

# POVEZANOST FOTOTIPA KOŽE I IZLOŽENOSTI UV ZRAČENJU S IZRAŽENOSTI HER RECEPTORA, Ki67 I p53 U BOLESNIKA S PLANOCELULARNIM KARCINOMOM KOŽE

DANIELA LEDIĆ DRVAR, JASNA LIPOZENČIĆ<sup>1</sup>, ZRINKA BUKVIĆ MOKOS, IVANA ILIĆ<sup>2</sup>  
i FABIJAN KNEŽEVIĆ<sup>3</sup>

*Klinički bolnički centar Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Klinika za dermatovenerologiju, <sup>1</sup>Akademija medicinskih znanost Hrvatske, <sup>2</sup>Klinički bolnički centar Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za patologiju i citologiju i <sup>3</sup>Klinička bolnica Sveti Duh, Zavod za patologiju i citologiju, Zagreb, Hrvatska*

Zadnjih nekoliko desetljeća zamijećena je povećana učestalost tumora općenito, osobito tumora kože. Planocelularni karcinom kože je maligni tumor koji nastaje iz epidermalnih keratinocita. Zajedno s bazocelularnim karcinomom predstavlja nemelanomske tumore kože koji su najčešći maligni tumori u ljudi. Smatra se da je danas rizik za nastanak ovog karcinoma tijekom života u bijelaca oko 15 %, što je gotovo dvostruko više nego prije 20 godina. Najvjerojatnije su tome razlog povećana ekspozicija UV zračenju (izlaganje umjetnim izvorima UV svjetla u „salonima za sunčanje“, provođenje više vremena na otvorenom, promjene u načinu odijevanja, te ozonske „rupe“) kao i duže trajanje života. Cilj rada bio je utvrditi postoji li povezanost izraženosti HER receptora, Ki67 i p53 u bolesnika s planocelularnim karcinomom kože s fototipom kože, te anamnestičkim podatcima o pojačanoj izloženosti UV zračenju i broju sunčevih opekline u djetinjstvu. Ispitivana skupina uključivala je 101 bolesnika s planocelularnim karcinomom.

U istraživanje su uključeni bolesnici stariji od 50 godina, oba spola, s patohistološkom dijagnozom planocelularnog karcinoma, bez prethodne terapije, čiji su uzorci bili dostatni za imunohistokemijske analize, te oni koji su imali potpune kliničke podatke dobivene upitnikom. U našem su istraživanju pronađeni značajno veći medijani ekspresije EGFR-a, Ki67 i p53 u ispitanika svjetlije fototipa kože, koji su tijekom života bili izloženi pojačanom UV zračenju, ili su zadobili 3 ili više opekline u djetinjstvu, što govori u prilog tome da bi UV zračenje moglo dovesti do indukcije EGFR i Ki67, a time i nastanka planocelularnog karcinoma kože.

**Ključne riječi:** fototip kože, izloženost UV zračenju, HER receptori, protein p53, faktor proliferacije Ki67, planocelularni karcinom kože

**Adresa za dopisivanje:** Dr. sc. Daniela Ledić Drvar, dr. med.  
Klinika za dermatovenerologiju  
Kliničkog bolničkog centra Zagreb i  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
Šalata 4  
10 000 Zagreb, Hrvatska  
E-pošta: dledic@kbc-zagreb.hr

## UVOD

Zadnjih nekoliko desetljeća zamijećena je povećana učestalost tumora općenito, osobito tumora kože. Danas su kožni tumori značajan javnozdravstveni problem u Hrvatskoj i svijetu. Znatni se naponi ulažu u proučavanje biologije tumora kako bi se spoznalo više o nastanku, a time i mogućnostima liječenja tumora. Rezultat novih spoznaja u molekularnoj biologiji nastanka tumora je i pronalazak ciljanih lijekova. Do-

uglas Hanah i Robert A. Weinberg (2011.) saželi su obilježja koja su zajednička svim tipovima zloćudnih tumora: samodostatnost s obzirom na signale rasta, neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast, zaobilazne programirane stanične smrti (apoptoze), neograničen potencijal umnažanja, tumorska angiogeneza, sposobnost tkivne invazije i presađivanja, poremećen metabolizam, sposobnost izbjegavanja imunskog odgovora, genomska nestabilnost i upala (1).

