

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Tamara B. Ursulović**

**Povezanost ekspresije PTEN proteina i  
prognoze bolesti kod žena obolelih od ranog  
karcinoma dojke lečenih ovarijalnom ablacijom**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2018**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF MEDICINE**

**Tamara B. Ursulović**

The relationship between PTEN protein  
expression and prognosis in women with early  
breast cancer treated with ovarian ablation

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2018**

**Mentor:** Prof. dr Vesna Plešinc Karapandžić, vanredni profesor Katedre za radiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu,

**Komentor:** N. Sar. dr Snežana Šušnjar, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

**Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:**

1. Prof. dr Svetislav Tatić, redovni profesor Katedre za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Ivan Marković, docent Katedre za hirurgiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. N. Sav. dr Mirjana Branković-Magić, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

*Želim da se zahvalim svima koji su mi pomogli u izradi doktorske disertacije:*

- *Prof. dr Vesni Plešinac Karapandžić, mentoru, na stručnoj podršci u toku izrade ove teze*
- *N Sar dr Snežani Šušnjar, komentoru, na izuzetnoj i nesebičnoj stručnoj podršci i pomoći u svim fazama nastajanja ovog rada*
- *Dušici Gavrilović, masteru matematike, na velikoj stručnoj i prijateljskoj pomoći u tumačenju i formulisanju rezultata ovog istraživanja*
- *Dr Zorki Milovanović i dr Nataši Medić za pomoć u interpretiranju rezultata*
- *mojim roditeljima Branislavu i Gordani Novaković, koji su svojom ljubavlju bili moja podrška*
- *mom bratu Nikoli Novakoviću, doktoru fizičkih nauka, na značajnoj tehničkoj podršci i strpljenju.*

*Ovu tezu posvećujem sinu Ivanu.*

# **Povezanost ekspresije PTEN proteina i prognoze bolesti kod žena obolelih od ranog karcinoma dojke lečenih ovarijalnom ablacijom**

## **SAŽETAK**

**Uvod:** Sve pacijentkinje sa detektabilnom ekspresijom hormonskih receptora (HR) za karcinom dojke (KD) trebalo bi da se leče endokrinom terapijom (ET). Za premenopauzne pacijentkinje, tamoksifen i/ili ovarijalna supresija (OvS) su adekvatna terapija. Promene u fosfataza i tenzin homolog (PTEN) signalnom putu bi mogle da budu jedan od mogućih mehanizama rezistencije na antiestrogenu terapiju. Cilj ovog istraživanja je ispitivanje povezanosti ekspresije PTEN proteina sa prognostičkim faktorima [(histologija i gradus tumora, status receptora za estrogen (ER) i receptora za progesteron (PgR), status receptora za humani epidermalni faktor rasta (HER2)] i sa odgovorom na terapiju kod premenopauznih pacijentkinja sa HR pozitivnim ranim KD lečenih adjuvantnom ovarijalnom ablacijom (OA).

**Pacijenti i metode:** Analizirali smo grupu premenopauznih pacijentkinja sa ranim (stadijum I/II) HR pozitivnim KD koji su lečeni radikalnom mastektomijom a zatim adjuvantnom terapijom u vidu OA. Sadržaji ER i PgR su određeni klasičnom biohemijskom metodom [engl. *Classical biochemical dextrane-coated charcoal (DCC) method*], HER2 status je određen hromogenom *in situ* hibridizacijom (CISH metoda) i PTEN status je određen imunohistohemijskom metodom (IHH).

**Rezultati:** U ovu analizu je uključeno 66 premenopauznih pacijentkinja. Medijana praćenja je 17 godina (opseg 1-29 godina). U poređenju sa PTEN pozitivnim KD, PTEN negativni KD su bili značajno više povezani sa lobularnim histološkim tipovima tumora ( $p < 0.05$ ) i sa višim sadržajem ER ( $p < 0.05$ ). Pacijentkinje sa PTEN negativnim KD su imali značajno kraće preživljavanje bez progresije bolesti (DFS) ( $p < 0.01$ ) i ukupno preživljavanje (OS) ( $p < 0.01$ ) u poređenju sa pacijentkinjama sa PTEN pozitivnim KD.

**Zaključak:** Naši rezultati mogu da znače da PTEN status određen kao ekspresija PTEN proteina može da razdvoji premenopauzne HR pozitivne pacijentkinje sa KD lečene OA, na podgrupe sa dobrom i lošom prognozom bolesti.

**Ključne reči:** rani karcinom dojke, hormonski receptori, PTEN

**Naučna oblast:** medicina

**Uža naučna oblast:** onkologija

## **The relationship between PTEN protein expression and prognosis in women with early breast cancer treated with ovarian ablation**

### **ABSTRACT**

**Purpose:** All breast cancer (BC) patients with detectable hormone receptors (HR) expression should be offered endocrine therapy (ET). For premenopausal patients, tamoxifen and/or ovarian suppression (OvS)/ ablation (OA) may improve disease outcome. Alteration of phosphatase and tensin homolog (PTEN) signaling pathway could be one of possible mechanisms of resistance to antiestrogen therapy. The aim of this study was to investigate the association of PTEN protein expression with prognostic factors [tumor histology and grade, estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR) status, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status] and disease outcome in premenopausal patients with HR-positive early BCs treated with adjuvant OA.

**Methods:** We analyzed a group of premenopausal early (stages I/II) HR-pos BC patients who had undergone radical mastectomy followed with adjuvant OA by irradiation only. ER and PgR contents were determined by classical biochemical dextrane-coated charcoal (DCC) method, HER2 status by chromogen *in situ* hybridization (CISH) analysis and PTEN status by immunohistochemistry (IHC).

**Results:** Sixty-six premenopausal patients included into this analysis were followed for a median of 17 years (range 1-29). Compared to PTEN-pos BCs, PTEN-neg BCs were significantly more frequently associated with lobular tumor histology ( $p < 0.05$ ) and a higher ER content ( $p < 0.05$ ). Patients with PTEN-neg BC had significantly decreased disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) ( $p < 0.01$  for both) compared to patients with PTEN-pos BCs.

**Conclusions:** It seems that PTEN status determined by protein expression may discriminate between subgroups with poor and good prognosis in premenopausal HR-pos BC patients receiving adjuvant OA.

**Keywords:** early breast cancer, hormone receptors, PTEN

**Research area:** medicine

**Special topics:** oncology



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Epidemiologija karcinoma dojke i stadijumi bolesti.....	1
1.1.1 Epidemiologija karcinoma dojke .....	1
1.1.2 Stadijumi bolesti .....	1
1.2 Lečenje ranog karcinoma dojke .....	2
1.2.1 Hirurgija u lečenju ranog karcinoma dojke .....	3
1.2.2 Radioterapija (RT) u lečenju ranog karcinoma dojke .....	4
1.2.3 Biološki podtipovi karcinoma dojke .....	5
1.2.4 Adjuvantna sistemska terapija .....	7
1.2.4.1 Adjuvantna hemioterapija.....	7
1.2.4.2 Adjuvantna hormonska terapija (estrogena deprivacija, estrogena deprivacija+SERM ili IA, SERM) .....	8
1.2.4.2.1 Estrogena deprivacija .....	8
1.2.4.2.2 Estrogena deprivacija+SERM ili IA.....	8
1.2.4.2.3 SERM .....	9
1.2.4.3 Adjuvantna biološka terapija .....	9
1.3 Hormon receptor pozitivni karcinom dojke.....	10
1.3.1 Prognostički faktori (HR, HER2, Ki67) .....	11
1.3.2 Prediktivni faktori (HR, HER2, Ki 67) .....	14
1.4 Značaj ekspresije PTEN u HR- pozitivnom karcinomu dojke .....	14
<b>2.CILJEVI RADA</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>17</b>
3.1 Pacijentkinje i način lečenja .....	17
3.2 Metodologija određivanja ER, PgR, c-erbB-2 gena i PTEN statusa .....	17
3.2.1 Metodologija određivanja ER i PgR .....	17
3.2.2 Metodologija određivanja c-erbB-2 gena .....	18
3.2.3 Metodologija određivanja PTEN proteina.....	19
3.2.4 Definicija ishoda bolesti (karcinoma dojke).....	20

3.2.5 Statistička analiza.....	21
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>22</b>
4.1 Karakteristike pacijentkinja, oboljenja i ishod lečenja.....	22
4.1.1 Opšte karakteristike pacijentkinja.....	22
4.1.2 Kliničke karakteristike tumora .....	23
4.1.3 Patohistološke (PH) karakteristike tumora i hormonski receptori .....	23
4.1.4 PTEN.....	26
4.1.5 Karakteristike postoperativnog lečenja .....	26
4.1.6 Ishod lečenja .....	27
4.1.6.1 Relaps bolesti .....	27
4.1.6.2 Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS).....	29
4.1.6.3 Ukupno preživljavanje (OS) .....	30
4.1.6.4 Preživljavanje specifično za karcinom dojke (BCSS).....	32
4.1.6.5 Zbirni prikaz svih Kaplan-Meier kriva za DFS, OS i BCSS .....	34
4.2 Ispitivanje povezanosti ekspresije PTEN proteina i karakteristika tumora dojke .....	35
4.3 Ispitivanje povezanosti ekspresije PTEN proteina i vremena do pojave događaja kojim su definisani DFS, OS i BCSS.....	37
4.3.1 Ekspresija PTEN proteina i ishodi lečenja .....	37
4.3.2 Povezanost PTEN statusa i DFS .....	38
4.3.3 Povezanost PTEN statusa i OS .....	40
4.3.4 Povezanost PTEN statusa i BCSS .....	42
4.4 Povezanost klasičnih faktora prognoze i ishoda bolesti.....	44
4.4.1 Povezanost klasičnih faktora prognoze sa DFS .....	44
4.4.2 Povezanost klasičnih faktora prognoze sa OS .....	47
4.4.3 Povezanost klasičnih faktora prognoze sa BCSS.....	49
4.5 Univarijanta Cox-ova regresiona analiza za sva ispitivana vremena.....	51
4.5.1 Rezultati Cox-ove regresione analize za DFS .....	52
4.5.2 Rezultati Cox-ove regresione analize za OS .....	53
4.5.3 Rezultati Cox-ove regresione analize za BCSS .....	54

<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>55</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>70</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>71</b>

# 1. UVOD

## 1.1 Epidemiologija karcinoma dojke i stadijumi bolesti

### 1.1.1 Epidemiologija karcinoma dojke

Karcinom dojke je globalni javno-zdravstveni problem, ne samo zbog činjenice da bolest ima epidemijske razmere, već i zato što njene posledice pogađaju praktično sve segmente društva. U velikom broju zemalja čini oko 25% svih malignih bolesti ženske populacije [1], dok u strukturi mortaliteta učestvuje sa oko 14-15% [2]. U Srbiji, 26% svih obolelih i 17,5% svih umrlih žena zbog malignih tumora imaju dijagnozu karcinoma dojke [3]. Oko 25% pacijentkinja sa karcinomom dojke su premenopauzne u momentu postavljanja dijagnoze [4,5]; od toga, 60% ima HR pozitivne tumore[6].

### 1.1.2 Stadijumi bolesti

Stadijum karcinoma dojke se procenjuje prilikom dijagnoze bolesti i pre donošenja prve odluke o lečenju svake bolesnice prema TNM sistemu (T- veličina tumora, N - zahvaćenost regionalnih nodusa, M- prisustvo/odsustvo udaljenih metastaza) [7].

Tabela 1. Stadijumi karcinoma dojke. Anatomski stadijum / prognostičke grupe

Stadijum 0		
T <sub>is</sub>	N0	M0
Stadijum IA		
T1	N0	M0
Stadijum IB		
T0	N1mi	M0
T1	N1mi	M0
Stadijum IIA		
T0	N1	M0
T1	N1	M0

T2	N0	M0
Stadijum IIB		
T2	N1	M0
T3	N0	M0
Stadijum IIIA		
T0	N2	M0
T1	N2	M0
T2	N2	M0
T3	N1	M0
T3	N2	M0
Stadijum IIIB		
T4	N0	M0
T4	N1	M0
T4	N2	M0
Stadijum IIIC		
Bilo koji T	N3	M0
Stadijum IV		
Bilo koji T	Bilo koji N	M1

---

Karcinom dojke dijagnostikovano u kliničkom stadijumu I i II smatra se ranim stadijumom bolesti. Karcinom dojke od stadijuma IIIA do IIIC naziva se lokalno uznapredovali karcinom dojke, a bolest dijagnostikovana u posljednjem, IV stadijumu je metastatska bolest. U skladu sa stadijumom bolesti, planira se i lečenje svake bolesnice.

## 1.2 Lečenje ranog stadijuma karcinoma dojke

Karcinom dojke dijagnostikovano u kliničkom stadijumu I i II može se radikalno hiruški odstraniti [8]. Cilj terapijskog pristupa u ovoj fazi bolesti je izlečenje.

### 1.2.1 Hirurgija u lečenju ranog karcinoma dojke

Kurativna hirurgija raka dojke danas obuhvata poštedne operacije i radikalne mastektomije. Verovatno je najveća promena u hiruškom lečenju ranog karcinoma dojke unazad 30 godina bila pomeranje fokusa sa radikalne na poštednu hirurgiju [9], što je još jednom nedvosmisleno potvrđeno na poslednjoj St. Gallen konferenciji 2017. kao standard hirurgije karcinoma dojke [10].

Poštedna operacija raka dojke je uklanjanje tumora sa zonom okolnog zdravog tkiva kao što su 1. tumorektomija (lampektomija) 2. parcijalna resekcija (segmentektomija) ili 3. kvadrantektomija. Ne postoji konsenzus oko maksimalne veličine tumora kod poštedne operacije karcinoma dojke, najvažniji je odnos između veličine tumora i veličine dojke. Ležište tumora se obeležava titanijumskim klipsevima radi planiranja radioterapije (RT) [11,12]. Prema preporukama [13] slobodne ivice od 2mm oko DCIS smatra se bezbednim jer to značajno smanjuje rizik od izolovanog recidiva u dojci. Slobodne ivice oko invazivnog tumora mogu biti i manje jer meta analiza nije pokazala da veličina slobodne ivice značajno smanjuje rizik od lokalnog recidiva [14,15].

Indikacije za poštednu operaciju karcinoma dojke su: 1. stadijum (St) 0 (TisN0M0) 2. St I (T1N0M0) 3. St IIa (T0-1N1M0) i 4. St Iib(T2N1M0). Kontraindikacije za poštednu operaciju karcinoma dojke su: 1. stadijum Iib ili III 2. nepovoljan odnos tumora i veličine dojke 3. ponavljane pozitivne ivice resekcije kod invazivnog i neinvazivnog karcinoma 4. difuzne mikrokalifikacije malignog izgleda 5. multifokalni tumor 6. prethodna RT grudnog koša 7. kolagene vaskularne bolesti 8. nemogućnost sprovođenja RT 9. loš kozmetski efekat i na kraju, treba se uzeti u obzir i 10. želja bolesnice za mastektomijom.

Operacija regionalnih limfnih čvorova može takođe biti poštedna u slučaju klinički nepalpabilnih aksilarnih limfnih čvorova, kada se radi provera limfnog čvora stražara (engl. *sentinel lymph node biopsy*, SLNB) [16]. U slučaju pozitivnog stražarnog limfnog čvora ili klinički palpabilnih aksilarnih limfnih čvorova, radi se disekcija limfnih čvorova istostrane aksilarne jame (prva dva ili sva tri sprata) [17-22].

Radikalna mastektomija je otklanjanje kompletnog tkiva dojke sa većim delom eliptično ekscidirane kože uz disekciju limfnih čvorova istostrane pazušne jame. Ranije

su se radile veoma opsežne hirurške intervencije sa otklanjanjem i velikog i malog grudnog mišića i limfnih čvorova duž *a. mammariae internae* [23,24] dok se danas rade manje opsežne modifikovane mastektomije [25,26,27].

### **1.2.2 Radioterapija (RT) u lečenju ranog karcinoma dojke**

Radioterapija (RT) kao jedan od tri glavna modaliteta lečenja karcinoma dojke, danas se standardno sprovodi kod skoro svih pacijenata nakon poštedne operacije dojke, kao i kod pacijenata sa povećanim rizikom od relapsa bolesti nakon učinjene radikalne mastektomije [28,10] Ciljni volumeni su preostalo tkivo dojke ili zid grudnog koša i regionalni limfni čvorovi ako su zahvaćeni širenjem tumora [29]. Cilj postoperativne RT je smanjenje učestalosti pojave relapsa u dojci nakon poštedne operacije ili zidu grudnog koša, nakon mastektomije. Optimalni period od operacije do započinjanja postoperativne RT je 8 nedelja. Ukoliko se RT kombinuje sa adjuvantnom HT prvo se sprovodi HT, a potom RT [30,31].

Postoperativna RT nakon poštedne operacije indikovana je kod većine pacijentkinja. Ona se može izostaviti kod pacijentkinja starije životne dobi sa nodus negativnim luminalnim karcinomima manjim od 3 cm, koje adjuvantno lečenje nastavljaju hormonskom terapijom. Iako je zabeležena značajno veća učestalost izolovanog recidiva u dojci, nema razlike u ukupnom preživljavanju između pacijentkinja sa postoperativnom RT i pacijentkinja bez postoperativne RT [32]. Kod postoperativne RT koja se sprovodi nakon poštedne operacije, indikovano je dodavanje *boost* doze na predeo ležišta tumora, što bi moglo biti izostavljeno kod pacijentkinja sa luminalnim tumorima i niskim rizikom od relapsa bolesti starijih od 60 godina, koje će primiti adjuvantnu hormonsku terapiju. [33,34]. Isto tako, pokazano je da, kod pacijentkinja sa niskim rizikom od relapsa bolesti kod kojih je urađena poštedna operacija, akcelerisana parcijalna RT nije inferiorna u odnosu na standardnu RT celog volumena dojke [35].

Postoperativna RT nakon mastektomije preporučuje se kod svih pacijentkinja sa 4 i više pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova i/ili tumorima većim od 5 cm. Kod pacijentkinja sa 1-3 pozitivna aksilarna limfna čvora, primena postoperativne RT treba

individualizovati prema ostalim faktorima rizika (biologija tumora), uzimajući u obzir mogućnost pojave komplikacija kod sprovođenja ove procedure [10].

Hipofraktionisana postoperativna RT može da se razmotriti kod pacijentkinja starijih od 50 godina sa negativnim limfnim čvorovima, jer je pokazano da je bezbedna i efikasna i nakon dužeg vremena praćenja. [36,10].

