P, Levanat S. Molekularna biologija karcinoma dojke [Internet]. 2018 [cited 2024 Aug 9]. Available from: <https://www.croris.hr/crosbi/publikacija/prilog-knjiga/64055>
4. Invasive breast cancer of no special type (NST) [Internet]. [cited 2024 Aug 9]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantductalNOS.html>
5. Pathology Outlines - Lobular carcinoma in situ (LCIS) classic [Internet]. [cited 2024 Aug 9]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantlcis.html>
6. Pathology Outlines - DCIS [Internet]. [cited 2024 Aug 9]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantDCIS.html>
7. Pathology Outlines - Microinvasive [Internet]. [cited 2024 Aug 9]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantmicroinvasion.html>
8. Breast Cancer Treatment - NCI [Internet]. 2024 [cited 2024 Aug 9]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq>
9. Surgery for Breast Cancer | Breast Cancer Treatment | American Cancer Society [Internet]. [cited 2024 Aug 13]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/surgery-for-breast-cancer.html>
10. Kučan N. Poteškoće i komplikacije kod liječenja kemoterapijom [Internet] [info:eu-repo/semantics/bachelorThesis]. University North. University centre Varaždin. Department of Nursing; 2020 [cited 2024 Aug 13]. Available from: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:122:236247>
11. Role of Radiotherapy in Early Breast Cancer: An Overview - PMC [Internet]. [cited 2024 Aug 13]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3068638/>

12. Hormone Therapy for Breast Cancer Fact Sheet - NCI [Internet]. [cited 2024 Aug 13]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/breast/breast-hormone-therapy-fact-sheet>
13. Hormone therapy and osteoporosis in breast cancer survivors: assessment of risk and adherence to screening recommendations - PubMed [Internet]. [cited 2024 Aug 13]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30413856/>
14. Optimal treatment of early stage HER2-positive breast cancer - PubMed [Internet]. [cited 2024 Aug 13]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30291791/>
15. Immune Checkpoint Inhibitors and Their Side Effects [Internet]. [cited 2024 Aug 9]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/managing-cancer/treatment-types/immunotherapy/immune-checkpoint-inhibitors.html>
16. Nectin family of cell-adhesion molecules: structural and molecular aspects of function and specificity - PMC [Internet]. [cited 2024 Aug 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11113404/>
17. Whelan S, Ophir E, Kotturi MF, Levy O, Ganguly S, Leung L, et al. PVRIG and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8+ T-cell Function. *Cancer Immunol Res.* 2019 Feb;7(2):257–68.
18. Stamm H, Klingler F, Grossjohann EM, Muschhammer J, Vettorazzi E, Heuser M, et al. Immune checkpoints PVR and PVRL2 are prognostic markers in AML and their blockade represents a new therapeutic option. *Oncogene.* 2018;37(39):5269–80.
19. Agorku DJ, Bosio A, Alves F, Ströbel P, Hardt O. Colorectal cancer-associated fibroblasts inhibit effector T cells via NECTIN2 signaling. *Cancer Lett.* 2024 Jul 28;595:216985.
20. Wienke J, Visser LL, Kholosy WM, Keller KM, Barisa M, Poon E, et al. Integrative analysis of neuroblastoma by single-cell RNA sequencing identifies the NECTIN2-TIGIT axis as a target for immunotherapy. *Cancer Cell.* 2024 Feb 12;42(2):283-300.e8.
21. Zeng T, Cao Y, Jin T, Tian Y, Dai C, Xu F. The CD112R/CD112 axis: a breakthrough in cancer immunotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2021 Sep 10;40(1):285.
22. Delving into the Latest Updates on COM-701 with Synapse [Internet]. [cited 2024 Aug 12]. Available from: <https://synapse.patsnap.com/drug/8e9d1cf172554a7d86dc656945de78a2>