U nastanku tumora važnu ulogu imaju onkogeni i tumorsupresorski geni. Onkogeni su geni koji imaju središnju ulogu u nastanku zloćudnih tumora. Oni su promijenjena inačica normalnih staničnih gena koji se nazivaju proto-onkogeni i sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije. Aktivacija onkogeni nastaje na nekoliko načina. Može nastati kao posljedica genske amplifikacije odnosno povećanja broja gena, kao u slučaju onkogeni ERBB2 (HER2), ili kao posljedica kromosomske translokacije (2). Tumorsupresorski geni su geni čija mutacija, inaktivacija ili gubitak obično ima recesivni učinak, nužna je inaktivacija obaju alela da bi se očitovao njihov učinak. Važan tumorsupresorski gen je p53. Aktivirani p53 ima dva osnovna načina djelovanja: zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivira popravak oštećenja DNA te potiče apoptozu. Inaktivacija p53 u stanicama zloćudnih tumora povezana je i s tumorskom angiogenezom te rezistencijom na kemoterapiju i radioterapiju (2).

#### Planocelularni karcinom kože

Planocelularni karcinom kože (SCC - *squamous cell carcinoma*) je maligni tumor koji nastaje iz epidermalnih keratinocita. Zajedno s bazocelularnim karcinomom (BCC- *basal cell carcinoma*) predstavlja nemelanomske tumore kože (NMSC - *nonmelanoma skin cancer*) koji su najčešći maligni tumori u ljudi (3).

Smatra se da je danas rizik za nastanak ovog karcinoma tijekom života u bijelaca oko 15%, što je gotovo dvostruko više nego prije 20 godina. Razlog tome su najvjerojatnije povećana ekspozicija UV zračenju (izlaganje umjetnim izvorima UV svjetla u „salonima za sunčanje“, provođenje više vremena na otvorenom, promjene u načinu odijevanja, te ozonske „rupe“) kao i duže trajanje života.

U etiopatogenezi važnu ulogu imaju sljedeći čimbenici rizika: genetski čimbenici, svjetli fototip kože, UV zračenje, kronični degenerativni i upalni procesi, kemijski čimbenici, onkogeni virusi, imunosupresija, ionizirajuće zračenje, te životne navike (3). Smatra se da se lokalne i udaljene metastaze pojavljuju u oko 5 % - 12 % slučajeva. Postotak metastaziranja je i viši u visoko rizičnih planocelularnih karcinoma (4-7).

Imunosuprimirani bolesnici, osobito oni nakon transplantacije solidnih organa, prvenstveno srca, potom bubrega, a manje jetre, imaju znatno veći rizik za nastanak planocelularnog karcinoma kože (8).

Budući da s razvojem i napretkom medicine u populaciji raste broj bolesnika koji se liječe imunosupresi-

vima, moramo biti svjesni rizika takve terapije. Kako se radi o tumorima koji su često multipli te rezistentni na terapiju, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se omogućila ciljana terapija.

#### Obitelj HER receptora

Obitelj HER receptora (*Human epidermal growth factor receptor*) nadzire brojne signalne puteve (9).

Neodgovarajuća aktivacija HER signalnog puta povezana je s nastankom brojnih vrsta tumora: karcinoma dojke, karcinoma pluća ne-malih stanica, karcinoma jajnika, karcinoma pankreasa, karcinoma prostate, karcinoma glave i vrata te glioblastoma (10-15).

HER signalni put uključuje: vezanje liganda, dimerizaciju receptora, aktivaciju tirozin-kinaza domene, te nizvodne signalne molekule (9,16). Budući da je HER signalni put uključen u nastanak karcinoma, predstavlja i cilj za terapijske učinke. Nekoliko je strategija za djelovanje na HER signalni put i uključuje djelovanje na: ligande, domenu ekstracelularnog receptora (aktivacija i dimerizacija), intracelularnu domenu receptora (tirozin kinaza), nizvodne signalne molekule (9,17,18).

#### P53

Inaktivacija p53 dovodi do destabilizacije genoma u cijelosti. Inaktivira se "točkastom" mutacijom. Mutacije gena za p53 prisutne su u više od 50 % svih bazocelularnih i planocelularnih karcinoma kože. Mutirani gen p53 nije funkcionalan, te je izgubljena njegova zaštitna funkcija uvođenja oštećene stanice u apoptozu što pridonosi preživljavanju abnormalnih stanica. Imunohistokemijska analiza izraženosti p53 smatra se korisnim pokazateljem njegovih mutacija.

Za planocelularni karcinom utvrđena je mutacija p53 u >90 % slučajeva (19-22).

#### Ki67

Proliferacijski indeks Ki67 mjeri količinu jezgrinog antigena Ki67 koji je smješten na dugom kraku kromosoma 10. Izraženost toga gena u razmjeru je s drugim biljezima proliferacije kao što su udio stanica u S-fazi. Visoki Ki67 indeks znak je loše prognoze, a povezan je s mogućim dobrim odgovorom na kemoterapiju (23).