Kliničke studije su pokazale da postoperativna RT regionalnih limfnih čvorova (aksilarnih, supraklavikularnih, duž *a. mammariae internae*) kod pacijentkinja sa visokim rizikom značajno smanjuje učestalost pojave loko-regionalnog ili udaljenog relapsa bolesti, uz produženje preživljavanja [37,38]. U toku je poređenje efikasnosti i podnošljivosti između samo postoperativne RT regionalnih limfnih čvorova i disekcije aksilarnih limfnih čvorova uz postoperativnu RT regionalnih limfatika kod pacijentkinja sa pozitivnim stražarskim limfnim čvorovima nakon preoperativne hemioterapije (Alliance A11202 studija, NCT01901094).

### 1.2.3 Biološki podtipovi karcinoma dojke

Danas se razlikuju četiri surogat podtipa karcinoma dojke koji su definisani rutinskom histologijom i imunohistohemijom (IHH): *luminal A-like*, *luminal B-like*, trosturko negativni i HER2 pozitivni karcinomi dojke (detalji svakog podtipa su prikazani u Tabeli ) [39].

Tabela 2. Surogat definicije podtipova karcinoma dojke [10][28]

Podtip	Kliničkopatološka surogat definicija	Napomena
Luminal A	''Luminal A-like'' ER pozitivan HER-2negativan Ki67 nizak <sup>1</sup> PgR visok <sup>2</sup>	<sup>10</sup> granične vrednosti koje razdvajaju niski od intermedijernog Ki67 treba da ustanovi svaka laboratorija na osnovu svojih analize; većina eksperata sugeriše da bi vrednost Ki67 do 20% označavala nizak proliferatini index (a Đuzepe Viale na EBCC 2018 kaže da bi ta vrednost trebala da se podigne na 25%)
Luminal B	''Luminal B-like (HER2-negative)'' ER pozitivan HER2 negativan Ki67 visok ili	



	PgR nizak "Luminal B-like (HER2- pozitivan) ER pozitivan HER2-pozitivan Bilo koji Ki67 Bilo koji PgR	
HER2 prekomerna ekspresija	"HER2-pozitivan (non- luminal)" HER2-pozitivan ER i PgR odsutan	
"Basal like"	"Trostruko-negativni (duktalni)" ER i PgR odsutan HER2- negativan	Postoji oko 80% preklapanja između "trostruko negativnog i 'basal- like' podtipa, ali 'trostruko negativan' uključuje neke posebne histološke tipove kao medularni i adenoid cistični karcinom sa niskim rizikom za razvoj udaljenog relapsa

Iz tabele se vidi da kada danas govorimo o hormon receptor pozitivnim karcinomima dojke, govorimo o kategorijama luminal A ili luminal B karcinomima.

Prema aktuelnim preporukama [10,28] svi pacijenti sa detektabilnom ekspresijom ER, koja je definisana kao  $\geq 1\%$  kancerskih ćelija, treba da se leče endokrinom terapijom sa ili bez hemioterapije i terapijom usmerenom na HER2 receptor, u slučaju HER2 pozitivnih tumora. Za premenopauzne pacijentkinje tamoksifen u trajanju od 5 godina je istorijski standard adjuvantne hormonske terapije i još uvek je preporučen za nisko-rizične luminal A-like karcinome dojke (visoka ER/PR ekspresija, gradus 1, nodus negativni status, veličina tumora T1a ili T1b) [10]. Preporuka za pacijente sa intermedijernim/visokim rizikom (intermedijerna/niska ER/PgR ekspresija, gradus tumora 2 i 3, Ki 67 > 15-20%, nodus-positivni status, veličina tumora  $\geq 5$  cm) je ovarijalna supresija (OvS) pridodata tamoksifenu ili inhibitorima aromataze (IA) kod premenopauznih žena. Ova terapija smanjuje rizike od relapsa bolesti, a produžetak primene tamoksifena do 10 godina od učinjene operacije može biti opcija za pacijentkinje sa intermedijernim/visokim rizikom od relapsa bolesti koje ostanu premenopauzne. Optimalno vreme trajanja hormonske terapije je trenutno nepoznato (nivo preporuka je I,C) [10,28,40-43]. Kod postmenopauznih pacijentkinja sa intermedijernim/visokim rizikom od relapsa bolesti indikovana je adjuvantna hormonska terapija primenom IA od početka ili sekvencijalno tamoksifen potom IA, a dolazi u obzir produžena terapija primenom IA ili tamoksifena. Novije studije ukazuju na to da produžena adjuvantna hormonska terapija primenom IA smanjuje rizike uglavnom od nastanka primarnog tumora kontralateralne dojke, dok je uticaj na pojavu

udaljenih metastaza manji. Takođe, veći je učinak kod pacijentkinja inicijalno lečenih primenom tamoksifena [44-46].

#### **1.2.4 Adjuvantna sistemska terapija**

Adjuvantna sistemska terapija ima za cilj da smanji ovaj rizik od relapsa bolesti. Određuje se prema procenjenom riziku za relaps bolesti (o čemu će biti više reči u nastavku uvoda) za svaku bolesnicu posebno.

##### **1.2.4.1 Adjuvantna hemioterapija**

Prema poslednjoj konferenciji u St Gallen-u 2017. [47] date su preporuke koje kategorije bolesnica sa ranim karcinomom dojke treba da primaju adjuvantnu hemioterapiju. Izdvojene se sledeće grupe:

1. Tripl negativni karcinomi dojke: preporuka je da za stadijum T1bN0 i više stadijume većina pacijentkinja sa tripl negativnom bolešću treba da primaju adjuvantnu terapiju u sastavu antraciklini i takasana, a posebno ovo važi za bolesnice u kliničkom stadijumu II i III.
2. HER2 pozitivna bolest: preporuka je da od stadijuma T1bN0 i sve više stadijume pacijentkinje treba da primaju adjuvantnu hemioterapiju i anti HERT2 terapiju u trajanju od godinu dana.
3. ER pozitivna/HER2 negativna bolest: preporuka je da sve pacijentkinje koje imaju i nepovoljne patološke faktore primaju adjuvantnu hemioterapiju. To su nodus pozitivna bolest, gradus 3 tumora, prisustvo limfovaskularne invazije, visok Ki67 i niska ekspresija HR-a.
4. Takođe data je preporuka da se hemioterapija primeni i kod postojanja intermedijernog/visokog skora genomskih testova luminal-B-like i/ili nodus pozitivnog karcinoma. [48,49].
5. Za većinu pacijenata je kao standard lečenja, preporučena upotreba antraciklin- i taksan-bazirane hemioterapije.

## **1.2.4.2 Adjuvantna hormonska terapija (estrogena deprivacija, estrogena deprivacija+SERM ili IA, SERM)**

### **1.2.4.2.1 Estrogena deprivacija**

Estrogena deprivacija u bukvalnom prevodu znači lišavanje organizma žene ženskog polnog hormona estrogena (lat. *Deprivare; lišiti, ukloniti*). Kod premenopauznih žena estrogena deprivacija može biti ovarijalna supresija (OvS) (drugačije se naziva i medikamentozna kastracija) ili ovarijalna ablacija (OA) (ako je postignuta ozračivanjem jajnika postupak se zove i zračna kastracija a ako je ablacija urađena hiruškim putem, ovariektomijom, naziva se i hiruška kastracija). Mora se imati u vidu da je estrogena deprivacija postignuta ovarijalnom supresijom reverzibilan postupak. Estrogena deprivacija nakon ovarijalne ablacije je ireverzibilna [50,51]. Kod postmenopauznih žena estrogena deprivacija se postiže lekovima iz grupe inhibitora aromataze (IA) [52-54].

S obzirom na temu ovog rada, akcentat će se u daljem tekstu staviti na ablaciju jajnika. Ablacija jajnika je najstariji oblik sistemskog endokrinog lečenja karcinoma dojke, koji se sastoji od prekida funkcionisanja jajnika, kao glavnog izvora biosinteze estrogena kod žena u premenopauzu, kako bi se smanjilo stvaranje estrogena.[55-57]. Metoda je stara, jednostavna, relativno jeftina i ne zahteva hospitalizaciju ali je dozno i starosno zavisna. Ima svoje potencijalne neželjene efekte u vidu kasnih sekvela zračenja na maloj karlici. Ovarijalna supresija je uvedena u praksu devedesetih godina prošlog veka i danas je najzastupljeniji način adjuvantne estrogene deprivacije terapije u svetu. [58].

### **1.2.4.2.2 Estrogena deprivacija+SERM ili IA**

Prema konsenzusu sa poslednje konferencije u St Gallen-u 2017 [47] izdvojene su sledeće kategorije bolesnica koje same po sebi predstavljaju indikaciju za dodavanje supresije ovarijalne funkcije oralnoj antihormonskoj terapiji: 1. prisustvo 4 i više metastatski izmenjene limfne žlezde 2. životna dob mlađa od 35 godina i 3. potvrđen premenopauzni nivo estrogena.

Takođe, predložene su preporuke za adjuvantni sistemski treatment ER pozitivnog/HER2 negativnog ranog karcinoma dojke. Sve premenopauzne bolesnice koje imaju visok nivo HR, pT1a, pT1b, pN0, G1 se leče samo endokrinom terapijom, tamoksifenom 5 godina. Premenopauzne bolesnice sa visokim-intermedijernim HR, pT1c,pT2, pN0 ili pN1(1-3), G2 se leče kombinacijom endokrine terapije i adjuvantne hemioterapije. Ako uz to imaju pN0, hemiotrapija se može izostaviti i dati tamoxifen sa ovarijalnom supresijom ili egzemestan sa ovarijalnom supresijom. Međutim ako je bolesnica sa N+ statusom, pored ovarijalne supresije i Exemestana dobija i adjuvantnu hemioterapiju. Treća kategorija premenopauznih bolesnica imaju intermedijerni nizak nivo HR, pT3 i/ili N2-N3 i visok Ki67. Ove bolesnice se leče adjuvantnom hemioterapijom i endokrinom terapijom (ovarijalna supresija sa AI).

#### **1.2.4.2.3 SERM**

Tamoksifen 20 mg/dan je istorijski standard adjuvantne hormonske terapije za premenopauzne žene. Prema aktuelnom konsenzusu iz St Gallen-a 2017 [10], kao monoterapija tamoksifen je još uvek preporuka samo za premenopauzne niskorizične bolesnice (visoki HR, pT1a, pT1b, pN0 i gradus 1) u trajanju 5 godina. Pitanje da li i kome treba produžiti primenu tamoksifena nakon pete godine je i dalje otvoreno. Poznato je da se polovina relapsa bolesti javlja posle pete godine od dijagnoze, a posle desete godine rizik iznosi 25 % [59]. Za bolesnice koje su ostale premenopauzne za vreme prvih pet godina primene tamoksifena, prolongiranje leka na deset godina bi trebalo ograničiti samo na bolesnice sa visokom rizikom u momentu dijagnoze bolesti.

#### **1.2.4.3 Adjuvantna biološka terapija**

Trastuzumab kombinovan sa hemioterapijom kod bolesnica sa HER2 prekomernom ekspresijom približno za polovinu smanjuje rizik od relapsa bolesti, u poređenju sa samom hemioterapijom, što prevedeno u preživljavanje bez progresije bolesti donosi poboljšanje od 10% i 9% poboljšava 10-godišnje ukupno preživljavanje (nivo preporuke je IA) [60-62]. Trastuzumab je odobren za pacijente sa N+ i N0 bolešću sa tumorima veličine veće od 1cm. Zbog relativno velikog rizika za relaps, čak i kod

pacijentkinja sa N0 tumorima manjim od 1cm, treba razmatrati upotrebu Trastuzumaba a posebno ako su i ER negativni [63]. Davanje Trastuzumaba u trajanju od jedne godine danas je standard [64]. Davanje Trastuzumaba u trajanju od dve godine nije dalo korist u HERA studiji [65]. Takođe, PHARE studija je poredila da trajanje lečenja od 6 meseci sa lečenjem od 12 meseci i nije dokazana neinferiornost šestomesečne terapije. Mada je u FinHER studiji sličan rezultat sa davanjem leka postignut sa samo devet meseci terapije [66].

Trastuzumab se obično dobro toleriše iako se često, ali obično reverzibilno, pojavljuje srčana disfunkcija. Selekcija pacijenata treba da se uradi na osnovu ulazne srčane funkcije (iskazane u ejakcionoj frakciji srca). Terapija zahteva periodični, četvoromesečni kardiološki monitoring. Zbog toga Trastuzumab ne treba rutinski davati istovremeno sa antraciklinima (nivo preporuke IB). Ali je zato kombinacija sa taxanima bezbedna i efikasnija nego u sekvencijalnom davanju sa taxanima [61]. Takođe, Trastuzumab se može bezbedno kombinovati sa RT i hormonskom terapijom.

### **1.3 Hormon receptor pozitivni karcinom dojke**

Izraz hormonozavisni karcinom dojke označava one karcinome dojke koji sadrže HR (ER i PgR) u većoj količini implicirajući da je njihov rast zavisen od estrogena, da imaju bolju prognozu od karcinoma dojke koji ne sadrže HR ili ih sadrže u malim količinama i da su osetljivi na HT (hormonska terapija inhibira njihov rast). Dokazana je uloga estrogena u kancerogenezi tumora dojke i stalno se otkrivaju novi molekularni mehanizmi putem kojih estrogen učestvuje u procesima inicijacije, promocije i progresije kancerogeneze [67]. Gensko profilisanje tumora [68] pokazalo je da postoje dva suprotna tipa karcinoma dojke: luminalni tip, sa bogatim sadržajem SR i bazalni tip, bez ekspresije SR[69]. U poređenju sa tumorima sa prisutnim SR, ER0/PgR0 tumori imaju veću sklonost da metastaziraju u toku prvih 5 godina praćenja nakon lokoregionalnog lečenja. Suprotno tome, u periodu posle 5 i više godina praćenja od lokoregionalnog lečenja, rizik od relapsa bolesti veći je kod SR-pozitivnih tumora nego kod karcinoma dojke sa odsutnim SR [70,71]. U odnosu na prognostičku vrednost status SR ima mnogo veći značaj u predviđanju odgovora na HT (prediktivni faktor), tako da se danas karcinomi dojke prema statusu ER i PgR dele na tri kategorije: a) tumori sa

velikom osetljivošću na HT (eng. *highly endocrine responsive*) (ER+/PgR+ fenotip), b) tumori sa nepotpunom osetljivošću na HT (engl. *incompletely endocrine responsive*) (ER+/PgR- ili ER-/PgR+ fenotipovi) i c) tumori neosetljivi na HT (engl. *endocrine non-responsive*) (ER0/PgR0) [70].

Ipak svaka pacijentkinja ima manji ili veći rizik za ponovnu pojavu bolesti (relaps). Da bismo prepoznali pacijentkinje sa većim rizikom od relapsa bolesti kojima je potrebna dodatna terapija, služimo se prognostičkim faktorima.

### 1.3.1 Prognostički faktori

Prognostički faktori su karakteristike samog pacijenta i tumora koje utiču na prirodan tok bolesti i označavaju verovatnoću ponovne pojave bolesti ako se ne primeni odgovarajuća onkološka terapija [73]. Na taj način se diferencira bolesnike sa dobrom prognozom od bolesnika sa lošom prognozom, nezavisno od primenjene terapije.

Kod ranog karcinoma dojke, u ovom trenutku, prihvaćeni su sledeći (tzv. „klasični“) prognostički faktori: 1. broj regionalnih limfnih čvorova koji su zahvaćeni metastatskim procesom, 2. veličina tumora, 3. histološki gradus tumora, 4. limfovaskularna invazija, 5. godine života u momentu postavljanja dijagnoze, 6. markeri tzv. hormonske zavisnosti (receptor za estrogen: ER, receptor za progesteron: PgR), 7. familija receptora za epidermalni faktor rasta (HER-2/ neu) [28]. Određivanje svih „klasičnih“ prognostičkih faktora je obavezno kod svake bolesnice. Najvažniji prognostički faktor je zahvaćenost i broj zahvaćenih regionalnih (aksilarnih) limfnih čvorova metastatskim procesom (nodusni status) [74-76]. Tako je preživljavanje bez bolesti (DFS, engl. *Disease Free Survival*) i ukupno preživljavanje (OS, engl. *Overall Survival*) najduže u bolesnica kod kojih se tumor još nije proširio u regionalne limfne čvorove, dok je u onih bolesnica sa više od 9 pozitivnih regionalnih limfnih čvorova prognoza bolesti najlošija [77].

Na osnovu individualnih prognostičkih faktora svake bolesnice, procenjuje se kategorija rizika za relaps bolesti: nizak (<10%), umereni (10%-50%) i visoki rizik (>50%). [78].

Tabela 3. Kategorije rizika za bolesnice sa operabilnim karcinomom dojke

<b>Nizak rizik</b>	Negativni aksilarni limfatici i sve dole navedeno	Predpostavljeni rizik od relapsa u toku 10 godina (%)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pT<math>\leq</math>2cm</li> <li>• G1</li> <li>• bez ekstenzivne vaskularne invazije</li> <li>• ER i/iliPR prisutni</li> <li>• HER2 bez prekomerne ekspresije</li> <li>• <math>\geq</math>35 godina života</li> </ul>	<10%
<b>Srednji rizik</b>	<p>Negativni aksilarni limfatici i najmanje jedna od navedenih karakteristika</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• pT&gt;2cm, ili</li> <li>• G2-G3, ili</li> <li>• prisutna ekstenzivna vaskularna invazija, ili</li> <li>• ER i PR odsutni, ili</li> <li>• HER2 amplifikacija, ili</li> <li>• <math>\leq</math>35 godina</li> </ul> <p>Zahvaćeni aksilarni limfatici (1-3)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ER /PgR prisutni i</li> <li>• HER2 bez amplifikacije</li> </ul>	10-50%
<b>Visok rizik</b>	<p>Zahvaćeni aksilarni limfatici (1-3) uz</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ER i PgR negativne receptore</li> <li>• HER2 amplifikaciju</li> </ul> <p>Ili</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• metastaze u 4 ili više aksilarnih limfatika</li> </ul>	>50

Pored navedenih, tzv. klasičnih prognostičkih faktora, pojavili su se i novi biomarkeri za određivanje prognoze bolesnica sa karcinomom dojke. Urokinazni

aktivator plazminogena i inhibitor aktivatora plazminogena 1 (uPA/PAI-1) je Eliza test kojim se određuje metastatski potencijal karcinoma dojke. Iako prognostička vrednost ovog testa ima najviši nivo preporuka (IA), još nije široko i zvanično prihvaćen [79]. Danas su, isto tako, klinički parametri (starost, stadijum bolesti, ER i gradus tumora) integrisani u scoring sisteme kojima se relativno precizno procenjuje verovatnoća relapsa bolesti i smrti kao na primer Nottingham Prognostic Index (NPI), Adjuvant! Online ([www.adjuvantonline.com](http://www.adjuvantonline.com)) ili PREDICT skor [80-82]. Kada i dalje postoje nedoumice o izboru adjuvantne terapije, mogu se koristiti genske analize. One mogu da predvide individualni rizik od relapsa i potencijalnu korist od hemioterapije (nivo preporuka je IV, A). Multigenski esej („*Oncotype DX*“) korišćenjem RT-PCR (engl. *reverse transcriptase – polymerase chain reaction*) metode [83], ušao je u preporuke o lečenju nodus negativne grupe bolesnica sa steroid receptor (SR) - pozitivnim rakom dojke [84]. Jos 4 multigenska testa je razmatrano na poslednjoj St. Gallen konferenciji 2017.: Breast Cancer Index, EndoPredict, MammaPrint i Prosigna [39,85,86,28].