23. Sim YH, Um YJ, Park JY, Seo MD, Park SG. A Novel Antibody-Drug Conjugate Targeting Nectin-2 Suppresses Ovarian Cancer Progression in Mouse Xenograft Models. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 15;23(20):12358.
24. Oshima T, Sato S, Kato J, Ito Y, Watanabe T, Tsuji I, et al. Nectin-2 is a potential target for antibody therapy of breast and ovarian cancers. *Mol Cancer.* 2013 Jun 12;12:60.
25. Ak N. Nectin-2 and Nectin-4 Adhesion Molecules in Patients with Breast Cancer. *TJ Oncol [Internet].* 2021 [cited 2024 Aug 1]; Available from: [http://onkder.org/pdf/pdf\\_TOD\\_1202.pdf](http://onkder.org/pdf/pdf_TOD_1202.pdf)
26. Martin TA, Lane J, Harrison GM, Jiang WG. The Expression of the Nectin Complex in Human Breast Cancer and the Role of Nectin-3 in the Control of Tight Junctions during Metastasis. *PLOS ONE.* 2013 Dec 26;8(12):e82696.
27. HeMED - 70. Rak dojke [Internet]. [cited 2024 Aug 3]. Available from: <https://hemed.hr/Default.aspx?sid=15590>
28. Dekanić A, Babarović E, Kučan Brlić P, Knežić M, Savić Vuković A, Mazor M, et al. The prognostic significance of Nectin-2 and Nectin-4 expression in glial tumors. *Pathology - Research and Practice.* 2023 Apr 1;244:154416.
29. Hadžisejdić I. Uloga ekspresije proteina i amplifikacije gena HER-2, EGFR i ciklina D1 u invazivnom duktalnom raku dojke [Internet] [info:eu-repo/semantics/doctoralThesis]. University of Rijeka. Faculty of Medicine; 2009 [cited 2024 Aug 3]. Available from: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:188:739833>
30. Igarashi T, Teramoto K, Ishida M, Hanaoka J, Daigo Y. Scoring of PD-L1 expression intensity on pulmonary adenocarcinomas and the correlations with clinicopathological factors. *ESMO Open [Internet].* 2016 Jan 1 [cited 2024 Aug 3];1(4). Available from: [https://www.esmooopen.com/article/S2059-7029\(20\)32547-3/fulltext](https://www.esmooopen.com/article/S2059-7029(20)32547-3/fulltext)
31. IJMS | Free Full-Text | Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological Factors and Diagnostic Markers [Internet]. [cited 2024 Aug 3]. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/4/824>
32. Hoffman-Censits JH, Lombardo KA, Parimi V, Kamanda S, Choi W, Hahn NM, et al. Expression of Nectin-4 in Bladder Urothelial Carcinoma, in Morphologic Variants, and Nonurothelial Histotypes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2021 Sep 1;29(8):619–25.
33. Lobbezoo DJA, van Kampen RJW, Voogd AC, Dercksen MW, van den Berkmortel F, Smilde TJ, et al. Prognosis of metastatic breast cancer

subtypes: the hormone receptor/HER2-positive subtype is associated with the most favorable outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Oct;141(3):507–14.

34. Breast Cancer HER2 Status | What is HER2 Status? | American Cancer Society [Internet]. [cited 2024 Aug 9]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-her2-status.html>
35. Ballester M, Gonin J, Rodenas A, Bernaudin JF, Rouzier R, Coutant C, et al. Eutopic endometrium and peritoneal, ovarian and colorectal endometriotic tissues express a different profile of nectin-1, -3, -4 and nectin-like molecule 2. *Hum Reprod.* 2012 Nov;27(11):3179–86.
36. Zhang S, Jiang C, Su Y, Gui J, Yue Z, Jian B, et al. Nectin2 influences cell apoptosis by regulating ANXA2 expression in neuroblastoma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2023 Mar 14;55(3):356–66.
37. BeatCancer [Internet]. [cited 2024 Aug 1]. Invazivni duktalni karcinom (IDC). Available from: <https://beatcancer.eu/hr/invazivni-duktalni-karcinom-idc/>
38. The Overlooked Incidence and Mortality of Breast Cancer in Older Adults | The BMJ [Internet]. [cited 2024 Aug 1]. Available from: <https://www.bmj.com/content/384/bmj-2023-076962/rr>
39. Bekes I, Löb S, Holzheu I, Janni W, Baumann L, Wöckel A, et al. Nectin-2 in ovarian cancer: How is it expressed and what might be its functional role? *Cancer Sci.* 2019 Jun;110(6):1872–82.
40. Karabulut M, Gunaldi M, Alis H, Afsar CU, Karabulut S, Serilmez M, et al. Serum nectin-2 levels are diagnostic and prognostic in patients with colorectal carcinoma. *Clin Transl Oncol.* 2016 Feb;18(2):160–71.