Novija istraživanja otkrivaju membransku i citoplazmatsku aktivnost Ki67 (24).

## CILJ RADA

Cilj rada bio je utvrditi postoji li povezanost izraženosti HER receptora s fototipom kože, te anamnestičkim podatcima o pojačanoj izloženosti UV zračenju i broju sunčevih opeklinama u djetinjstvu u bolesnika s planocelularnim karcinomom kože.

## BOLESNICI I METODE

Ispitivana skupina uključivala je 101 bolesnika s planocelularnim karcinomom. Svi su ispitanici ispunili upitnik, koji je sadržavao osnovne epidemiološke, kliničke, podatke o fototipu kože određene prema Fitzpatricku (tablica 1), te podatke o izloženosti UV zračenju i sunčevim opeklinama tijekom života. Pojačana izloženost UV zračenju definirana je kao izloženost UV zračenju (boravak na moru i sl.) u trajanju duljem od 3 tjedna godišnje.

**Tablica 1.**

*Tipovi kože po Fitzpatricku i sur. prema osjetljivosti na ultraljubičaste zrake (3).*

Tip kože po Fitzpatrick-u	Odgovor na izlaganje suncu	Primjer	Osjetljivost
I	Uvijek izgori, ne potamni	Svjetla boja kože, svjetle oči (Kelti)	Vrlo visoka
II	Uvijek izgori, minimalno potamni	Svjetla boja kože, plava kosa, plave oči, (Skandinavci)	Visoka
III	Ponekad izgori, umjereno potamni	Svjetla boja kože, smeđe oči i kosa, neeksponirana koža bijela	Prosječna
IV	Rijetko izgori, lako potamni	Svjetlosmeđa koža, tamnosmeđa kosa, smeđe oči. Neeksponirana koža je preplanule boje. (Mediterranci, Hispanoamerikanci)	Niska
V	Rijetko izgori, dobro potamni	Smeđa boja kože, tamniji (Mediterranci, orijentalni narodi, Indijanci)	Vrlo niska
VI	Nikada ne izgori, izrazito pigmentirani	Afroamerikanci	Minimalna

Bili su zastupljeni fototipovi kože II i III prema Fitzpatricku.

U istraživanje su uključeni bolesnici stariji od 50 godina, oba spola, s patohistološkom dijagnozom planocelularnog karcinoma, bez prethodne terapije, čiji su uzorci bili dostatni za imunohistokemijske analize, te

oni koji su imali potpune kliničke podatke dobivene upitnikom.

Materijal dobiven ekscizijskom biopsijom u cijelosti je patohistološki pregledan, a dodatni rezovi tkiva imunohistokemijski obrađeni.

Svi uzorci fiksirani su u 10 %-tnom formaldehidu, uklopljeni u parafin, rezani u rezove debljine 4 µm i obojeni hemalaun-eozinom. Preparate je analizirao patolog.

*Imunohistokemijska analiza* učinjena je metodom LSAB kao vizualizacijskim sistemom na Dako Tech-Mate automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojanje uz pozitivne i negativne kontrole.

Pozitivnom reakcijom na protutijela EGFR i HER2 smatrala se membranska obojenost stanica. Pozitivnom reakcijom na HER3 smatrala se citoplazmatska obojenost stanica. Kao pozitivna reakcija na p53 smatrana je nuklearna obojenost stanice, dok je kod analize Ki67 pozitivnom reakcijom smatrana nuklearna i/ili citoplazmatska obojenost stanice.

U *statističkoj analizi* su zbog veličine uzorka i osobitosti podataka korištene neparametrijske statističke metode i statistički prikazi. Kao mjera središnje tendencije numeričkih podataka korišten je medijan, a kao mjera varijabilnosti interkvartilni raspon. U prikazu kategorijskih podataka korišteni su apsolutni brojevi i odgovarajući udjeli. U analizi numeričkih podataka korišten je Mann-Whitneyev U test za usporedbu razlika između dviju skupina. Za analizu kategorijskih varijabli korišten je hi-kvadrat test. Analiza je provedena korištenjem statističkog paketa R, sa razinom statističke značajnosti postavljenom na  $P < 0,05$ .

## REZULTATI

U našem su istraživanju bili zastupljeni sljedeći fototipovi kože (prema Fitzpatricku): 54 (53,47 %) bolesnika bilo je fototipa II, dok ih je 47 (46,53 %) bilo fototipa kože III. Većina ispitanika ( $N = 93$ , 92,08 %) je tijekom života bila izložena pojačanom UV zračenju. Tri ili više sunčevih opeklinama u djetinjstvu imalo je 40 (39,60 %) bolesnika.

Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s fototipom kože prikazana je u tablici 2. Analizom rezultata istraživanja uočena je statistički značajna razlika između pojedinih fototipova kože (u postotku) izraženosti EGFR-a (veće vrijednosti u svjetlijem tipu kože) (tablica 2).

**Tablica 2.**

Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s fototipom kože (Mann-Whitneyev U test).

	Fototip	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentile		
							25.	Medijan	75.
EGFR (%)	Tip 2	82	81,71	30,30	10,00	100,00	50,00	100,00	100,00
	Tip 3	51	73,73	32,68	10,00	100,00	40,00	80,00	100,00
EGFR intenzitet	Tip 2	82	2,85	0,36	2,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	Tip 3	51	2,76	0,51	1,00	3,00	3,00	3,00	3,00
HER2	Tip 2	83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Tip 3	51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HER3 (%)	Tip 2	83	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	Tip 3	51	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
HER3 intenzitet	Tip 2	83	2,10	0,53	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
	Tip 3	51	2,06	0,65	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
Ki67	Tip 2	80	33,59	30,11	2,00	100,00	10,00	20,00	60,00
	Tip 3	51	35,69	28,46	5,00	100,00	10,00	30,00	60,00
P53	Tip 2	80	50,50	42,95	0,00	100,00	10,00	50,00	100,00
	Tip 3	51	50,20	41,52	0,00	100,00	10,00	50,00	100,00

	Mann-Whitney U	Z	P
EGFR (%)	1624,0	-2,433	0,015
EGFR intenzitet	1975,0	-0,833	0,405
HER2	2116,5	0,000	1,000
HER3 (%)	2116,5	0,000	1,000
HER3 intenzitet	2061,0	-0,305	0,760
Ki67	1876,5	-0,786	0,432
p53	2009,5	-0,148	0,883

Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s anamnestičkim podacima o pojačanoj izloženosti UV zračenju prikazana je u tablici 3. Pronađeni su statistički značajno veći medijani ekspresije EGFR-a i Ki67 u ispitanika koji su tijekom života bili izloženi pojačanom UV zračenju.

**Tablica 3.**

Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s anamnestičkim podacima o pojačanoj izloženosti UV zračenju (Mann-Whitneyev U test).

UV zračenje tijekom života		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Maks	Percentile		
							25.	Medijan	75.
EGFR (%)	Da	125	80,32	30,37	10,00	100,00	65,00	100,00	100,00
	Ne	8	52,50	36,94	10,00	100,00	15,00	45,00	95,00
EGFR intenzitet	Da	125	2,81	0,43	1,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	Ne	8	3,00	0,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
HER2	Da	126	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Ne	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HER3 (%)	Da	126	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	Ne	8	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
HER3 intenzitet	Da	126	2,10	0,56	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
	Ne	8	1,75	0,71	1,00	3,00	1,00	2,00	2,00
Ki67	Da	123	35,46	29,21	2,00	100,00	10,00	20,00	60,00
	Ne	8	18,13	29,15	5,00	90,00	5,00	10,00	10,00
P53	Da	123	51,87	41,82	0,00	100,00	10,00	50,00	100,00
	Ne	8	27,50	44,88	0,00	100,00	0,00	5,00	77,50

	Mann-Whitney U	Z	P
EGFR (%)	280,5	-2,339	0,019
EGFR intenzitet	412,0	-1,292	0,196
HER2	504,0	0,000	1,000
HER3 (%)	504,0	0,000	1,000
HER3 intenzitet	359,5	-1,627	0,104
Ki67	252,5	-2,344	0,019
p53	294,0	-1,950	0,051

Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s brojem sunčevih opekline u djetinjstvu prikazana je u tablicama 4 i 5, te na sl. 1. Sukladno prikazanim podacima, pronađeni su značajno veći medijani izraženosti EGFR-a u ispitanika koji su tijekom života imali više od 3 opekline uzrokovane sunčevim zračenjem.

Tablica 4.

Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s brojem sunčevih opekliina u djetinjstvu (Mann-Whitney U test)

Broj sunčevih opekliina u djetinjstvu	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Maks	Percentile			
						25.	Medijan	75.	
EGFR (%)	≥3	69	85,22	26,49	10,00	100,00	80,00	100,00	100,00
	<3	64	71,56	34,70	10,00	100,00	30,00	90,00	100,00
EGFR intenzitet	≥3	69	2,81	0,39	2,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	<3	64	2,83	0,46	1,00	3,00	3,00	3,00	3,00
HER2	≥3	70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<3	64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HER3 (%)	≥3	70	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	<3	64	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
HER3 intenzitet	≥3	70	2,13	0,54	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
	<3	64	2,03	0,62	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
Ki67	≥3	67	37,79	31,07	2,00	100,00	10,00	20,00	70,00
	<3	64	30,86	27,31	5,00	100,00	10,00	20,00	50,00
P53	≥3	68	56,69	41,72	0,00	100,00	10,00	60,00	100,00
	<3	63	43,57	42,06	0,00	100,00	5,00	20,00	100,00

	Mann-Whitney U	Z	P
EGFR (%)	1646,0	-2,850	0,004
EGFR intenzitet	2115,5	-0,646	0,518
HER2	2240,0	0,000	1,000
HER3 (%)	2240,0	0,000	1,000
HER3 intenzitet	2065,5	-0,932	0,351
Ki67	1898,0	-1,153	0,249
p53	1757,5	-1,815	0,069

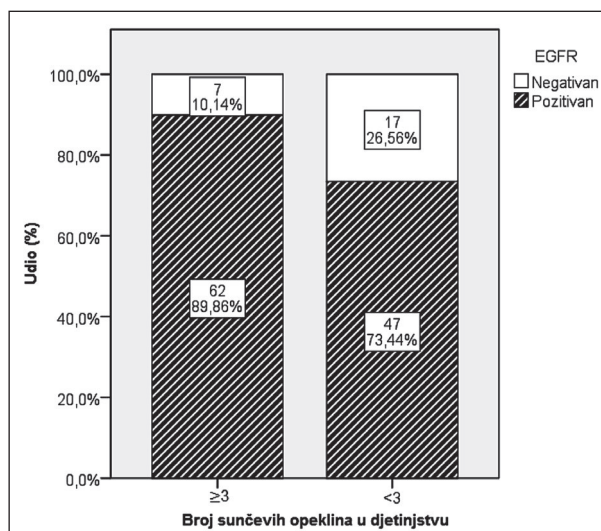
Tablica 5.

Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s brojem sunčevih opekliina u djetinjstvu (hi kvadrat test).

		Broj sunčevih opekliina u djetinjstvu			
		≥3		<3	
		N	%	N	%
EGFR*	Negativan	7	10,1%	17	26,6%
	Pozitivan	62	89,9%	47	73,4%
HER2	Negativan	70	100,0%	64	100,0%
	Pozitivan	0	,0%	0	,0%
HER3	Negativan	0	,0%	0	,0%
	Pozitivan	70	100,0%	64	100,0%
Ki67: skupine	Negativan	36	53,7%	43	67,2%
	Pozitivan	31	46,3%	21	32,8%
p53: skupine	Negativan	26	38,2%	32	50,8%
	Pozitivan	42	61,8%	31	49,2%

\*P&lt;0,05

Sl. 1. Povezanost izraženosti EGFR s brojem sunčevih opekliina u djetinjstvu.



## RASPRAVA

U našem istraživanju bili su zastupljeni sljedeći fototipovi kože (prema Fitzpatricku): 54 (53,47 %) bolesnika bilo je fototipa II, dok ih je 47 (46,53 %) imalo fototip kože III. Većina ispitanika (N= 93, 92,08 %) je tijekom života bila izložena pojačanom UV zračenju. Tri ili više sunčevih opekliina u djetinjstvu je imalo 40 (39,60 %) bolesnika. Naime, i ovdje se radi o općepoznatim činjenicama da je planocelularni karcinom češći u osoba svjetlijeg fototipa koje su tijekom života bile izložene pojačanom UV zračenju i zadobile više od tri sunčeve opekline u djetinjstvu. Većoj incidenciji pridonosi način života (odijevanje, pojačano izla-

ganje UV zračenju, osobito trend odlazaka u salone za sunčanje), kao što je navedeno u uvodu (3,25). Preporučene preventivne mjere: mjere fotoprotekcije, edukacija opće populacije, osobito mlađih dobnih skupina, te naglašavanje štetnosti odlazaka u salone za sunčanje su neophodne za sniženje morbiditeta.