Panelisti konferencije su bili saglasni da ovi testovi donose prognostičke informacije komplementarne histopatološkom nalazu za terapiju ranog karcinoma dojke osim u grupi sa pT1a-b, pN0, ER+PR+HER1-sa niskim Ki67 i gradusom tumora. Kada postoje nedoumice o izboru adjuvantne terapije može se koristiti genska analiza kao Mamma Print, Oncotype DX, Prosigna i Endopredict. Oni mogu da predvide individualni rizik od relapsa i potencijalnu korist od hemioterapije (nivo preporuka je IV, A).

Literaturni podaci objavljeni u skorije vreme [87] su pokazali da rizik od razvijanja udaljenih metastaza tokom 5-20 godina trajanja bolesti i posle prekidanja 5-godišnje endokrine terapije, ipak najviše zavisi od TN statusa u vreme dijagnoze bolesti. Takođe ovaj rad je pokazao da više od 40% pacijenata sa T1 karcinomom dojke dožive relaps bolesti u toku 20 godina od operacije. Ovo ukazuje da se rezistencija na antiestrogenu terapiju razvija kod nekih bolesnica, ali da molekularni mehanizmi koji leže u osnovi toga do danas još nisu do kraja shvaćeni.



### 1.3.2 Prediktivni faktori

Prediktivni faktor predviđa odgovor na primenjenu terapiju.

Najvažniji prediktivni faktor u karcinomu dojke je prisustvo ER i PgR: što je veći sadržaj ER i PgR u tumorskim ćelijama, to je veća verovatnoća odgovora na hormonsku terapiju [88-92]. Pozitivan status HER-2 [amplifikacija c-erbB-2 gena (više od 2 kopije) i/ili povećan broj (overekspresija) receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER-2) na membrani ćelija karcinoma dojke] predstavlja dokazani prediktivni faktor odgovora na trastuzumab, monoklonsko antitelo koje se specifično vezuje za HER-2 na površini tumorske ćelije [93-100]. Pozitivan HER2 status snažan je prediktor: dobrog odgovora na lečenje anti-HER2 monoklonalnim antitelom trastuzumabom, rezistencije na alkilirajuće hemioterapeutike, potrebe za višim dozama hemioterapije, benefita od adjuvantne terapije antraciklinima i rezistencije na tamoksifen [101].

### 1.4 Značaj ekspresije PTEN u HR- pozitivnom karcinomu dojke

PTEN je tumor supresorski gen smešten na hromozomu 10 [102]. On kodira PTEN protein koji je po funkciji membranski enzim, fosfataza, relativne molekulske mase 55 kDa. Fiziološki, PTEN je deo PI3K/Akt (fosfatidilinozitol 3 kinaza/Akt) signalnog puta koji ima centralnu ulogu u regulaciji ćelijskog rasta, pokretljivosti ćelije i apoptoze. [103]. PTEN protein defosforilizuje fosfatidilinizitol, 3,4,5-trifosfat (PIP3) i sprečava dalju aktivaciju serin/traonin kinaze AKT i time sprečava dalju aktivaciju celog puta. Gubitak funkcije PTEN izaziva akumulaciju PIP3 i aktivaciju PI3K/Akt puta koji stimuliše ćelijsku proliferaciju, migraciju, fokalnu adheziju, invaziju i inhibiše apoptozu [104-106]. Takođe, PTEN zaustavlja ćeliju u G1 fazi i tako sprečeva apoptozu preko AKT-zavisnog puta [107]. PTEN i p53 su dva najpoznatija tumor supresor gena u genomu, ali je jedino PTEN konstantno aktivan (engl. *Default gatekeeper*) u borbi protiv kancerogeneze [105]. Gubitak PTEN aktivnosti, bilo na genskom nivou ili proteinskom nivou (degradacija PTEN proteina ili posttranslacioni poremećaji PTEN proteina.), povezano je sa mnogim primarnim i metastatskim malignitetima u humanoju populaciji, između ostalih i sa inicijacijom i progresijom karcinoma dojke. To je posle mutacije p53 gena, drugi po učestalosti poremećaj funkcije tumor supresor gena kod humanih

kancera. Značaj mutacije PTEN gena u sporadičnom karcinomu dojke još uvek nije jasan, ali se procenjuje da je prisutna kod 1-50% slučajeva, dok je smanjenje ili gubitak ekspresije PTEN proteina nađeno kod 31-40% karcinoma dojke [108]. Prema najnovijim literaturnim podacima, kancerogeneza je potencijalno povezana pre sa gubitkom funkcije PTEN gena nego gubitkom ekspresije proteina [109-111]. Skoro je otkriveno u grupi pacijentkinja sa HER2 pozitivnim karcinomima dojke, da one pacijentkinje sa očuvanom ekspresijom PTEN proteina postižu terapijski odgovor na ciljanu terapiju sa trastuzumabom približno u 70% slučajeva, u poređenju sa 20% pacijenata sa PTEN negativnom ekspresijom proteina [112-114]. Može se reći da PTEN predstavlja potencijalni marker za predikciju kliničkog odgovora na target-terapiju kod karcinoma dojke. Takođe, u literaturi nalazimo podatke da smanjenje ekspresije PTEN protein, mutacije PIK3CA ili pojačana aktivnost PI3K signalnog puta, je povezana sa značajno kraćim preživljavanjem pacijentkinja uprkos adekvatnom tretmanu sa adjuvantnom hemioterapijom [115-117].

Prema ranijim studijama postoji korelacija između smanjene ekspresije PTEN proteina u ER pozitivnom karcinomu dojke i rezistencije na tamoksifen [115] Takođe prethodne studije su pokazale da je nishodna regulacija PTEN je povezana sa visokim gradusom tumora, udaljenim metastazama i slabijem DFS [110,115]. Smanjena PTEN i/ili povećana AKT aktivnost u ćeliji karcinoma dojke je povezana sa razvojem rezistencije na Tamoksifen. Souman i saradnici su potvrdili vezu između redukovane PTEN proteinske ekspresije i bržeg relapsa karcinoma dojke. Prethodno učinjeno istraživanje u Institutu za onkologiju i radiologiju je pokazalo da ekspresija PTEN proteina može imati prognostički značaj kod postmenopauznih HR pozitivnih ranih karcinoma dojke lečenih adjuvantnom hormonskom terapijom tamoksifenom [118].

## 2. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog rada jesu da se u grupi pacijentkinja sa HR pozitivnim karcinomima dojke dijagnostikovanim u stadijumu I/II i lečenih adjuvantnom ovarijalnom ablacijom proceni:

1. uticaj ekspresije PTEN proteina na preživljavanje bez bolesti (engl. *disease-free survival*, DFS)
2. uticaj ekspresije PTEN proteina na ukupno preživljavanje (engl. *overall survival*, OS)
3. uticaj ekspresije PTEN proteina na preživljavanje specifično za karcinom dojke (engl. *breast cancer specific survival*, BCSS).

## **3. MATERIJAL I METODE**

### **3.1 Pacijentkinje i način lečenja**

Rad je prospektivna analiza praćenja uticaja retrospektivno određene ekspresije PTEN proteina na ishod bolesti analizirane grupe pacijentkinja sa karcinomima dojke.

Sve pacijentkinje su dijagnostikovane u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u periodu od 1988. do 1994. godine i lečene su radikalnom mastektomijom sa disekcijom istostrane pazušne jame. Sve pacijentkinje su u nastavku lečenja, prema tada važećem protokolu za lečenje karcinoma dojke u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije [119], kao jedini oblik adjuvantne terapije, imale ovarijalnu ablaciju putem ozračivanja jajnika sa 12 Gy u četiri seanse. Adjuvantna hemioterapija i postoperativna radioterapija nisu sprovedene. Posle toga su redovno praćene.

Ovo je, prema klasičnim faktorima prognoze, veoma homogena grupa premenopauznih žena sa HR pozitivnim karcinomima dojke i sa istim nodalnim statusom. Sve analizirane pacijentkinje imale su ili gradus tumora 3 bez zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova (G3/N0) ili 1-3 pozitivna limfna čvora bez obzira na gradus tumora (G1-3/N1-3). Premenopauzni status je određen po sledećem kriterijumu: redovne menstruacije ili izostanak menstruacije do godine dana unazad od dijagnoze raka dojke. Ni kod jedne žene nije određivan hormonski status (FSH, LH, estradiol u cirkulaciji) radi potvrde menopauznog statusa.

### **3.2 Metodologija određivanja ER, PgR, c-erbB-2 gena i PTEN statusa**

#### **3.2.1 Metodologija određivanja ER i PgR**

Estrogeni receptori (ER) i progesteronski receptori (PR) iz primarnog tumora određivani su prospektivno kod svih pacijentkinja nakon operacije i to iz smrznutog svežeg uzorka tumorskog tkiva klasičnom biohemijskom metodom [engl. *Classical biochemical dextrane-coated charcoal (DCC) method*] [120].

Biohemijska metoda za određivanje koncentracije steroidnih receptora obuhvata sledeće postupke:

1. uzimanje i čuvanje uzoraka karcinoma dojke,
2. homogenizaciju tkiva i izdvajanje frakcije citosola malignih ćelija,
3. izbor hormona („obeleženog i neobeleženog“ estrogena i progesterona) i izbor opsega koncentracije hormona
4. vezivanje hormona za receptore prisutne u citosolnom ekstraktu malignih ćelija,
5. odvajanje viška nevezanog hormona,
6. određivanje radioaktivnosti u  $\beta$ -scintilacionom brojaču,
7. određivanje koncentracije proteina u uzorku,
8. izračunavanje koncentracije ER i PgR.

Pozitivne vrednosti HR definisane su za ER  $\geq 10$  fmol/mg proteina, a za PgR  $\geq 20$  fmol/mg proteina.

### 3.2.2 Metodologija određivanja c-erbB-2 gena

HER2 status je određen retrospektivno (tokom 2006-2007 godine) detektovanjem amplifikacije c-erbB2 gena iz parafinskih blokova tumorskih tkiva koji su prethodno bili fiksirani formalinom (engl. *formalini-fixed paraffin-embedded tissue blocks*) hromogenom *in situ* hibridizacijom (CISH metoda). U radu se koristi proizvod kompanije Zymed<sup>®</sup> Laboratories Inc. Ona je proizvela SpoT-Light HER-2 probu. Proba se sastoji od dvostrukog lanca DNK i obeležena je digoksigenom (v. prospekt proizvođača). Ona se specifično vezuje za c-erbB-2 genski lokus na 17q12-21 hromozomu. Suština metode je da ona omogućava da se detektuje amplifikacija gena korišćenjem konvencionalne peroksidazne reakcije pod svetlosnim mikroskopom klasično pripremljenog tkiva (parafinski blokovi), što ne zahteva dodatnu (skupu) opremu. Osim toga, istovremeno se vizualizuje i morfologija tkiva, što omogućava simultano posmatranje morfologije tkiva i genskih poremećaja [121].

U radu su korišćeni preparati tkiva debljine 4-5  $\mu\text{m}$  koji su prethodno pripremljeni na sledeći način: a) deparafinizacija, b) pretretman toplotom (zagrevanje u mikrotalasnoj pećnici na 98°C tokom 15 minuta) c) enzimski digestija pepsinom tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi i d) dehidracija etanol alkoholom. Potom se radi denaturacija i DNK preparata i digoksigeninom obeležene SpoT-Light<sup>®</sup> HER-2 probe (Zymed<sup>®</sup> Laboratories Inc) inkubacijom na 94-95°C tokom 5 minuta. Nakon toga se

radi hibridizacija na 37°C tokom perioda dužeg od 10 sati. Imunodetekcija HER-2 probe vrši se sekvencijalnom inkubacijom sa mišjim anti-digoksigen antitelima (At), potom sa antimišjim At kuplovanih peroksidazom i, na kraju, sa DAB-om (engl. substrate-chromogen solution), supstratom peroksidaze, čime se dobija mrki signal. Potom se radi bojenje okolnog tkiva hematoksilinom. Ovako pripremljeni preparati gledaju se na svetlosnom mikroskopu pod objektivom sa uvećanjem od 40x.

Na osnovu ove metodologije bolesnice su podeljene u grupe: a) HER2 pozitivan status tumora [jaka amplifikacija c-erbB-2 gena (> 10 signala ili velikih klastera u nukleusu u više od 50% ćelija) ili slaba amplifikacija c-erbB-2 gena (6-9 signala ili tačaka c-erbB-2 gena prisutno u više od 50% ćelija)] i b) HER2 negativan status tumora [bez amplifikacije c-erbB-2 gena (1-5 signala ili tačaka c-erbB-2 gena u jedru u > 50% ćelija)].

### **3.2.3 Metodologija određivanja PTEN proteina**

Ekspresija PTEN proteina je određena prospektivno, tokom 2017. godine, iz parafinskih blokova primarnog tumora imunohistohemijomskom metodom.

Korišćeni su parafinski preseki debljine 3-5 mikrona koji su postavljeni na Super-Frost pločice. Sušenje u inkubatoru je vršeno na 56° tokom noći, nakon čega je sledila deparafinizacija (Ksilol 2x15min), dehidracija (100% alkohol 2x15min, 96% alkohol 2x10min, destilovana voda 2x2min) i demaskiranje antigena (Target Retrieval Solution 10x conc. pufer Ph9, vodeno kupatilo 45min na 95%). Nakon toga skedi hlađenje u istom puferu na sobnoj temporeaturi 20min, ispiranje u destilovanoj vodi i primena TBS-a 2x2min. Zatim sledi blokiranje endogene peroksidaze (3% vodonik peroksid 5min.) i ispiranje destilovanom vodom i primena TBS-a 2x2min. Nakon toga sledi aplikovanje primarnog antitela (Monoclonal Mouse Anti-Human PTEN, Clone 6H2.1, u razmeri 1:100; kao diluent je korišćen Antibody Diluent with Background Reducing Components-60 min.). Zatim je primenjen TBS-a 2x2 min pa EnVision+sistema za detekciju 35min. i ponovno aplikovanje TBS 2x2min. Primena Chromogen-Liquid DAB+(1ml substrata +1kap hromogena), primena TBS-a 2x2 min, ispiranje destilovanom vodom, kontrastiranje primenom Majerovog hematoksilina od 2.5min, ispiranje destilovanom vodom 2x2min, dehidratacija (96% Alkohol 2x5min, 100% Alkohol 2x5min, ksilol 2x5min i pokrivanje pločica DPX-om.

Primarno antitelo kao i propratni reagensi su proizvodi firme DAKO.

Imunoreaktivnost PTEN-a procenjavana je na osnovu ocene procenata obojenih ćelija - citoplasma/jedro (0: bez imunoreaktivnosti; 1: 1-10%; 2: 11-50%; 3: 51-100%) i intenziteta bojenja (0: bez imunoreaktivnosti; 1: smanjen intenzitet bojenja u odnosu na odgovarajuće normalne ćelije 2. isto bojenje kao kod normalnih ćelija 3: blago povećana bojenja; 4. umereno povećana bojenja; 5. intenzivno povećano bojenje).

Kao pozitivna kontrola je korišćena imunoreaktivnost okolnog tkiva (epitel duktusa, mioepitelne ćelije, fibrociti i nervi) [122].

PTEN status je definisan kao pozitivan ako je skor  $\geq 4$ , a kao negativan ako je skor  $< 4$ .

Retestiranje svih histoloških preparata za ekspresiju PTEN proteina je urađeno od strane dva nezavisna patologa u Službi patologije Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

### **3.2.4 Definicija ishoda bolesti (karcinoma dojke)**

Radi se o pacijentkinjama sa HR pozitivnim karcinomima dojke dijagnostikovane u stadijumu I/II bolesti gde se relaps bolesti očekuje kasnije u toku praćenja bolesti. Zbog toga je potrebno duže praćenje ovih pacijenkinja.

U radu su definisani sledeći parametri na osnovu kojih su se procenjivali ishodi bolesti, (eng. *time to event*):

1. preživljavanje bez bolesti – DFS (eng. *disease-free survival*): vreme od radikalne operacije do pojave lokoregionalnog recidiva i/ili udaljenih metastaza i/ili primarnog tumora suprotne dojke i/ili drugog primarnog tumora drugih organa i/ili smrti bez relapsa bolesti;
2. ukupno preživljavanje – OS (eng. *overall survival*): vreme od radikalne operacije do smrti bez obzira na njen uzrok;
3. preživljavanje specifično za karcinom dojke – BCSS (eng. *breast cancer specific survival*): vreme od radikalne operacije do smrti zbog karcinoma dojke.

### 3.2.5 Statističke metode

- Za ispitivanje saglasnosti uzoračkih raspodela sa normalnom raspodelom, korišćeni su grafici: Normal Q- Plot i Histogram, kao i testovi: Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk.
- Za opis parametara od značaja  $a$  u zavisnosti od njihove prirode, korišćene su mere deskriptivne statistike: frekvencije, procenti, srednja vrednost (prosek), medijana, standardna devijacija (SD) i opseg (raspon).
- Za nivo statističke značajnosti usvojena je vrednost  $\alpha=0,05$ . U slučaju višestrukog testiranja nad istim setom podataka, korišćena je Bonferoni korelacija  $\alpha$ -vrednosti ( $\alpha_1=0,05/3=0,0167$ ).
- Za testiranje razlika između grupa od interesa za ispitivanje  $a$  u zavisnosti od prirode ispitivanih parametara, korišćeni su: Pearson  $\chi^2$  test i Fisher exact test.
- Za prikaz OS, DFS, BCSS korišćena je Kaplan-Meier product-limit metoda a za njihov opis korišćene su medijane Survival Analysis i odgovarajući 95% intervali poverenja (95%CI). Za testiranje razlika u ukupnom preživljavanju i preživljavanja bez progresije bolesti u odnosu na parametre od značaja, korišćen je Log-rank test.
- Za procenu uticaja faktora od značaja na OS, DFS, BCSS, korišćen je univarijantni Cox-ov proporcionalni hazardni model. Za opis je korišćen hazard ratio (HR) sa odgovarajućim 95% intervalom poverenja dok je za ispitivanje statističke značajnosti faktora u regresionom modelu korišćen Likelihood ratio test.
- Analiza podataka je rađena u statističkom programu R version 3.3.2 [123]



## 4. REZULTATI

Rezultati naše istraživačke studije su prikazani sistematski, prema postavljenim ciljevima rada.

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 66 pacijentkinja sa HR pozitivnim ranim karcinomom dojke koje su dijagnostikovane i operativno lečene u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, u periodu od decembra 1988. do jula 1994. godine. Nakon toga, kod svih pacijentkinja sprovedena je ovarijalna ablacija kao jedina adjuvantna hormonska terapija sa totalnom dozom od 12 Gy u 4 seanse. Do završetka analize, medijana praćenja iznosila je 17 godina (raspona 1-29 godina).

### 4.1 Karakteristike pacijentkinja, oboljenja i ishod lečenja

#### 4.1.1 Opšte karakteristike pacijentkinja

U istraživanje je uključeno 66 pacijentkinja čije su opšte karakteristike prikazane u Tabeli 4.

Tabela 4. Opšte karakteristike bolesnika

Karakteristike	N (%)
<b>Životna dob (godine)</b>	
Medijana (opseg)	45 (35-54)
Prosek (SD)	44,56
<b>Menostatus</b>	
Premenopauzne	66 (100)
<b>Ukupno</b>	66 (100)

Sve pacijentkinje su bile premenopauzne, prosečne starosti od 45 godina i dobrog opšteg stanja.

#### 4.1.2 Kliničke karakteristike tumora

Kliničke karakteristike tumora prikazane su u tabeli 5.

Tabela 5. Kliničke karakteristike oboljenja

Karakteristike	N (%)
<i>Klinički T u TNM</i>	
T1	13 (19,70)
T2	48 (72,72)
T3	5 (7,58)
<i>Klinički N u TNM</i>	
N0	25 (37,88)
N1	41 (62,12)
<i>Klinički M u TNM</i>	
M0	66 (100)
<i>Klinički stadijum bolesti</i>	
Stadijum IIA	58 (87,88)
Stadijum IIB	8 (12,12)

Sve bolesnice su u trenutku postavljanja dijagnoze bolesti bile bez udaljenih metastaza i najveći broj pacijentkinja je imao T2 i N1 status zbog čega je stadijum bolesti IIA bio dominantan po učestalosti.

#### 4.1.3 Patohistološke (PH) karakteristike tumora i hormonski receptori

Sve pacijentkinje su u inicijalnom onkološkom lečenju imale radikalnu mastektomiju sa disekcijom regionalnih limfnih čvorova istostrane pazušne jame. PH karakteristike tumora su prikazani su u tabeli 6.

Tabela 6. HP karakteristike tumora

<b>Karakteristike</b>	<b>N (%)</b>
<i>PH tumora</i>	
Duktalni	29 (43,94)
Lobularni	27 (40,91)
Drugo	10 (15,15)
<i>Veličina tumora (cm)</i>	
do 2 cm	36 (54,55)
2-5 cm	29 (43,94)
> 5 cm	1 (1,51)
<i>Gradus tumora</i>	
Gradus 1	3 (4,55)
Gradus 2	53 (80,30)
Gradus 3	10 (15,15)
<i>Nodusni status</i>	
Negativan	6 (9,09)
Pozitivan 1 čvor	32 (48,48)
Pozitivna 2 čvora	19 (28,79)
Pozitivna 3 čvora	9 (13,64)

Sve pacijentkinje su imale histološki potvrđen invazivni karcinom dojke. Najzastupljeniji tip tumora bio je duktalni karcinom, veličina tumora do 2 cm i gradus 2 tumora. Čak 60/66 (91,01%) pacijentkinja je imalo pozitivne regionalne limfne čvorove, dok je medijana broja pregledanih limfnih čvorova bila 12 (opseg: 7-33). Najčešće je bolešću bio zahvaćen jedan limfni čvor. Lobularni karcinom je bio zastupljen samo za oko samo 3% manje od najčešćeg, duktalnog karcinoma.

Karakteristike hormonskih receptora tumora su prikazani su u tabeli 7.

Tabela 7. Karakteristike hormonskih receptora

<b>Karakteristike</b>	<b>N (%)</b>
<i>Sadržaj ER (fmol/mg protein)</i>	
Medijana (opseg)	22 (0-199)
Prosek (SD)	32,44 (39)
<i>Sadržaj PgR (fmol/mg protein)</i>	
Medijana (opseg)	65 (14-511)
Prosek (SD)	102,6 (104,52)
<i>Status ER</i>	
Negativan	15 (22,73)
Pozitivan	51 (77,27)
<i>Status PgR</i>	
Negativan	2 (3,03)
Pozitivan	64 (96,97)
<i>Status ER/PgR</i>	
ER+/PgR+	49 (74,24)
ER-/PgR+	15 (22,73)
ER+/PgR-	2 (3,03)
<i>HER-2 status (CISH)</i>	
Negativan	56 (84,85)
Pozitivan	10 (15,15)

Najviše pacijentkinja je imao pozitivan status i ER i PgR kao i HER2 negativnu bolest (bio je luminal HER2-negativan-like podtip).

#### 4.1.4 PTEN

Prema ekspresiji PTEN proteina, a prema prethodno opisanom skor sistemu u Metodologiji ovog rada, ispitivana grupa pacijentkinja je podeljena na podgrupu bez ekspresije PTEN proteina (PTEN negativna grupa) i na grupu sa prisutnom ekspresijom PTEN proteina (PTEN pozitivna grupa). To je prikazano u tabeli 8.

Tabela 8. Ekspresija PTEN proteina u celoj grupi

Ekspresija PTEN proteina	N (%)
• PTEN pozitivne	47 (71)
• PTEN negativne	19 (29)
<b>Ukupno</b>	<b>66 (100)</b>

#### 4.1.5 Karakteristike postoperativnog lečenja

Karakteristike postoperativnog lečenja su prikazane u tabeli 9.

Tabela 9. Karakteristike postoperativnog lečenja

Karakteristike	N (%)
<i>Postoperativna zračna terapija</i>	
Da	0
Ne	66 (100)
<i>Adjuvantna hormonska terapija</i>	
Ovarijalna ablacija (OA)	66 (100)
Drugo	0
<i>Adjuvantna hemioterapija</i>	
Da	0
Ne	66 (100)

Sve pacijentkinje su u nastavku lečenja, kao jedini oblik adjuvantne terapije, imale ovarijalnu ablaciju putem ozračivanja jajnika.

## 4.1.6 Ishod lečenja

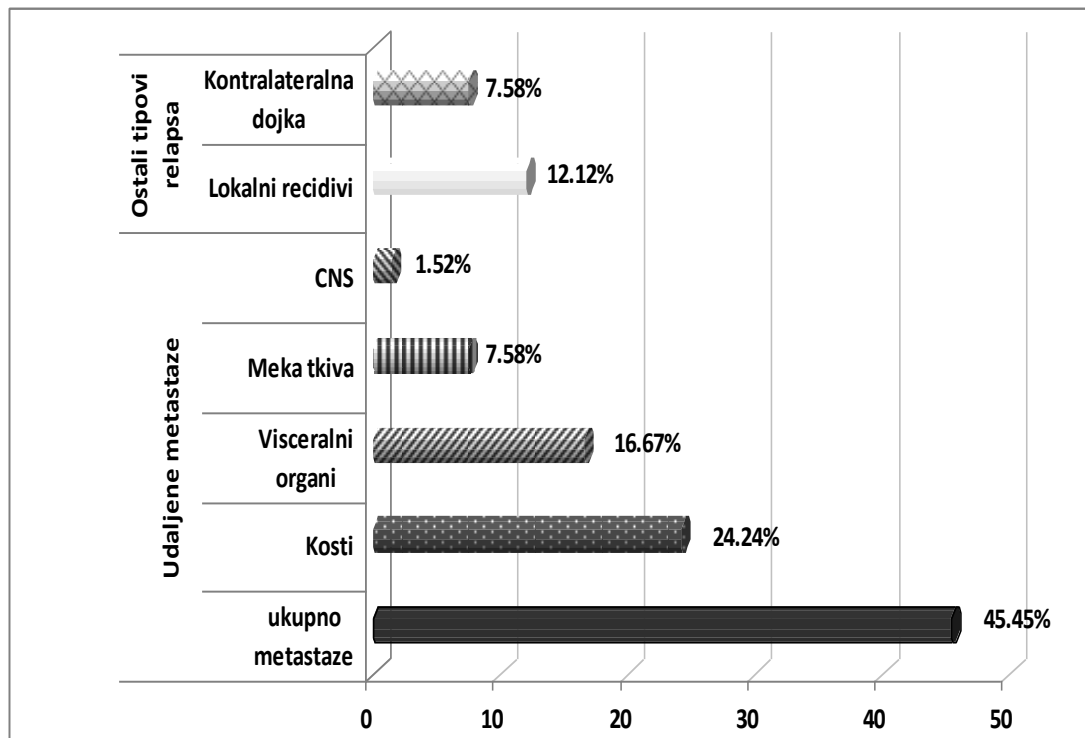
### 4.1.6.1 Relaps bolesti

Pojava prvog relapsa karcinoma dojke zabeležena je kod 37/66 (56,06%) bolesnica. To je zajedno sa lokalizacijom relapsa bolesti prikazano u tabeli 10.

Tabela 10: Prvi relaps karcinoma dojke i lokalizacija prvog relapsa

Karakteristike	N (%)
<i>Relaps bolesti</i>	
• Da	37 (56,06)
• Ne	29 (43,94)
<i>Lokalizacija relapsa bolesti</i>	
• Lokalni recidiv	8 (12,12)
• Primarni tumor kontralateralne dojke	5 (7,58)
• Udaljene metastaze	30 (45,45)
✓ Kosti	16 (24,24)
✓ Viscera	11 (16,67)
✓ Meka tkiva	5 (7,58)
✓ CNS	1 (1,52)
✓ Multiple ( $\geq 2$ organa)	5 (7,58)
<i>Broj organa zahvaćenih metastazama</i>	
• jedan organ	25 (37,88)
• dva organa	3 (4,55)
• tri organa	2 (3,03)
<i>Drugi primarni tumor</i>	2 (3,03)

Detalji vezani za lokalizaciju i učestalost relapsa bolesti su prikazani na grafikonu 1.



Grafikon 1. Lokalizacije i učestalosti relapsa bolesti

Lokalni recidiv se javio kod 8/66 (12, 12%), a primarni tumor kontralateralne dojke kod 5/66 (7,58%) pacijentkinja. Medijana vremena do pojave lokalnog recidiva bila je 6,4 godine (a opseg 0,75-1,58 godina).

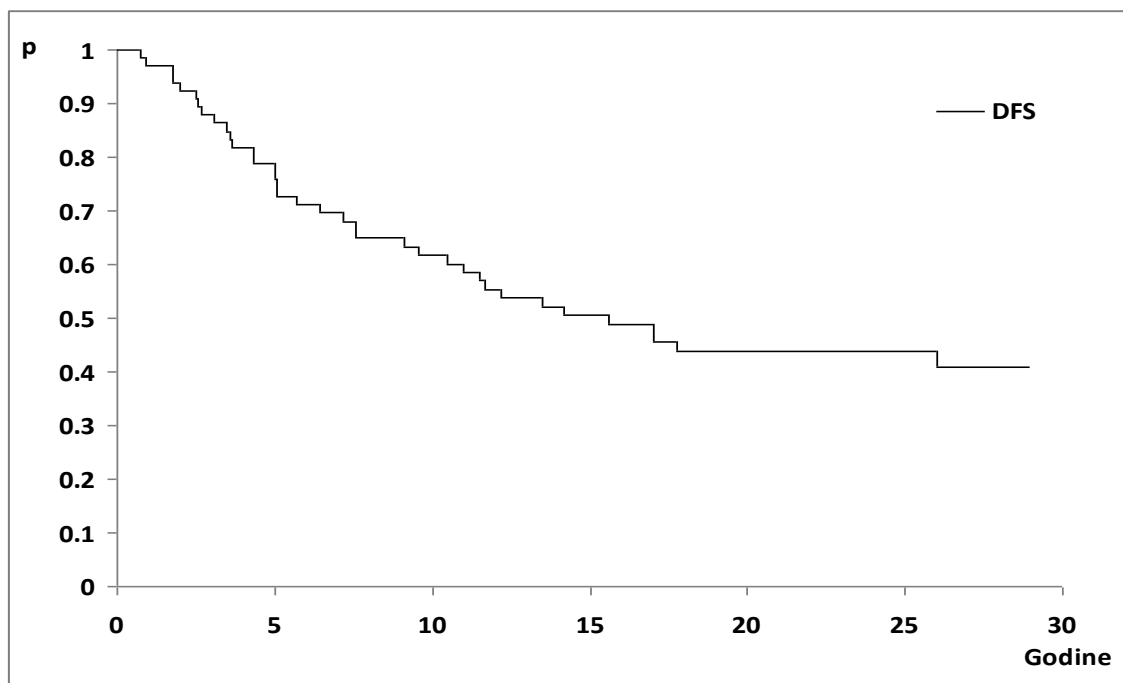
Pojava primarnog tumora drugog organskog sistema registrovana je kod dve pacijentkinje: karcinom bronha nakon slobodnog intervala od 26 godina i karcinom grlića materice nakon slobodnog intervala od 23 godine. Ni kod jedne pacijentkinje nije zabeležen relaps karcinoma dojke i obe su lečene prema protokolima za lečenje malignih tumora bronha, odnosno grlića materice. Pacijentkinja sa karcinomom bronha preminula je zbog karcinoma bronha, dok je ona sa karcinomom grlića materice još živa.

Najveći broj pacijentkinja sa relapsom karcinoma dojke je imalo jedan organ zahvaćen metastazama, najčešće kosti [16/66 (24,24%)], a najmanje često CNS [1 (1,52%)].

Od 37 pacijentkinja koje su imale relaps karcinoma dojke, 28/37 je lečeno samo hormonoterapijom, a 9/37 bolesnica samo hemioterapijom.

#### 4.1.6.2 Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS)

Kriva DFS, urađena po metodi Kaplan-Meier, je prikazana je na grafikonu 2.



Grafikon 2. Preživljavanje bez znakova bolesti u celoj grupi

Medijana DFS za celu grupu pacijentkinja iznosila je 15,6 godine sa odgovarajućim 95% intervalom poverenja (95%CI) koji iznosi  $\geq 10.5$  godina a što je prikazano u tabeli 11.

Tabela 11. DFS u celoj grupi

	Broj pacijentkinja	Broj događaja	Medijana (godine)	95%IC
FS	66	37	15,6	$\geq 10.5$

U tabeli br 12. je prikazana godišnja stopa DFS u našoj grupi pacijentkinja a kroz celokupni period praćenja.



Tabela 12. Prikaz godišnje stope DFS u celoj grupi u celokupnom periodu praćenja

Godina praćenja	Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS)	
	Kumulativni %	95% CI za kumulativni %
1. godina	97,0	92,9-100
2. godina	92,4	86,3-99,0
3. godina	87,9	80,3-96,1
4. godina	81,8	73,0-91,7
5. godina	75,8	66,1-86,8
10. godina	61,7	51,0-74,7
15. godina	50,6	39,7-64,4
20. godina	43,7	33,0-57,9
25. godina	43,7	33,0-57,9
29. godina	40,8	29,9-55,7

Ni nakon 15 godina praćenja premenopauzних pacijentkinja sa HR pozitivnim ranim karcinomom dojke medijana DFS nije dostignuta. Kumulativni procenat DFS u 20-toj i 25-toj godini je isti i iznosi 43,7%. Na kraju praćenja (29 god) kumulativna DFS iznosi 40,8%, a gornja granica odgovarajućeg 95% intervala poverenja iznosi 55,7% .

#### 4.1.6.3 Ukupno preživljavanje (OS)

Smrtni ishod je zabeležen kod 34/66 (51,52%) pacijentkinja i to je prikazano u tabeli br 13.

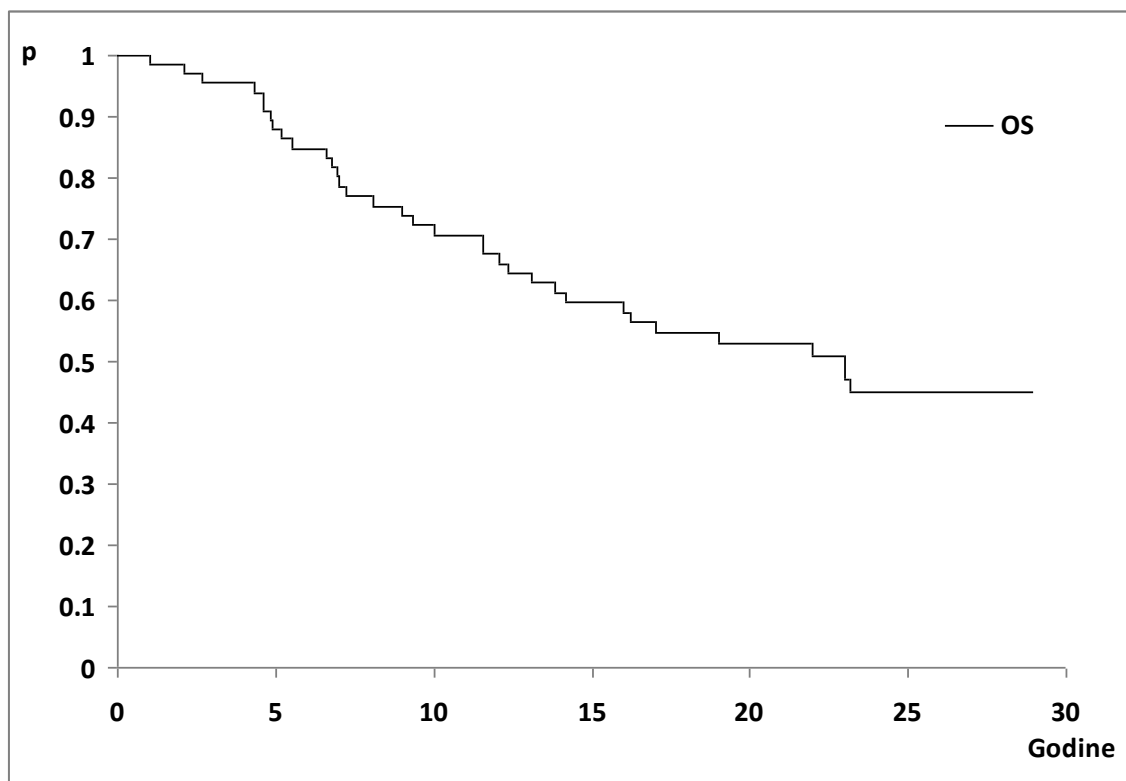
Tabela 13. Ishod u celoj grupi bolesnica

Ishod	N (%)
• Žive	32 (51,52%)
• Umrle zbog karcinoma dojke	32 (48,48%)
• Umrle bez relapsa karcinoma dojke	2 (3,2%)

S obzirom na to da su samo dve bolesnice od ukupno umrlih, preminule zbog pridruženih bolesti, a bez progresije karcinoma dojke, u našoj grupi pacijentkinja BCSS

i OS predstavljaju različite kategorije, mada postoji mala razlika između njih (Tabela br..).