Danas se smatra da je EGFR ključan u nastanku planocelularnog karcinoma kože (26). Aktivacija EGFR u keratinocitima dovodi do stanične proliferacije i povećanja debljine epidermisa i broja stanica, inducira ili blokira diferencijaciju keratinocita ovisno o eksperimentalnim uvjetima, dovodi do migracije normalnih keratinocita, te povećava preživljenje stanica i rezistenciju na apoptozu (5,27,28). Povećana izraženost EGFR u tumorima dovodi do stanične proliferacije, preživljenja tumorskih stanica, invazije, angiogeneze i pojave metastaza. Najvažnije razlike između našeg i do sada objavljenih istraživanja HER-receptora u koži su sljedeće:

- Razlika u veličini uzorka: sva navedena istraživanja imala su značajno manji broj uzoraka u odnosu na naše istraživanje
- U istraživanjima je primijenjena različita metodologija
- Kriteriji očitavanja razlikuju se u istraživanjima koja su koristila istu ili sličnu metodu.

Ki67 se osobito koristi u istraživanjima tkivne proliferacije (29), kao i razlike između proliferativne, preneoplastične i neoplastične kože. Prijelaz u invazivni fenotip obilježen je obrnutim odnosom između diferencijacije i proliferacije stanica, što korelira sa stupnjem histološke diferencijacije (30).

Analizom rezultata istraživanja uočena je značajna razlika između pojedinih tipova kože u postotku izraženosti EGFR-a (veće vrijednosti u svjetlijem tipu kože). Navedeni rezultat upućuje na zaključak da jačina izraženosti EGFR ovisi o fototipu kože.

U studiji na transgeničnim miševima pojačano osjetljivim za nastanak karcinoma kože proučavan je stupanj do kojega UV-inducirana aktivacija EGFR utječe na nastanak tumora u koži. Miševima je prije izlaganja UV zračenju lokalno ili intraperitonejski apliciran inhibitor EGFR, AG1478. Inhibicija EGFR dovela je do smanjenja proliferacije stanica, povećane apoptoze i odgođene hiperplazije epidermisa nakon UV zračenja (31). Galer i sur. istraživali su utjecaj ciljane terapije na rast i preživljenje staničnih linija kožnog planocelularnog karcinoma nakon primjene IGF-IR (*anti-insulin-like-growth factor -I receptor*) protutijela, samog ili u kombinaciji s EGFR antitijelom cetuksimabom, *in vitro* i *in vivo* na mišjem modelu. Liječenje s IGF-IR protutijelom i cetuksimabom inhibiralo je proliferaciju i

induciralo apoptozu u planocelularnom karcinomu. Autori su zaključili da bi dvojno liječenje monoklonalnim protutijelima za EGFR i IGF-IR moglo biti korisno u liječenju kožnog planocelularnog karcinoma (32). Rezultati našeg istraživanja upućuju na zaključak da je kod osoba koje su bile izložene pojačanom UV zračenju došlo do povećane izraženosti EGFR, koja je potom svojim učinkom na keratinocite u obliku proliferacije, blokade diferencijacije, povećanja preživljenja tumorskih stanica i rezistencije na apoptozu pogodovala nastanku karcinoma. Ki67 je kao biljeg proliferacije također bio povećan, što samo potvrđuje našu hipotezu.

Naši podatci dokazuju da su značajno veći medijani ekspresije EGFR-a u ispitanika koji su tijekom života imali više od tri opekline uzrokovane sunčevim zračenjem. Navedeno je sukladno dosadašnjim spoznajama o ulozi UV zračenja na aktivaciju receptora tirozin kinaze (33,34). Međutim, nismo zamijetili povišenu izraženost HER2. Moguće je da je razlog prolazna aktivacija HER2 nakon izloženosti UV zračenju, što je pokazano u istraživanju Madsona i sur. (35). Na temelju toga možemo zaključiti da je aktivacija HER2 zapravo rani i prolazni događaj u procesu nastanka planocelularnog karcinoma. To bi moglo biti i objašnjenje činjenice da su istraživanja provedena neposredno nakon izlaganja UV zračenju dala pozitivne nalaze izraženosti HER2, dok se u našem istraživanju na već nastalom planocelularnom karcinomu ova povezanost nije utvrdila.

## ZAKLJUČCI

U našem istraživanju pronađeni su značajno veći medijani ekspresije EGFR-a i Ki67 u ispitanika koji su tijekom života bili izloženi pojačanom UV zračenju, što ukazuje na to da je UV zračenje dovelo do indukcije EGFR i Ki67, a time i nastanka planocelularnog karcinoma kože.