Kaplan-Meier kriva OS u celoj ispitivanoj grupi je prikazana na sledećem grafikonu.



Grafikon 3. Ukupno preživljavanje u celoj grupi

Medijana OS za celu grupu bolesnica iznosila je 23 godine (95%CI  $\geq 14,2$  godine), što je prikazano u tabeli 14.

Tabela 14. OS u celoj ispitivanoj grupi

Broj pacijentkinja	Broj događaja	Medijana(godine)	95%CI
66	34	23	$\geq 14,2$

U sledećoj tabeli je prikazana kumulativna stopa OS u našoj grupi pacijentkinja tokom celokupnog perioda praćenja.

Tabela 15. Prikaz kumulativne stope OS u celoj grupi u celokupnom periodu praćenja

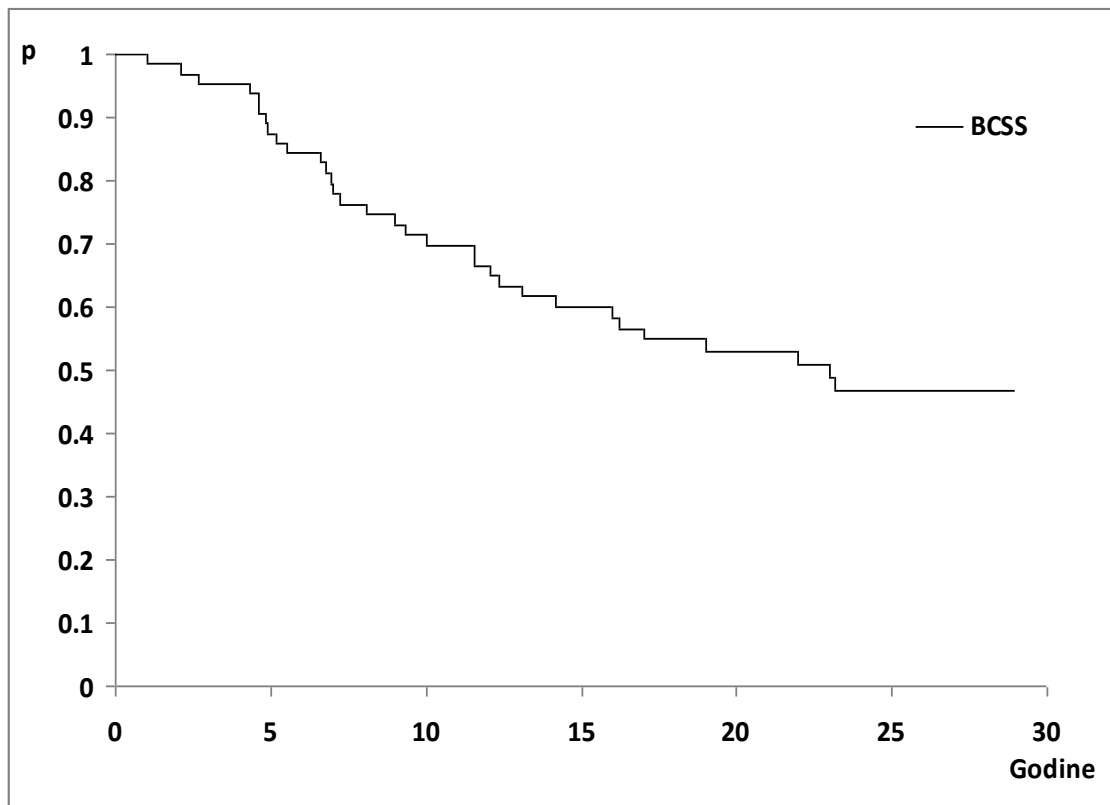
Godina praćenja	Preživljavanje bez znakova bolesti (OS)	
	Kumulativni %	95% CI za kumulativni %
1. godina	98,5	95,6-100
2. godina	98,5	95,6-100
3. godina	95,5	90,6-100
4. godina	95,5	90,6-100
5. godina	87,9	80,3-96,1
10. godina	70,7	60,5-82,7
15. godina	59,7	48,8-73,0
20. godina	52,8	41,8-66,8
25. godina	45,1	34,0-59,7
29. godina	45,1	34,0-59,7

Ni nakon 20 godina praćenja premenopauzних bolesnica sa HR pozitivnim ranim karcinomom dojke medijana OS nije dostignuta. Kumulativni procenat OS u 25-toj godini i na kraju praćenja (29. godina) je isti i iznosi 45,1%, a gornja granica odgovarajućeg 95% intervala poverenja iznosi 59,7% .

#### 4.1.6.4 Preživljavanje specifično za karcinom dojke (BCSS)

Zbog karcinoma dojke je umrlo 32/66 (48,48%), od ukupno umrlih 34 pacijentkinja, dok su dve pacijentkinje od ukupno umrlih, preminule zbog pridruženih bolesti a bez progresije karcinoma dojke.

Kaplan-Meier kriva BCSS u celoj grupi je prikazana na grafikonu 4.



Grafikon 4. BCSS u celoj grupi

U tabeli je prikazana medijana BCSS i iz tabele se vidi da ona iznosi isto kao kod OS, tj. 23 godine (95%CI  $\geq 14,2$  godine).

Tabela 16. BCSS u celoj ispitivanoj grupi.

	Broj pacijentkinja	Broj događaja	Medijana(godine)	95%CI
BCSS	64	32	23	$\geq 14,2$

U sledećoj tabeli je prikazana kumulativna stopa BCSS u našoj grupi pacijentkinja tokom celokupnog perioda praćenja.

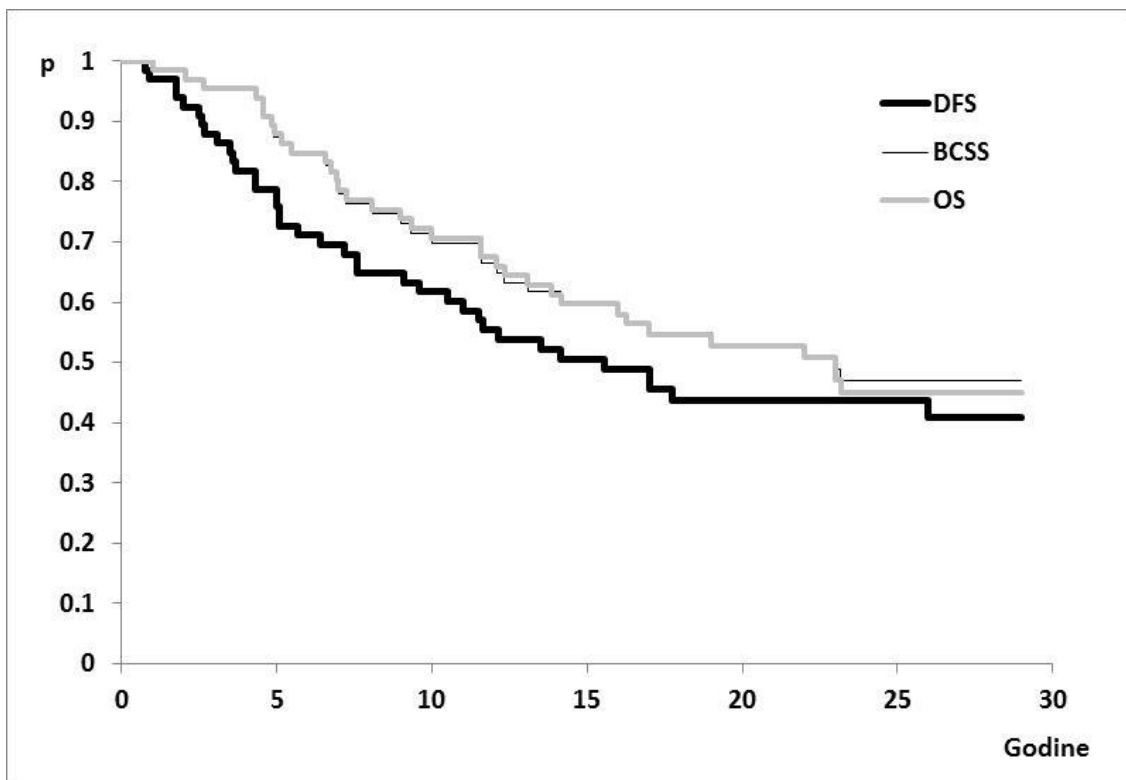
Tabela 17. Prikaz kumulativne stope BCSS u celoj grupi u celokupnom periodu praćenja

Godina praćenja	Preživljavanje bez znakova bolesti (BCSS)	
	Kumulativni %	95% CI za kumulativni %
1. godina	98,4	95,4-100
2. godina	98,4	95,4-100
3. godina	95,3	90,3-100
4. godina	95,3	90,3-100
5. godina	87,5	79,8-96,0
10. godina	69,8	59,3-82,1
15. godina	59,7	48,8-73,0
20. godina	60,0	49,0-73,5
25. godina	46,9	35,6-61,7
29. godina	46,9	35,6-61,7

Ni nakon 20 godina praćenja premenopauzних pacijentkinja sa HR pozitivnim ranim karcinomom dojke medijana BCSS nije dostignuta. Kumulativni procenat BCSS u 25-toj godini i na kraju praćenja (29. godina) je isti i iznosi 46,9%, a gornja granica odgovarajućeg 95% intervala poverenja iznosi 61,7%.

#### 4.1.6.5 Zbirni prikaz svih Kaplan-Meier kriva za DFS, OS i BCSS

Kaplan-Meier krive koje predstavljaju vremena do pojave događaja kojima je definisan ishod bolesti u celokupnoj grupi, zbirnoj su prikazane su na sledećem grafikonu.



Grafikon 5. Zbirni prikaz svih Kaplan-Meier kriva za DFS, BCSS i OS

Iz grafikona se najbolje vidi odnos između vremena do pojave događaja kojim su definisani DFS, OS i BCSS, a posebno skoro identičan odlik kriva za OS i BCSS. Takođe se vidi da je generalno ova grupa bolesnica dugo praćena i da bolesnice generalno, imaju dugo preživljavanje sa primenjenim lečenjem.

## 4.2 Ispitivanje povezanosti ekspresije PTEN proteina i karakteristika tumora dojke

Prikaz karakteristika bolesti i njihove povezanosti sa ekspresijom PTEN proteina je data u sledećoj tabeli.

Tabela 18. Demografski podaci i karakteristike oboljenja u PTEN + i PTEN- podgrupama

Karakteristike	N (%)	PTEN+	PTEN-	Test; p vrednost
<i>Starost (godine)</i>				
Srednja vrednost (SD)	44,56	44,68 (4,38%)	44,26	Wilcoxon rank sum
Mediana (raspon)	45 (35-54)	45 (35-52)	43 (36-54)	W=423, p=0,74389
<i>Godine</i>				
≤45 godina	37 (56,06)	27 (57,45)	10 (52,63)	$\chi^2$ test $\chi^2_2=0,13$ p=0,72118
>45 godina	29 (43,94)	20 (42,55)	9 (47,37)	
<i>Klinički stadijum TNM</i>				
Stadijum II A	58 (87,88)	44 (93,62)	14 (73,68)	Fisher Exact
Stadijum II B	8 (12,12)	3 (6,38)	5 (26,32)	p=0,06017
<i>Histologija tumora</i>				
Duktalni	36 (54,55)	21 (44,68)	8 (42,11)	Fisher Exact
Lobularni	29 (43,94)	16 (34,04)	11 (57,89)	p=0,04662
Ostali	1 (1,52)	10 (21,28)	0(0)	
<i>Veličina tumora (cm)</i>				
0-2	3 (4,55)	26 (55,32)	10 (52,6)	Fisher Exact p=0,41850
2-5	53 (80,30)	21 (44,68)	8 (42,11)	
> 5	10 (15,15)	0 (0)	1 (5,26)	
<i>Gradus tumora</i>				
Gradus 1	3 (4,55)	3 (6,38)	0 (0)	Fisher Exact p=0,75413
Gradus 2	53 (80,30)	37 (78,72)	16 (84,21)	
Gradus 3	10 (15,15)	7 (14,89)	3 (15,79)	
<i>Nodalni status</i>				
Negativan	6 (9,09)	5 (10,64)	1 (5,26)	Fisher Exact
Pozitivan	60 (90,91)	42 (89,36)	18 (94,74)	p=0,66430
<i>ER vrednost (fmol/mg)</i>				
Srednja vrednost (SD)	32,44 (39)	25,89 (30,68)	48,63	Wilcoxon rank sum
Medijana (raspon)	22 (0-199)	18 (0-183)	29 (8-199)	W=597,5;p=0,03297
<i>PgR vrednost (fmol/mg)</i>				
Srednja vrednost (SD)	102,6 (104,52)	108,9 (111,95)	87 (84,05)	Wilcoxon rank sum
Medijana (raspon)	65 (14-511)	70 (14-511)	59 (16-330)	W=411,5;p=0,62509
<i>HER-2 status (CISH)</i>				
Negativan	56 (84,85)	39 (82,98)	17 (89,47)	Fisher Exact
Pozitivan	10 (15,15)	8 (17,02)	2 (10,53)	p=0,71114
<b>Ukupno</b>	<b>66 (100)</b>	<b>47 (100)</b>	<b>19 (100)</b>	-

Iz tabele se može uočiti da su obe podgrupe pacijentkinja (PTEN+ prema PTEN -) bile homogene prema svim inicijalnim karakteristikama:

- pacijenata (životno doba)

- oboljenja (veličina i gradus tumora, nodusni status)
- PgR i HER2status.

U poređenju sa podgrupom sa PTEN pozitivnim karcinomom dojke, podgrupa pacijentkinja sa PTEN negativnim karcinomom dojke imala je statistički značajno više lobularnih tumora, kao i veći sadržaj receptora za ER.

Postoji trend ka većoj učestalosti IIB stadijuma bolesti kod pacijentkinja sa PTEN negativnim tumorima u odnosu na pacijentkinje sa PTEN pozitivnim tumorima.

### 4.3 Ispitivanje povezanosti ekspresije PTEN proteina i vremena do pojave događaja kojim su definisani DFS, OS i BCSS

#### 4.3.1 Ekspresija PTEN proteina i ishodi lečenja

U tabeli 19 je prikazan ishod bolesti u celoj grupi pacijentkinja i u podgrupama sa prisutnom ekspresijom PTEN proteina i bez nje.

Tabela 19. Ishod bolesti i ekspresija PTEN proteina u celoj ispitivanoj grupi

Ishod bolesti	N (%)	PTEN+(%)	PTEN-(%)	Test
<i>Relaps</i>				
Bez relapsa	29 (43,94)	27 (57,45)	2 (10,53)	Fisher Exact p=0,0007
Sa relapsom	37 (56,06)	20 (42,55)	17 (89,47)	
<i>Ishod bolesti</i>				
Žive	32 (48,48)	30 (63,83)	2 (10,53)	Fisher Exact p=9,04x10 <sup>-5</sup>
Umrle	34 (51,52)	17 (36,17)	17 (89,47)	

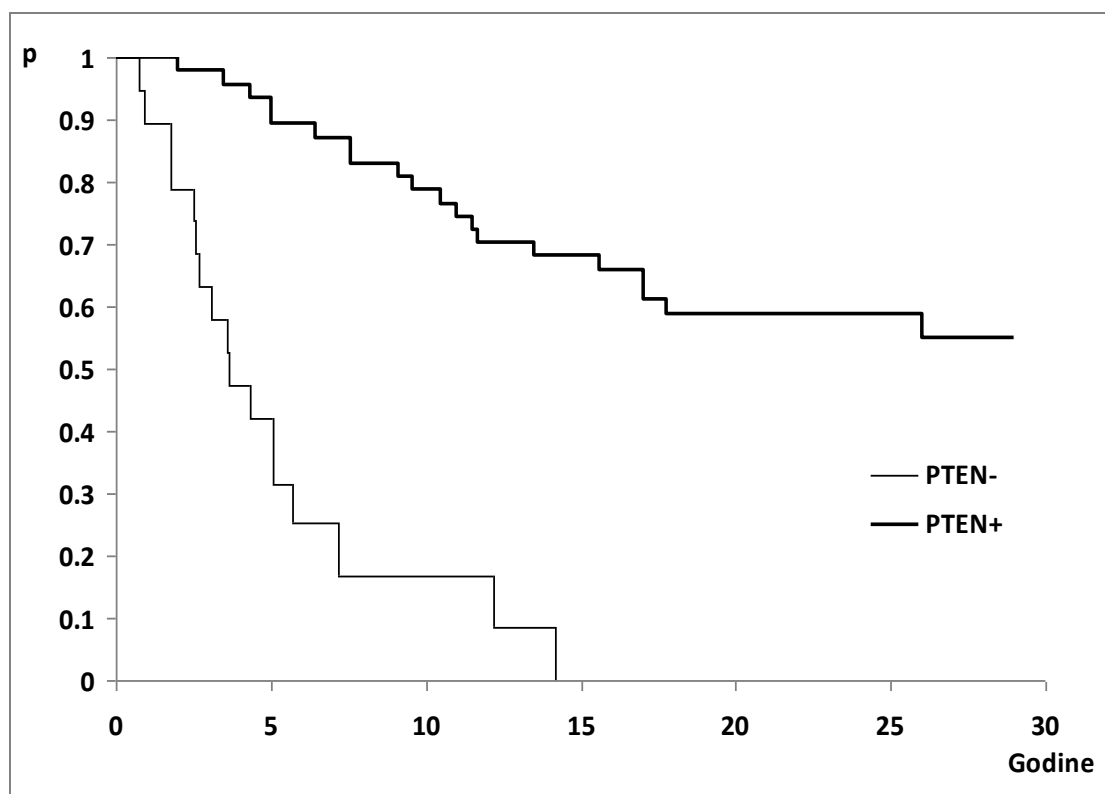
Posle medijane praćenja od 17 godina zabeleženo je ukupno preživljavanje od 50%. Kod pacijentkinja sa PTEN negativnim tumorima zabeležena je statistički značajno veća stopa relapsa bolesti u odnosu na pacijentkinje sa PTEN pozitivnim tumorima. Takođe, u PTEN negativnoj podgrupi smrtni ishod je zabeležen u značajno većem broju pacijentkinja u poređenju sa PTEN pozitivnom podgrupom.