Najčešći fototipovi bili su: tip II (53,47 %) i tip III (46,53 %). Tri ili više opekline u djetinjstvu imalo je 39,60% ispitanika. Analizom rezultata istraživanja uočena je statistički značajna razlika između pojedinih fototipova kože u izraženosti EGFR-a. Veće vrijednosti uočene su u svjetlijem fototipu kože. Budući je EGFR važan u nastanku planocelularnog karcinoma kože, veća izraženost u bolesnika sa svjetlijim fototipom kože ide u prilog većoj izloženosti te populacije nastanku planocelularnog karcinoma kože. Stoga je potrebno poduzeti daljnje mjere u prevenciji kod osoba svjetlijeg fototipa.

## L I T E R A T U R A

1. Hanah D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.
2. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z, ur. *Klinička onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada Zagreb, 2013, 1-13.
3. Grossman D, Leffell DJ. Squamous Cell Carcinoma. U: Wolff K, Goldsmith LA, Katz, SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, eds. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 7. ed. McGraw-Hill, 2008, Chapter 114: 1028-36.
4. Nuno-Gonzales A, Vicente-Martin FJ, Pinedo-Moraleda F, Lopez-Esterbanz JL. High-Risk Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Actas Dermosifiliogr* 2012; 103: 567-78.
5. Uribe P, Gonzales S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: Molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathol Res Pract* 2011; 207: 337-42.
6. Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG. Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg* 2002; 28: 268-73.
7. Czarnecki, Staples M, Mar A, Giles G, Meehan C. Metastases from squamous cell carcinoma of the skin in southern Australia. *Dermatology* 1994; 1: 52-4.
8. de Koning MN, Weissenborn SJ, Abeni D i sur. Prevalence and associated factors of betapapillomavirus infections in individuals without cutaneous squamous cell carcinoma. *J Gen Virol* 2009; 90: 1611-21.
9. Sliwowski MX. U: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast*, 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, 415-26.
10. Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 11-31.
11. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol* 2000;182: 150-62.
12. Edwards J, Traynor P, Munro AF, Pirret CF, Dunne B, Bartlett JM. The role of HER1-HER4 and EGFRvIII in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 123-30.
13. Ejskjaer K, Sørensen BS, Poulsen SS, Forman A, Nexø E, Mogensen O. Expression of the epidermal growth factor system in endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2007;104: 158-67.
14. Langer R, Von Rahden BH, Nahrig J i sur. Prognostic significance of expression patterns of c-erbB-2, p53, p16INK4A, p27KIP1, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in oesophageal adenocarcinoma: a tissue microarray study. *J Clin Pathol* 2006; 59: 631-4.
15. Baker CH, Pino MS, Fidler IJ. Phosphorylated epidermal growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells in human renal cell carcinoma is a primary target for therapy by tyrosine kinase inhibitors. *Neoplasia* 2006; 8: 470-6.
16. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C i sur. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; 12: 541-52.
17. Baselga J. A new anti-ErbB2 strategy in the treatment of cancer: prevention of ligand-dependent ErbB2 receptor heterodimerization. *Cancer Cell* 2002; 2: 93-5.
18. Sergina NV, Rausch M, Wang D i sur. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 2007; 445: 437-41.
19. Weinberg RA. P53 and Apoptosis: Master Guardian and Executioner. U: *The biology of Cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2007; 307-56.
20. Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat* 2003; 21: 217-28.
21. Moch C, Moysan A, Lubin R i sur. Divergence between the high rate of p53 mutations in skin carcinomas and the low prevalence of anti-p53 antibodies. *Br J Cancer* 2001; 85: 1883-6.
22. Erb P, Ji J, Kump E, Mielgo A, Wernli M. Apoptosis and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008; 624: 283-95.
23. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z, ur. *Klinička onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2013, 43-8.
24. Faratian D, Munro A, Twelves C, Bartlett JMS. Membranous and cytoplasmic staining of Ki67 is associated with HER2 and ER status in invasive breast carcinoma. *Histopathology* 2009; 54: 254-57.
25. Schulman JM, Fisher DE. Indoor ultraviolet tanning and skin cancer: health risks and opportunities. *Curr Opin Oncol* 2009; 21: 144-9.
26. Yamamoto T, Kamata N, Kawano H i sur. High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1986; 46: 414-6.
27. Jost M, Kari C, Rodeck U. The EGF receptor – an essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur J Dermatol* 2000; 10: 505-10.
28. Rodeck U, Jost M, Kari C i sur. EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J Cell Sci* 1997; 110(Pt2): 113-21.
29. Bacchi CE, Gown AM. Detection of cell proliferation in tissue sections. *Braz J Med Biol Res* 1993; 26: 677-87.
30. Caldwell CJ, Hobbs C, McKee PH. The relationship of Ki67 and involucrin expression in proliferative, preneoplastic and neoplastic skin. *Clin Exp Dermatol* 1997; 22: 11-6.
31. El-Abaseri TB, Fuhrman J, Trempus C, Shendrik I, Tennant RW, Hansen LA. Chemoprevention of UV light-induced skin tumorigenesis by inhibition of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 2005; 65: 3958-65.
32. Galer CE, Corey CL, Wang Z i sur. Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor I: reduction of angiogenesis and tumor growth in cutaneous squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2011; 33: 189-98.

33. Madson JG, Hansen LA. Multiple mechanisms of Erbb2 action after ultraviolet irradiation of the skin. *Mol Carcinog* 2007; 46: 624-8.

34. Xu J, Shao Y, Zhou J, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation-induces epidermal growth factor receptor (EGFR)

nuclear translocation in human keratinocytes. *J Cell Biochem* 2009; 107: 873-80.

35. Madson JG, Lynch DT, Tinkum KL, Putta SK, Hansen LA. Erbb2 regulates inflammation and proliferation in the skin after ultraviolet irradiation. *Am J Pathol* 2006; 169: 1402-14.

## SUMMARY

### ASSOCIATION OF SKIN PHOTOTYPE AND UV EXPOSURE WITH EXPRESSION OF HER RECEPTORS, Ki67 AND p53 IN PATIENTS WITH CUTANEOUS SQUAMOUS CELL CARCINOMA

D. LEDIĆ DRVAR, J. LIPOZENČIĆ<sup>1</sup>, Z. BUKVIĆ MOKOS<sup>2</sup>, I. ILIĆ<sup>2</sup> and F. KNEŽEVIĆ<sup>3</sup>

*Zagreb University Hospital Center, Department of Dermatology and Venereology, School of Medicine, University of Zagreb, <sup>1</sup>Croatian Academy of Medical Sciences, <sup>2</sup>Zagreb University Hospital Center and School of Medicine, University of Zagreb, Department of Pathology and Cytology and <sup>3</sup>Sveti Duh University Hospital, Department of Pathology and Cytology, Zagreb, Croatia*

An increase in the incidence of cancer, in particular skin cancer, has been observed in the last few decades. Skin cancer represents a significant public health problem in Croatia and worldwide. Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is a malignant tumor arising in epidermal keratinocytes. Together with basal cell carcinoma it belongs to non-melanoma skin cancers, which are the most common cancers in humans. The lifetime risk of cSCC development in Caucasian population is nowadays estimated to about 15%, which makes it double compared to 20 years ago. The most probable causes are increased ultraviolet light (UV) exposure (exposure to artificial UV sources in suntan parlors, spending more time outdoors, changes in fashion, as well as ozone holes), and longer life expectancy. In its etiopathogenesis, important risk factors include genetic factors, fair-skin phototype, UV exposure, chronic degenerative and inflammatory conditions, chemical factors, oncogenic viruses, immunosuppression, ionizing radiation, as well as habitual risk factors. Human epidermal growth factor receptor (HER) family is involved in the control of multiple signal pathways. Their dysregulation is associated with development of many cancers such as breast carcinoma, non-small cell lung carcinoma, ovarian carcinoma, carcinoma of pancreas, head and neck carcinoma, as well as glioblastoma. The objective of our investigation was to establish if there is association of the skin phototype and UV exposure with the expression of HER receptors, Ki67 and p53 in patients with cSCC. Study group included 101 cSCC patients. Inclusion criteria were age >50, both sexes, histopathologically confirmed cSCC, no previous therapy, specimens sufficient for immunohistochemistry, and complete clinical data collected by a questionnaire. Material obtained by excisional biopsy was completely histopathologically evaluated and additional tissue slices were immunohistochemically analyzed. Statistical analysis of the sample included non-parametrical statistical methods and statistical reviews. Analysis was done using R statistical package. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . The following skin phototypes (according to Fitzpatrick) were present in our study: 54 (53.47%) patients with phototype II and 47 (46.53%) patients with phototype III. The majority of patients ( $n=93$ ; 92.08%) were exposed to increased UV radiation during lifetime. Forty (39.60%) patients had three or more sunburns during childhood. Study results showed a significantly higher expression of EGFR receptors, Ki67 and protein p53 in patients with light skin phototype that had been exposed to increased UV light during lifetime or had acquired 3 or more sunburns in childhood, suggesting that UV exposure led to the induction of EGFR, Ki67 and protein p53, and consequently to development of cSCC.

**Key words:** skin phototype, UV exposure, HER receptors, protein p53, proliferation marker Ki67, cutaneous squamous cell carcinoma