U daljem sledu rezultata je pojedinačno prikazano svako definisano vreme ishoda bolesti, u odnosu na prisutnu/odsutnu ekspresiju PTEN proteina.

#### 4.3.2 Povezanost PTEN statusa i DFS

Na sledećem grafikonu je prikazana Kaplan-Maier kriva za preživljavanje pacijentkinja bez bolesti u obe grupe u odnosu na PTEN status.



Grafikon 6. DFS u podgrupama sa PTEN pozitivnim i PTEN negativnim tumorima

Rezultati ispitivanja DFS u odnosu na kategorije ekspresije PTEN proteina, prikazani su u tabeli 20.

Tabela 20. DFS u podgrupama sa PTEN pozitivnim i PTEN negativnim tumorima

<b>Podgrupe</b>	<b>N</b>	<b>Medijana(godine)</b>	<b>95% CI</b>	<b>Log-rank test</b>
PTEN pozitivni	20/47	NR	-	p=7,9x10 <sup>-11</sup>
PTEN negativni	17/19	3,7	≥ 2,7	

NR:nije dostignuta medijana DFS

Pacijentkinje sa PTEN negativnim tumorima imaju značajno kraće DFS u odnosu na pacijentkinje sa PTEN pozitivnim tumorima (Log-rank test, p=7,9x10<sup>-11</sup>).

U sledećoj tabeli prikazaće se kumulativna stopa DFS u PTEN negativnoj i PTEN pozitivnoj podgrupi pacijentkinja.

Tabela 21. Kumulativna stopa DFS prema ekspresiji PTEN proteina

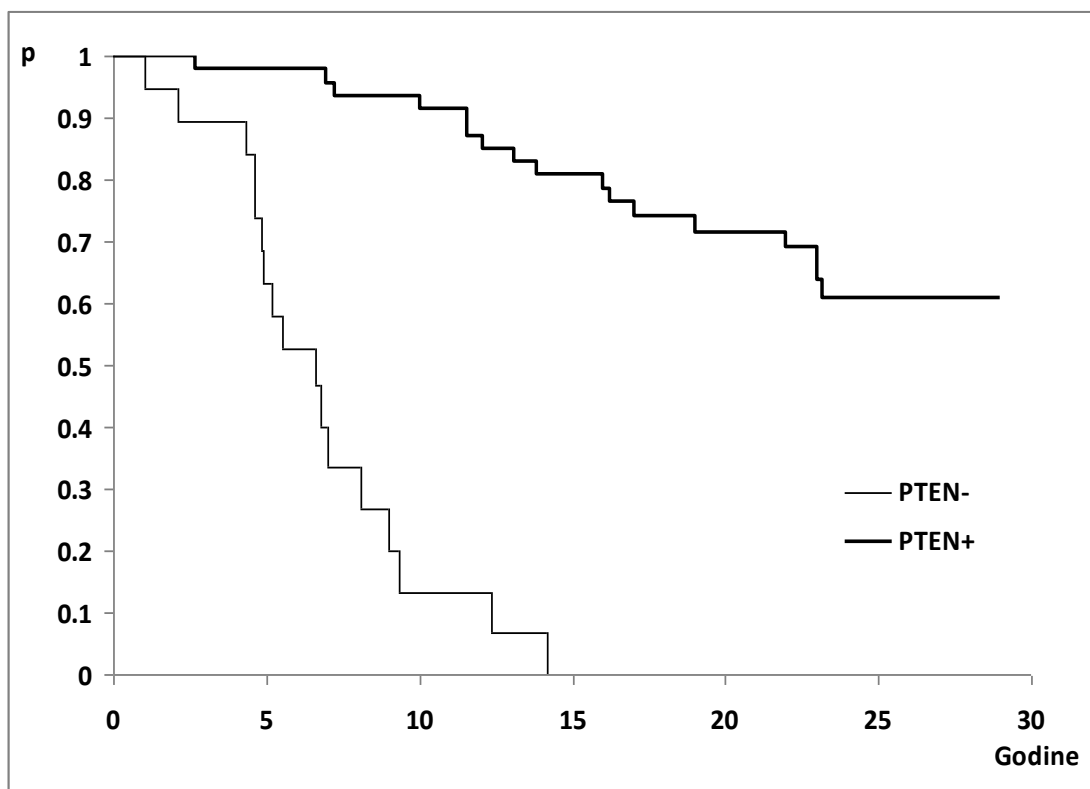
<b>Godina praćenja</b>	<b>Kumulativni % DFS (95% CI)</b>	
	<b>PTEN -</b>	<b>PTEN+</b>
1. godina	89,5 (76,7-100)	100 (100)
2. godina	79,09(62,6-99,6)	97,9 (93,8-100)
3. godina	63,2 (44,8-89,0)	97,9 (93,8-100)
4. godina	47,4 (29,5-76,1)	95,7 (90,1-100)
5. godina	42,1 (24,8-71,3)	89,4 (61,0-98,6)
10. godina	16,8 (5,5-52,0)	78,7 (67,9-91,3)
15. godina	-	68,1 (56,0-82,8)
20. godina	-	58,8 (46,1-75,0)
25. godina	-	58,8 (46,1-75,0)
29. godina	-	58,8 (46,1-75,0)

Petogodišnje i desetogodišnje stope DFS su za 47% odnosno za 60% veće u PTEN pozitivnoj u poređenju sa PTEN negativnom podgrupom pacijentkinja. Od 15. godine prate se samo PTEN pozitivne pacijentkinje, s obzirom na to da su sve pacijentkinje u PTEN negativnoj podgrupi imale relaps bolesti. Na kraju praćenja (29 god) kumulativni procenat DFS kod bolesnica sa PTEN pozitivnom ekspresijom

proteina iznosi 58,8%, a gornja granica odgovarajućeg 95% intervala poverenja iznosi 75,0% .

#### 4.3.3 Povezanost PTEN statusa i OS

Na sledećem grafikonu je prikazana Kaplan-Maier kriva za ukupno preživljavanje pacijentkinja u obe grupe u odnosu na PTEN status.



Grafikon 7. OS u podgrupama sa PTEN pozitivnim i PTEN negativnim tumorima

Iz grafikona 7 uočava se da pacijentkinje koje su PTEN pozitivne imaju bolje, duže, ukupno preživljavanje od onih koje su PTEN negativne.

Povezanost statusa ekspresije PTEN proteina i OS je prikazana u tabeli br.22.

Pacijentkinje sa PTEN negativnim tumorima imaju značajno kraće OS u odnosu na pacijentkinje sa PTEN pozitivnim tumorima (Log-rank test,  $4,8 \times 10^{-15}$ ).

Tabela 22. OS u podgrupama sa PTEN pozitivnim i PTEN negativnim tumorima

Podgrupa	N	Medijana (godine)	95%CI	Log-rank test
PTEN pozitivni	17/47	NR	NA	p=4,8x10 <sup>-15</sup>
PTEN negativni	17/19	6,6	4,9-9,3	

NR: nije dostignuta medijana OS; NA :nije primeljivo

U sledećoj tabeli je prikazana kumulativna stopa OS u PTEN negativnoj i PTEN pozitivnoj podgrupi pacijentkinja.

Tabela 23. Kumulativna stopa OS u PTEN negativnoj i PTEN pozitivnoj podgrupi

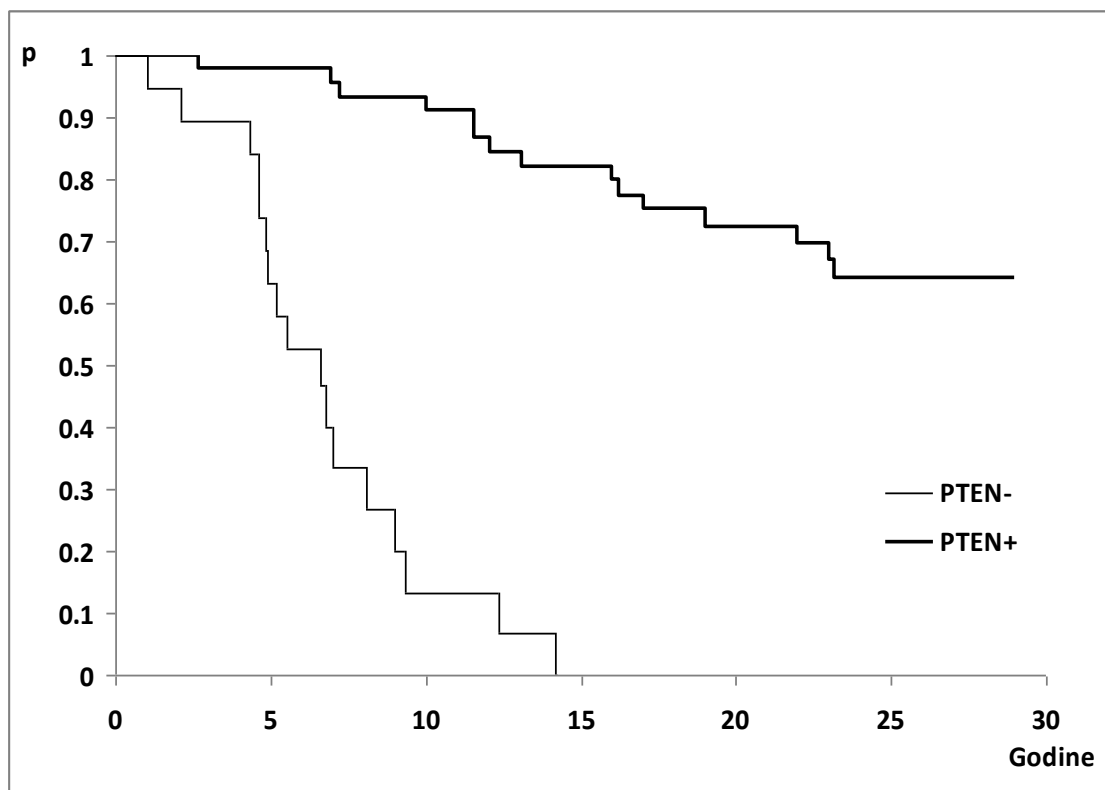
Godina praćenja	Kumulativni % OS (95% CI)	
	PTEN -	PTEN+
1. godina	94,7 (85,2-100)	100 (100)
2. godina	94,7 (85,2-100)	100 (100)
3. godina	89,5 (76,7-100)	97,9 (93,8-100)
4. godina	89,5 (76,7-100)	97,9(93,8-100)
5. godina	63,2 (44,8-89,0)	97,9 (93,8-100)
10. godina	13,4 (3,76-47,5)	91,5 (83,8-99,8)
15. godina	-	80,9 (70,3-92,9)
20. godina	-	71,6 (59,5-86,0)
25. godina	-	61,0 (48,0-77,7)
29. godina	-	61,0 (48,0-77,7)

Iz tabele se vidi da su petogodišnje i desetogodišnje stope OS za 34,7% odnosno za 78% veće u PTEN pozitivnoj u poređenju sa PTEN negativnom podgrupom pacijentkinja.

Od 15. godine prate se samo PTEN pozitivne pacijentkinje, s obzirom na to da su sve pacijentkinje u PTEN negativnoj podgrupi preminule. Na kraju praćenja (29 godina) kumulativni procenat OS kod bolesnica sa PTEN pozitivnom ekspresijom proteina iznosi 61% a gornja granica odgovarajućeg 95% intervala poverenja iznosi 77,7%.

#### 4.3.4 Povezanost PTEN statusa i BCSS

Na sledećem grafikonu su prikazane Kaplan-Maier krive preživljavanja specifičnog za karcinom dojke (BCSS) u obe podgrupe pacijentkinja u odnosu na PTEN status.



Grafikon 8. BCSS u podgrupama sa PTEN pozitivnim i PTEN negativnim tumorima

Iz grafikona 8 uočava se da je BCSS kraće u PTEN negativnoj podgrupi pacijentkinja u poređenju sa PTEN pozitivnom podgrupom .

Rezultati ispitivanja BCSS u odnosu na kategorije ekspresije PTEN proteina su prikazani u tabeli 24.

Tabela 24. BCSS u podgrupama sa PTEN pozitivnim i PTEN negativnim tumorima

Podgrupa	N	Medijana(godine)	95%CI	Log-rank test
PTEN pozitivni	15/45	NR	-	p=1,42x10 <sup>-14</sup>
PTEN negativni	17/19	6,6	4,9-9,3	

NR: medijana nije dostignuta za BCSS;

Sve pacijentkinje iz PTEN negativne grupe su umrle zbog raka dojke.

U sledećoj tabeli je prikazana kumulativna stopa BCSS u PTEN negativnoj i PTEN pozitivnoj podgrupi pacijentkinja.

Tabela 25. BCSS u PTEN negativnoj i PTEN pozitivnoj podgrupi

<b>Godina praćenja</b>	<b>Kumulativni % BCSS (95% CI)</b>	
	<b>PTEN -</b>	<b>PTEN+</b>
1. godina	94,7 (85,2-100)	100 (100)
2. godina	89,5 (76,7-100)	100 (100)
3. godina	89,5 (76,7-100)	97,8 (93,6-100)
4. godina	89,5 (76,7-100)	97,8 (93,6-100)
5. godina	63,2 (44,8-89,0)	97,8 (93,6-100)
10. godina	13,4 (3,7-47,5)	91,1 (83,2-99,8)
15. godina	-	82,2 (71,8-94,2)
20. godina	-	72,5 (60,3-87,1)
25. godina	-	64,2 (51,1-80,8)
29. godina	-	64,2 (51,1-80,8)

Iz tabele se može uočiti da su petogodišnje i desetogodišnje stope BCSS za 34,6% odnosno za 77,7% veće u PTEN pozitivnoj u poređenju sa PTEN negativnom podgrupom pacijentkinja. Od 15. godine prate se samo PTEN pozitivne pacijentkinje, s obzirom na to da su sve pacijentkinje u PTEN negativnoj podgrupi preminule od raka dojke.

Na kraju praćenja (29 godina) kumulativni procenat BCSS kod pacijentkinja sa PTEN pozitivnom ekspresijom proteina iznosi 64,2% a gornja granica odgovarajućeg 95% intervala poverenja iznosi 80,8%.

#### **4.4 Povezanost klasičnih faktora prognoze i ishoda bolesti**

Od značaja za ovo istraživanje bilo je ispitivanje povezanosti klasičnih prognostičkih faktora sa svim ispitivanim vremenima. Od klasičnih prognostičkih faktora evaluirani su:

- Životno doba ( $\leq 45$  godina prema  $> 45$  godina)
- Veličina tumora ( $< 2$  cm vs 2-5 cm prema  $> 5$ cm)
- Veličina tumora (T1+T2 prema T3)
- Nodalni status (N0 prema N1)
- ER sadržaj (ER $\leq 50$ fmol/mg prema ER $> 50$ fmol/mg)
- PgR sadržaj (PgR $\leq 50$ fmol/mg prema PgR $> 50$ fmol/mg)
- HR status (ER-/PgR+ prema ER+/PgR- prema ER+/PgR+)
- HR status (ER+/PgR+ prema ER-/PgR+ & ER+/PgR-)
- HER-2 status (CISH – prema CISH +)

Rezultati sprovedene analize prikazani su u narednim poglavljima.

##### **4.4.1 Povezanost klasičnih faktora prognoze sa DFS**

Univarijantnom analizom testirana je povezanost klasičnih faktora prognoze (životno doba, veličina tumora, nodusni status i status SR i HER-2) i DFS Log rank testom. Rezultati testiranja koje se odnose na DFS prikazani su u tabeli 26.

Tabela 26. Rezultati analize povezanosti klasičnih prognostičkih faktora i DFS

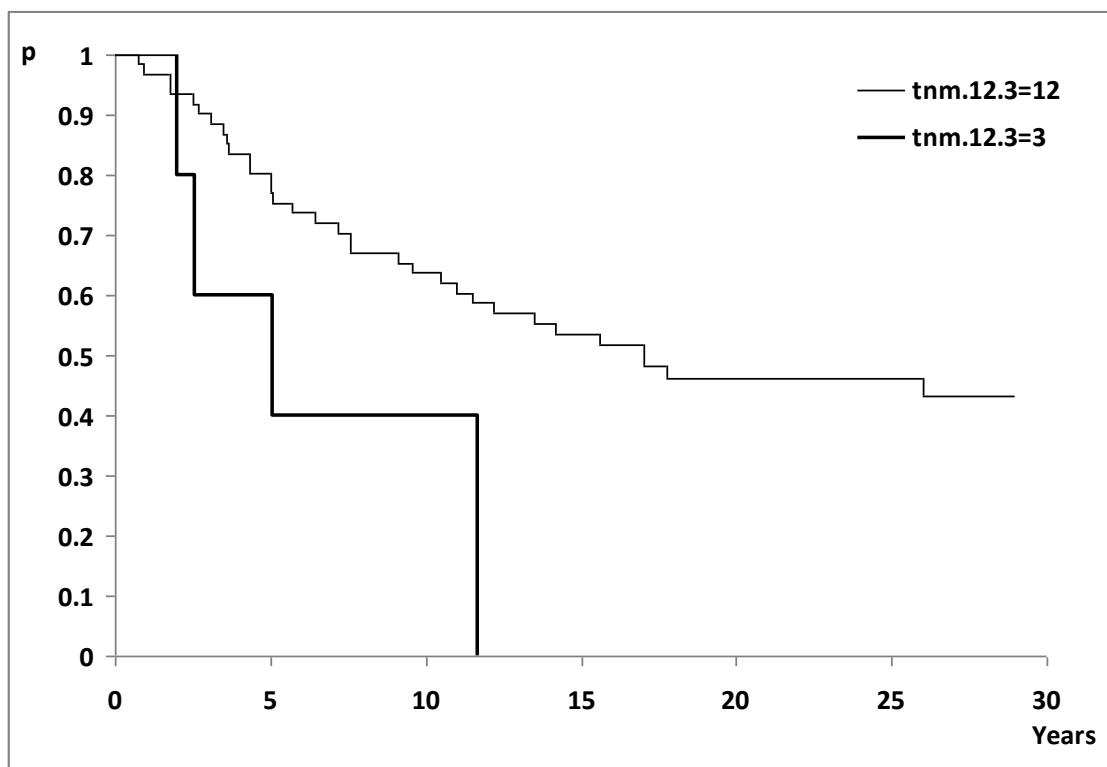
Prognostički faktor	N (%)	DFS (godine)	
		Medijana (95%CI)	Log Rank test
<i>Životno doba</i>			
• ≤45 godina	37 (51.52)	NR	$\chi^2_1=1.604$ p=0.19306
• > 45 godina	29 (48.48)	NR	
<i>Veličina tumora</i>			
• <2 cm	13 (19.7)	NR	$\chi^2_2=5.258$ p <sup>#</sup> =0.07214
• 2-5 cm	48 (72.73)	15,6 (≥10,5)	
• >5cm	5 (7.58)	5,1 (≥2,6)	
<i>Veličina tumora</i>			
• T1+T2	61 (92.42)	17 (≥11)	$\chi^2_1=4.84$ p=0.02781
• T3	5 (7.58)	5,1 (≥2,6)	
<i>Nodalni status</i>			
• N0	25 (37.88)	26 (≥13,5)	$\chi^2_1=1.377$ p=0.24066
• N1	41 (62.12)	11,6 (≥7,6)	
<i>ER sadržaj</i>			
• ER≤50fmol/mg	57 (86.36)	17 (≥11,5)	$\chi^2_1=2.183$ p=0.13955
• ER>50fmol/mg	9 (13.64)	7,2 (≥5,1)	
<i>PgR sadržaj</i>			
• PgR≤50fmol/mg	25 (37.89)	12,2 (≥7,6)	$\chi^2_1=0.573$ p=0.44915
• PgR>50fmol/mg	41 (62.11)	17(≥9,1)	
<i>HR status</i>			
• ER-/PgR+	15 (22.73)	NR	$\chi^2_2=1.265$ p <sup>#</sup> =0,53116
• ER+/PgR-	2 (3.17)	3,7(≥3,7)	
• ER+/PgR+	49 (74.1)	12,4 (≥9,1)	
<i>HR status</i>			
• ER+/PgR+	17 (25.9)	NR	$\chi^2_1=1.216$ p=0.27005
• ER-/PgR+ & ER+/PgR-	49 (74.1)	146 (≥109)	
<i>HER-2 status</i>			
• CISH -	56 (84.85)	204 (≥115)	$\chi^2_1=0.259$ p=0.61065
• CISH +	10 (15.15)	143 (≥109)	

<sup>#</sup>Bonferroni korekcija : 0.05/3=0.016: NR: nije dostignuta medijana DFS



Pacijentkinje sa T3 tumorima imaju značajno kraće preživljavanje u poređenju sa pacijentkinjama sa T1+T2 tumorima (Log-rank test,  $p=0.028$ ). Za ostale testirane klasične prognostičke parametre nije dobijena značajna razlika u DFS u našoj ispitivanoj grupi.

Na sledećem grafikonu se vide Kaplan-Maier krive za DFS prema veličini tumora u podgrupama sa veličinom tumora do 5 cm i većim od 5 cm.



Grafikon 9. DFS i T status (T1+T2 prema T3)

Postoji značajna razlika u preživljavanju bez znakova bolesti kod pacijentkinja sa tumorima do 5 cm i tumorima većim od 5 cm: pacijentkinje sa tumorima većim od 5cm (T3) imaju značajno kraće DFS u odnosu na pacijentkinje sa tumorima do 5cm (T1+T2) (Log-rank test,  $p=0.028$ ).

#### 4.4.2 Povezanost klasičnih faktora prognoze sa OS

Univarijantnom analizom testirana je povezanost klasičnih faktora prognoze (životno doba, veličina tumora, nodusni status i status SR i HER-2) sa OS Log rank testom. Rezultati testiranja koje se odnose na OS prikazani su u tabeli 27.

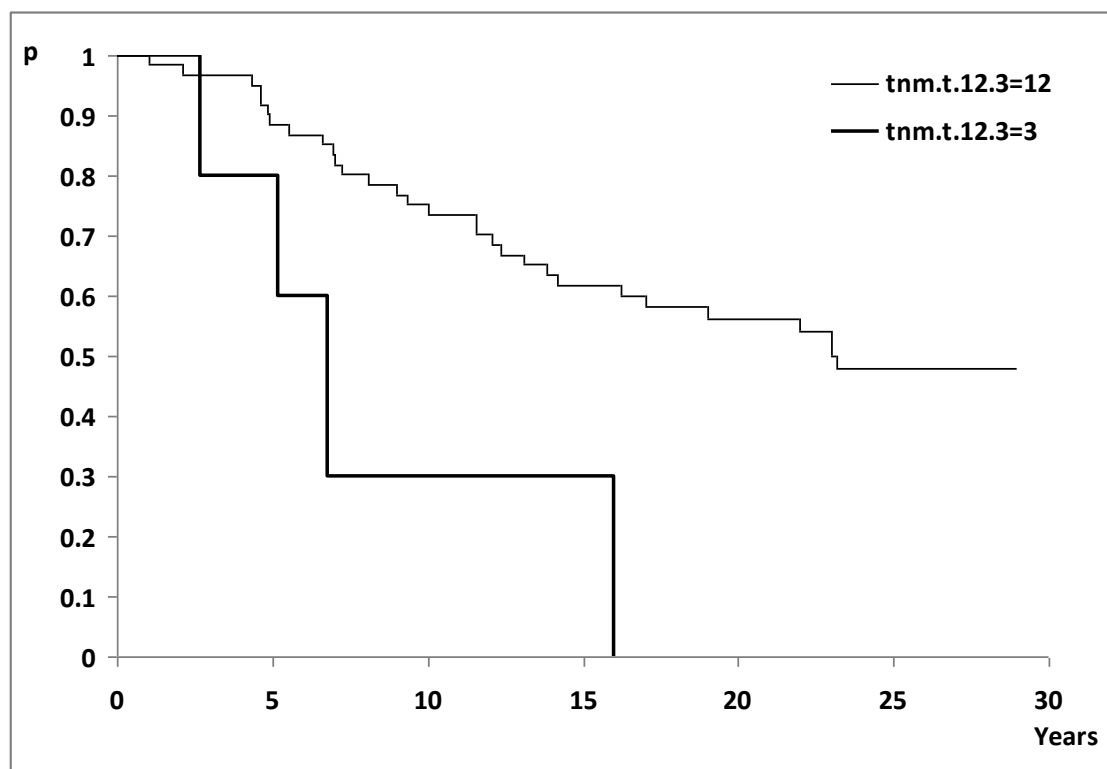
Tabela 27. Medijane, 95%CI i analiza povezanosti klasičnih prognostičkih faktora sa OS

Prognostički faktor	N (%)	OS (godine)	
		Medijana (95%CI)	Log Rank test
<i>Životno doba</i>			
• ≤45 godina	37 (56,06%)	NR	$\chi^2_1=0,741$ p=0.38923
• > 45 godina	29 (43,94%)	16,3 (≥12,1)	
<i>Veličina tumora</i>			
• <2 cm	13 (19,69%)	NR	$\chi^2_2=8,017$ p <sup>#</sup> =0.01711
• 2-5 cm	48 (72,75%)	23 (≥13,8)	
• >5cm	5 (7,56%)	6,7 (≥5,2)	
<i>T u TNM</i>			
• T1+T2	61 (92,42%)	23,2(≥16,1)	$\chi^2_1=7,971$ p=0,00475
• T3	5 (7,58%)	6,8 (≥5,2)	
<i>Nodalni status</i>			
• N 0	25 (37,88%)	NR	$\chi^2_1=2,725$ p=0,09879
• N1	41 (62,12%)	16 (≥11,6)	
<i>ER sadržaj</i>			
• ER≤50fmol/mg	57 (86,36%)	23,2 (≥17)	$\chi^2_1=3,14$ p=0.07614
• ER>50fmol/mg	9 (13,64%)	9,3 (≥7,3)	
<i>PgR sadržaj</i>			
• PgR≤50fmol/mg	25 (37,87%)	16 (≥12,3)	$\chi^2_1=1,598$ p=0.20623
• PgR>50fmol/mg	41 (62,13%)	NR	
<i>HR status</i>			
• ER-/PgR+	15 (22,76%)	NR	$\chi^2_2=3,642$ p <sup>#</sup> =0,16186
• ER+/PgR-	2 (3,03%)	9 (≥9)	
• ER+/PgR+	49 (74,21%)	14,3 (≥11,6)	
<i>HR status</i>			
• ER+/PgR+	49 (74,24%)	NR	$\chi^2_1=3,463$ p=0.06274
• ER-/PgR+ & ER+/PgR-	17 (25,76%)	14,2 (≥11,6)	
<i>HER-2 status</i>			
• CISH +	56 (84,85%)	23 (≥13,8)	$\chi^2_1=0,077$ p=0,78101
• CISH –	10 (15,15%)	19,6 (≥12,1)	

<sup>#</sup>Bonferroni korekcija : 0.05/3=0.0167; NR: nije dostignuta medijana OS

Pacijentkinje sa tumorima većim od 5 cm imaju značajno kraće OS u odnosu na pacijentkinje sa tumorima do 5 cm (Log-rank test,  $p=0,004$ ). Postoji trend ka značajno dužem OS pacijentkinja sa ER+/PgR+ tumorima u poređenju sa pacijentkinjama sa ER+/PgR- i ER-/PgR+ (Log-rank test,  $p=0,063$ ). Jedini faktor koji razdvaja podgrupe sa značajno različitim OS je PTEN status: (pacijentkinje sa PTEN negativnim tumorima imaju značajno kraće preživljavanje u odnosu na pacijentkinje sa PTEN pozitivnim tumorima).

Kaplan-Meier krive koje OS u podgrupama pacijenata sa T1+T2 i podgrupe sa T3 veličinom tumora prikazane su na grafikonu 10.



Grafikon 10. OS i T status (T1+T2 vs T3)

Postoji značajna razlika u ukupnom preživljavanju kod pacijentkinja sa tumorima do 5 cm i tumorima većim od 5 cm: pacijentkinje sa tumorima većim od 5 cm (T3) imaju značajno kraći OS u poređenju sa pacijentkinjama sa tumorima do 5 cm (T1+T2) (Log-rank test,  $p=0,004$ ).

#### 4.4.3 Povezanost klasičnih faktora prognoze sa BCSS

Univarijantnom analizom testirana je povezanost klasičnih faktora prognoze (životno doba, veličina tumora, nodusni status i status SR i HER-2) sa BCSS Log rank testom. Rezultati testiranja koje se odnose na BCSS prikazani su u tabeli 28.

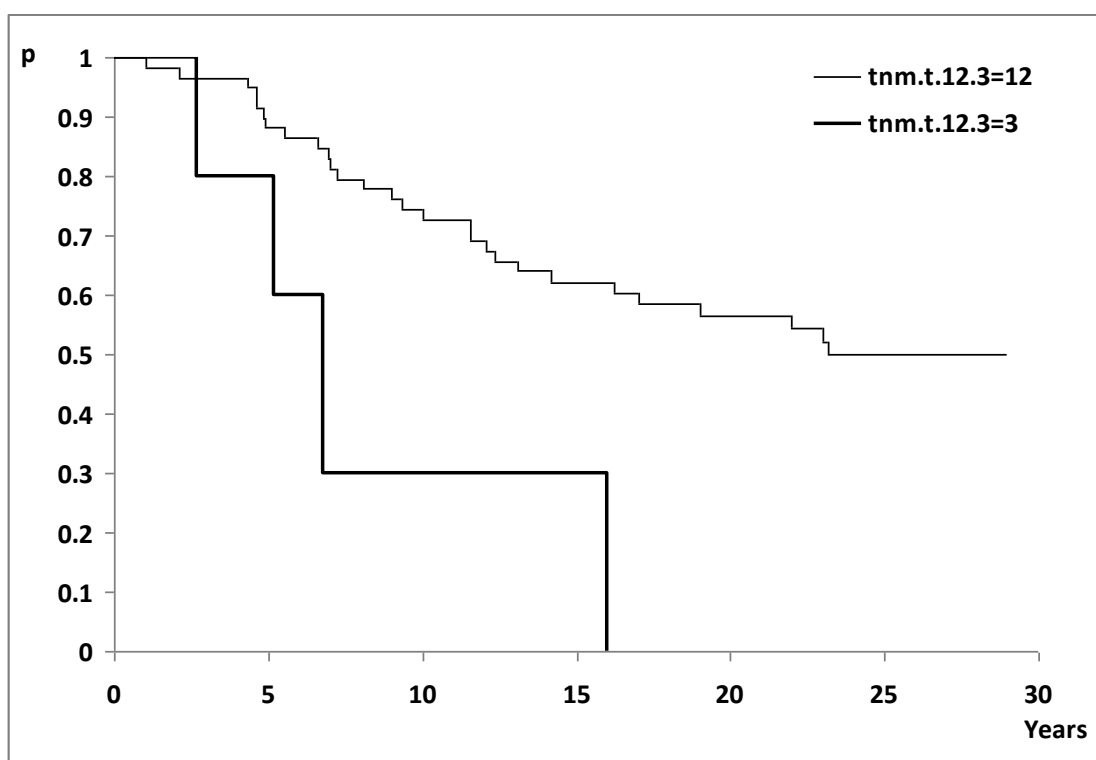
Tabela 28. Rezultati analize uticaja klasičnih prognostičkih faktora na BCSS

Prognostički faktor	N (%)	BCSS (godine)	
		Medijana (95%CI)	Log Rank test
<i>Životno doba</i>			
• ≤45 godina	35 (51,52%)	NR	$\chi^2_1=0,903$ p=0,34194
• > 45 godina	29 (48,48)	NR	
<i>Veličina tumora</i>			
• <2 cm	12 (18,75%)	NR	$\chi^2_2=8,017$ p <sup>#</sup> =0,01816
• 2-5 cm	48 (73,44%)	23 (≥14,3)	
• >5cm	5 (7,581%)	6,8 (≥5,2)	
<i>T u TNM</i>			
• T1+T2	59 (92,18%)	NR (≥16,3)	$\chi^2_1=7,81$ p=0,00519
• T3	5 (7,82%)	6,8 (≥5,2)	
<i>Nodalni status</i>			
• N 0	25 (39%)	NR	$\chi^2_1=2,404$ p=0,12101
• N1	39 (61%)	16 (≥11,6)	
<i>ER sadržaj</i>			
• ER≤50fmol/mg	55 (86,36%)	NR	$\chi^2_1=3,14$ p=0,07640
• ER>50fmol/mg	9 (13,64%)	9,3 (≥7,3)	
<i>PgR sadržaj</i>			
• PgR≤50fmol/mg	24 (37,5%)	16,3 (≥9)	$\chi^2_1=1,403$ p=0,23618
• PgR>50fmol/mg	41 (62,5%)	NR	
<i>HR status</i>			
• ER-/PgR+	15 (22,73%)	NR	$\chi^2_2=3,277$ p <sup>#</sup> =0,19425
• ER+/PgR-	2 (3,17%)	9 (≥9)	
• ER+/PgR+	47 (74,1%)	14,3 (≥11,6)	
<i>HR status</i>			
• ER+/PgR+	47 (74,1%)	NR	$\chi^2_1=3,1$ p=0,07831
• ER-/PgR+ & ER+/PgR-	17 (25,9%)	14,3 (≥11,6)	
<i>HER-2 status</i>			
• CISH -	54 (84,38%)	23 (≥14,2)	$\chi^2_1=0,099$ p=0,75271
• CISH +	10 (15,62%)	11,3 (≥12,1)	

<sup>#</sup>Bonferroni korekcija : 0,05/3=0,0167; NR: medijana BCSS nije dostignuta

Pacijentkinje sa tumorima većim od 5 cm imaju značajno kraće BCSS u odnosu na pacijentkinje sa tumorima do 5 cm (Log-rank test,  $p=0,00519$ ). Postoje trendovi ka značajno dužem BCSS pacijentkinja sa sadržajem  $ER \leq 50 \text{ fmol/mg}$  u poređenju sa pacijentkinjama sa sadržajem  $ER > 50 \text{ fmol/mg}$  i ka značajno dužem BCSS pacijentkinja sa fenotipom  $ER+/PgR+$  u odnosu na pacijentkinje sa fenotipom  $ER-/PgR+$  &  $ER+/PgR-$ .

Na sledećem grafikonu se vide Kaplan-Maier krive za BCSS prema veličini tumora u T1+T2 i T3 podgrupama.



Grafikon 11. BCSS i T status(T1+T2 vs T3)

Uočava se da podgrupa sa T3 veličinom tumora ima lošije BCSS od podgrupe bolesnika sa T1+T2.

Pacijentkinje sa tumorima većim od 5 cm imaju značajno kraće BCSS u odnosu na pacijentkinje sa tumorima do 5cm.

Ekspresija PTEN proteina je faktor koji deli pacijentkinje na dve grupe sa značajnom razlikom u BCSS: podgrupa sa PTEN negativnim statusom ima značajno

kraće BCSS u poređenju sa podgrupom sa PTEN pozitivnim statusom, što je detaljno opisano u poglavlju IV 3.4 rezultata (grafikon 8)

Postoji trend ka dužem preživljavanju pacijentkinja sa ER+/PgR+ tumorima dojke u odnosu na pacijentkinje sa ER-/PgR+ i ER+/PgR- tumorima.

Za ostale testirane klasične prognostičke parametre nije potvrđena značajna razlika u BCSS u ispitivanoj grupi.

#### **4.5 Univarijanta Cox-ova regresiona analiza za sva ispitivana vremena**

Od interesa za ovo istraživanje bilo je da se uradi Cox regresiona analiza. Cox-ova regresiona analiza za DFS i OS urađena je nad grupom od 66 pacijentkinja koje imaju sve potrebne podatke, osim za BCSS gde je ispitivanje urađeno nad grupom od 64 pacijentkinje. Evaluirane su sledeće varijable:

1. Starost (kategorije: starost > 45 god. prema starost  $\leq$  45 god)
2. T status u TNM klasifikaciji (kategorije: T2 prema T1; T3 prema T1)
3. T status u TNM klasifikaciji (kategorije: T2+T3 prema T1)
4. T status u TNM klasifikaciji (kategorije: T3 prema T1+T2)
5. N status u TNM klasifikaciji (kategorije: N1+N2 prema N0)
6. Sadržaj ER u fmol/mg proteina (kategorije: ER > 50 prema ER  $\leq$  50)
7. Fenotip ER/PgR (kategorije: ER+/PR+ prema (ER-/PR+ ili ER+/PR-))
8. Ekspresija PTEN proteina (kategorije: PTEN negativne prema PTEN pozitivne)
9. HER-2 status (kategorije: CISH + prema CISH -).

Rezultati sprovedene analize prikazani su u narednim poglavljima.

#### 4.5.1 Rezultati Cox-ove regresione analize za DFS

U Tabeli 29. su prikazani rezultati Cox-ove univarijantne regresione analize za DFS.

Tabela 29. Univarijantna Cox-ova regresiona analiza za DFS

Karakteristike	Univarijantna Cox-ova analiza za DFS	
	HR (95%)	Likelihood ratio test
<i>Starost</i>		
• >45 : ≤45 god	1,53 (0,8-2,94)	p=0,197
<i>T u TNM</i>		
• T2 : T1	1,35 (0,56-3,28)	p=0,148
• T3 : T1	3,97 (1,08-14,52)	
<i>T u TNM</i>		
• T2+T3:T1	1,46 (0,61-3,52)	p=0,37
<i>T u TNM</i>		
• T3:T1+T2	3,11 (1,07-9,04)	p=0,067
<i>N u TNM</i>		
• N poz : N neg	1,51 (0,76-3,01)	p=0,23
<i>Sadržaj ER</i>		
• ER>50 : ER≤50	1,86 (0,81-4,27)	p=0,17
<i>Fenotip ER/PgR</i>		
• ER+/PgR+ : (ER-/PgR+) & (ER+/PgR-)	1,55 (0,71-3,39)	p=0,26
<i>PTEN ekspresija</i>		
• PTEN- : PTEN+	8,64 (4,08-18,29)	p=5,48x10 <sup>-8</sup>
<i>HER -2 status</i>		
• CISH+ : CISH-	1,23(0,54-2,82)	p=0,62

Od svih ispitivanih faktora statistička značajnost je potvrđena samo za kategoriju ekspresija PTEN proteina (pacijenti bez ekspresije PTEN proteina imaju 8,6 puta veći rizik za relaps bolesti u odnosu na pacijentkinje sa prisutnom ekspresijom ovog proteina).

#### 4.5.2 Rezultati Cox-ove regresione analize za OS

U Tabeli 30. su prikazani rezultati Cox-ove univarijantne regresione analize za OS.

Tabela 30. Univarijantna Cox-ova regresiona analiza za OS

Karakteristike	Univarijantna Cox-ova analiza za OS	
	HR (95%)	Likelihood ratio test
<i>Starost</i>		
• >45 : ≤45 god	1,34 (0,68-2,64)	p=0,394
<i>T u TNM</i>		
• T2 : T1	1,21 (0,49-2,97)	p=0,078
• T3 : T1	1,89 (1,32-18,04)	
<i>T u TNM</i>		
• T2+T3:T1	1,35 (0,55-3,25)	p=0,49
<i>T u TNM</i>		
• T3:T1+T2	4,19 (1,42-12,39)	p=0,027
<i>N u TNM</i>		
• N poz : N neg	1,85 (0,88-3,88)	p=0,09
<i>Sadržaj ER</i>		
• ER>50 : ER≤50	2,09 (0,90-4,87)	p=0,11
<i>Fenotip ER/PgR</i>		
• ER+/PgR+ : (ER-/PgR+) & (ER+/PgR-)	2,26 (0,93-5,48)	p=0,049
<i>PTEN ekspresija</i>		
• PTEN- : PTEN+	17,23 (7,11-41,74)	p=1,51x10 <sup>-10</sup>
<i>HER -2 status</i>		
• CISH+ : CISH-	1,14 (0,47-2,75)	p=0,78

Od svih ispitivanih faktora statistička značajnost potvrđena je samo za kategorije ER/PgR fenotipa (pacijentkinje sa ER+/PgR+ fenotipom imaju 2,26 puta veći rizik od smrtnog ishoda u odnosu na pacijentkinje sa ER+/PgR-&ER-/PgR+ fenotipom), ekspresije PTEN proteina (pacijentkinje bez ekspresije PTEN imaju 17,23 puta veći rizik od smrtnog ishoda u odnosu na pacijentkinje sa PTEN pozitivnom ekspresijom) i T statusa (pacijentkinje sa tumorima većim od 5cm, T3 tumorima, imaju 4,19 puta veći rizik od smrtnog ishoda u odnosu na pacijentkinje sa tumorima manjim od 5cm, od T1 + T2 tumorima).



#### 4.5.3 Rezultati Cox-ove regresione analize za BCSS

U Tabeli 31. su prikazani rezultati Cox-ove univarijantne regresione analize za BCSS.

Tabela 31. Univarijantna Cox-ova regresiona analiza za BCSS

Karakteristike	Univarijantna Cox-ova analiza za BCSS	
	HR (95%)	Likelihood ratio test
<i>Starost</i>		
• >45 : ≤45 god	1,40 (0,69-2,81)	p=0,34
<i>T u TNM</i>		
• T2 : T1	1,26 (0,48-3,33)	p=0,08
• T3 : T1	5,04 (1,3-19,47)	
<i>T u TNM</i>		
• T2+T3:T1	1,41 (0,54-3,67)	p=0,46
<i>T u TNM</i>		
• T3:T1+T2	4,16 (1,40-12,34)	p=0,028
<i>N u TNM</i>		
• N poz : N neg	1,79 (0,85-3,8)	p=0,11
<i>Estrogen</i>		
• ER>50 : ER≤50	2,11 (0,90-4,93)	p=0,11
<i>Estrogen i progesteron status</i>		
• ER+/PgR+ : (ER-/PgR+) & (ER+/PgR-)	2,18 (0,89-5,23)	p=0,06
<i>PTEN ekspresija</i>		
• PTEN- : PTEN+	17,59 (7-43,79)	p=1,96x10 <sup>-10</sup>
<i>HER -2 status</i>		
• CISH+ : CISH-	1,16 (0,47-2,82)	p=0,75

Od svih ispitivanih faktora statistička značajnost potvrđena je za kategoriju T status u TNM (pacijentkinje sa tumorima većim od 5cm imaju 4,16 puta veći rizik od smrtnog ishoda od raka dojke u odnosu na pacijentkinje sa tumorima manjim od 5cm) i za ekspresiju PTEN proteina (pacijentkinje bez ekspresije PTEN proteina imaju 17,6 puta veći rizik od smrtnog ishoda zbog raka dojke u odnosu na pacijentkinje sa prisutnom ekspresijom ovog proteina).

## 5. DISKUSIJA

Karcinomi dojke sa HR-pozitivnim statusom čine najveću podgrupu karcinoma dojke, bez obzira na životnu dob pacijentkinja, odnosno njihov menopauzni status. Iako procenat HR-pozitivnih karcinoma dojke raste sa starošću pacijentkinja, poznato je da je i kod premenopauznih žena, uključujući i one mlađe od 40 godina, luminalni podtip karcinoma dojke zastupljen u oko 60% slučajeva. [69,6] Zbog toga HT predstavlja terapiju izbora za većinu pacijentkinja sa dijagnozom raka dojke [124-126].

Tamoxifen je doskora bio hormonska terapija izbora za premenopauzne žene. [127]. Prema ranije objavljenoj meta analizi iz 2011. godine [59], 5-godišnja primena tamoksifena redukuje rizik od relapsa karcinoma dojke i smrtnog ishoda za 40%, nezavisno od menstrualnog statusa, godina života, nodusnog statusa ili adjuvantne hemioterapije. Ovaj efekat leka se održava i posle prekida uzimanja tamoksifena i nastavlja se i posle 10 godina od prekida terapije [128], čak i kod bolesnica sa granično pozitivnim ER (10-19 fmol/mg).

Dalji pomak u lečenju hormono terapijom su dala saznanja ATLAS studije iz 2013. godine koja je pokazala da nastavak Tamoksifena od 10 godina dodatno značajno smanjuje 15-godišnji mortalitet od karcinoma dojke za 3% i 15godišnju stopu relapsa karcinoma dojke za 4% kod ER-receptor pozitivnih bolesnica, sa naglaskom na premenopauzne pacijentkinje koje su imale naročito veliku korist od produžetka tamoksifena. [43,129,130]. Rezultati ATOM studije potvrdili su da 10-godišnja u poređenju sa 5-godišnjom adjuvantna primena tamoksifena redukuje rizik od relapsa karcinoma dojke u periodu od 7. do 9. godine [HR 0,84 (95%CI 0,73-0,95)] i posle 10. godine [HR 0,75 (95%CI 0,66-0,86)], kao i rizik od smrtnog ishoda posle 10. godine [(HR 0,86 [95%CI 0,75-0,97)] [131]. Kombinovanjem sličnih rezultata ATOM i ATLAS studija dobija se još veća statistička značajnost koristi od primene 10 godina Tamoxifena u smislu smanjenja relapsa bolesti ( $p < 0,0001$ ), mortaliteta zbog karcinoma dojke ( $p = 0,002$ ) i ukupnog preživljavanja ( $p = 0,005$ ).

Iako je ovarijalna ablacija najstariji oblik sistemskog lečenja karcinoma dojke kod mladih žena i u upotrebi je preko stotinu godina, prvi rezultati ispitivanja efikasnosti ovarijalne ablacije na OS i DFS pacijentkinja sa karcinomom dojke pojavili su se tek 1998. godine u meta analizi grupe istraživača „*Early Breast Cancer Trialists*’

*Collaborative Group*'' [57]. U ovo ispitivanje uključeno je ukupno 13 studija koje su ispitivale efikasnost ovarijalne ablacije (bilo da je ona postignuta hiruškim putem, bilo putem ozračivanja jajnika) i 4 studije koje su ispitivale ovarijalnu supresiju. Cilj ispitivanja bio je da se na 2102 pacijentkinja starosne dobi ispod 50 godina ispita uticaj estrogene deprivacije na ishod bolesti. Kontrolna grupa su bile bolesnice koje nisu bile podvrgnute ovakvom lečenju. Rezultati su jasno pokazali da je stopa 15-godišnjeg preživljavanja bez relapsa bolesti (45,0% vs. 39,0%, Log Rank Test,  $p=0,0007$ ), kao i 15-godišnjeg ukupnog preživljavanja (52,4% vs. 46,1%, Log Rank Test,  $p=0,001$ ) značajno bolje kod pacijentkinja koje su lečene adjuvantnom estrogenom deprivacijom u odnosu na nelečne pacijentkinje.

Naši rezultati uklapaju se u prethodno navedene, što ukazuje na to da je naš uzorak analiziranih pacijentkinja reprezentativan (meta analiza urađena je na osnovu podataka dobijenih od više od 2000 pacijentkinja). U našoj grupi premenopauznih pacijentkinja koje su lečene adjuvantnom kastracijom nakon 17 godina praćenja, stopa bez relapsa bolesti iznosila je 44%, a stopa preživljavanja 48%. U našoj analizi u definiciju relapsa bolesti ušla je i pojava primarnog tumora drugog organa koja je zabeležena u 2/66 (3%) pacijentkinje, što bi značilo da je stopa preživljavanja bez relapsa raka dojke iznosila 47%.

Odgovor na pitanje da li dodavanje adjuvantne ovarijalne supresije tamoksifenu donosi i dodatnu korist premenopauznim pacijentkinjama sa ranim luminalnim karcinomima dojke dala je SOFT studija. Studija je započela sa regrutovanjem pacijentkinja 2003. godine koje su bile randomizovane u tri grane: a) tamoksifen, b) LHRH agonist triptorelin i tamoksifen i c) triptorelin i inhibitor aromataze egzemestan u ukupnom trajanju od 5 godina [42]. Rezultati su pokazali da dodavanje ovarijalne supresije tamoksifenu značajno ne utiče na ishod lečenja ovih pacijentkinja. Stopa petogodišnjeg preživljavanja bez pojave raka dojke (engl. *Breast Cancer-Free Survival*) bila je visoka u sve tri grane: a) u grani sa tamoksifenom 95,8%, b) u grani sa triptorelinom i tamoksifenom 95,1% i c) u grani sa triptorelinom i eksemestanom 97,1%, bez značajne razlike između terapijskih grana. Pre uključanja u studiju, adjuvantnu hemioterapiju primalo je 53% pacijentkinja, a 35% pacijentkinja imalo je nodus pozitivnu bolest. Kada su se posmatrale odvojene podgrupe pacijentkinja podeljene prema prethodnoj primeni hemioterapije, dobijeni su isti rezultati: dodavanje LHRH

agonista tamoksifenu ne doprinosi poboljšanju ishoda lečenja ni u grupi koja nije lečena adjuvantnom hemioterapijom. Međutim, treba naglasiti da su pacijentkinje u podgrupii bez hemiotrapije imale bolje prognostičke faktore: 90% je bilo starije od 40 godina, 90% je imalo nodus negativnu bolest, 85% je imalo tumore do 2 cm, 90% gradus tumora 1/2. Takođe, nije bilo razlike u 5-godišnjoj stopi ukupnog preživljavanja između terapijskih grana. Ova studija je pokazala da razlika postoji u terapijskom efektu kod pacijenktinja sa većim rizikom od progresije bolesti: što je veći rizik, to je i najveća korist od dodavanja triptorelina eksemestanu, a potom od dodavanja triptorelina tamoksifenu u poređenju sa tamoksifenom.

Združeni rezultati SOFT i TEXT studija [41] pokazali su da je grana sa triptorelinom i eksemestanom značajno redukuje stopu relapsa karcinoma dojke u poređenju sa kombinacijom triptorelina i tamoksifena [HR 0,66 (95%CI 0,55-0,80,  $p < 0,001$ )] u premenopauznih pacijenktinja sa HR-pozitivnim karcinomima dojke (u ovoj studiji 44% bolesnica nije primalo adjuvantnu hemioterapiju). Stopa 5-godišnjeg preživljavanja iznosila je 4,1% u celokupnoj grupi analiziranih paijenktinja u obe studije.

Rezultati TEXT [41] and SOFT [42] studija potvrdili su rezultate ABCSCG-12 (*The Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group*) studije iz 2011. godine u kojoj su premenopauzne bolesnice sa ranim HR-pozitivnim karcinomima dojke randomizovane u dve grane: a) LHRH agonist goserelin i tamoksifen i b) goserelin i inhibitor aromataze anastrozol sa ili bez primene zolendronične kiseline [132,133]. Sve pacijentkinje primale su ET u trajanju od 3 godine, a 95% pacijentkinja nije lečeno adjuvantnom hemioterapijom, uprkos tome što 30% pacijenktinja imalo nodus-pozitivnu bolest, a 20% gradus 3 tumora. Stopa petogodišnjeg relapsa bolesti u granama sa tamoksifenom i anastrozolum bila je 9,8% i 10,7% (bez značajne razlike, ukupno 10,7%). U finalnoj analizi ABCSCG studije načinjene nakon 94.5 meseci praćenja potvrđeno da nije bilo značajne razlike u DFS između pomenutih terapijskih grupa i da je stopa ukupnog preživljavanja iznosila 95% [40].

U našoj grupi pacijentkinja 5-godišnja i 10-godišnja stopa relapsa bolesti iznosile su 24,2% i 38,3%, a 5-godišnje i 10-godišnje stope smrtnog ishoda iznosile su 12,1% i 29,3%. Ove stope su više kod naših pacijentkinja nego u tri gore navedene studije, a razlog može biti u razlici u prognostičkim faktorima (u našoj grupi pacijentkinja više od 90% je imalo nodus pozitivnu bolest) i razlici u primenjenoj terapiji (nijedna

pacijentkinja u našoj analizi nije primala ni tamoksifen, niti inhibitore aromataze, niti hemioterapiju). Ovo ide u prilog tome da je ovarijalna ablacija kao jedina adjuvantna ET nedovoljno efikasna za većinu premenopauzних pacijentkinja, naročito ako imaju nodus-pozitivnu bolest, što je navedeno u svim vodičima za lečenje raka dojke [28].

Iz literaturnih podataka danas je dobro poznato da se više od polovine relapsa bolesti kod ER pozitivnog ranog karcinoma dojke pojavljuju posle više od 5 godina od postavljanja dijagnoze i radikalne hirurgije. Skorašnje objavljeni rezultati EBCTCG analize 20-godišnjeg rizika razvoja udaljenih metastaza karcinoma dojke posle prestanka hormono terapije koja je davana 5 godina, pokazala je da je kumulativna incidenca relapsa karcinoma dojke najviše zavisi od inicijalnog TN statusa [87]. Ova meta analiza urađena je na uzorku od preko 60000 pacijentkinja koje su bile uključene u randomizovane studije. Zajedničko za sve je da su sve imale ER-pozitivni rak dojke i da su sve bile lečene 5-godišnjom adjuvantnom primenom tamoksifena. Neke od njih su primale i adjuvantnu hemioterapiju i za manji broj ovih pacijentkinja urađen je HER2 status i Ki67 proliferativni indeks. U 15-godišnjem periodu od završetka adjuvantne ET kumulativna incidenca udaljenog relapsa raka dojke zabeležena je u 13% pacijentkinja sa inicijalnim T1N0 stadijumom bolesti i u 41% onih sa inicijalnim T2N4-9 (4-9 zahvaćenih limfnih čvorova) od 41% udaljenih relapsa. Gradus tumora i Ki67 indeks je imao samo umerenu prognostičku vrednost za razvoj udaljenog relapsa, dok PgR vrednost i HER2 status nisu bili od prognostičkog značaja.

Ako naše rezultate stavimo u kontekst svih rezultata prethodno navedenih studija, može se reći da premenopauzne hormon receptor pozitivne bolesnice sa ranim karcinomom dojke žive dugo lečene samo OA i bez primene adjuvantne hemioterapije. U našoj analizi, kumulativna stopa DFS na kraju intervala praćenja (29 godina) iznosi 40,8% sa gornjim 95% intervalom poverenja od 55,7%, a 29- godišnja stopa ukupnog preživljavanja iznosi 45,1% sa gornjom granicom 95% intervala poverenja od 59,7%. Ovi rezultati ukazuju na to da je moguće da se ni nakon 30 godina od dijagnoze ranog HR-pozitivnog karcinoma dojke kod premenopauzних pacijentkinja lečenih adjuvantnom primenom OA ne dostigne medijana DFS i OS.

U svetlu svih kliničkih studija koje su ispitivale estrogenu deprivaciju i naših rezultata postoji dilema da li je adjuvantna OA efikasnija od OvS u ovoj grupi pacijentkinja. Efikasnost OA (ovarietomija ili zračna kastracija) i OvS (medikalna

ovarijalna supresija primenom LHRH agonista) nije nikada i neće nikada biti direktno poređena u randomizovanim kliničkim studijama koje ispituju adjuvantne terapijske režime. [134]. Ispitivanja koja su rađena u populaciji pacijentkinja sa HR-pozitivnim metastatskim karcinomima dojke utvrđeno je da je OvS jednako efikasna kao i OA [135,136]. Međutim, OA u mlađih žena, naročito mlađih od 40 godina, ima za posledicu ranu menopauzu sa svim kasnim neželjenim efektima do koje dovodi (povišenje holesterolemije i povećanja rizika od arterioskleroze, uključujući koronarnu bolest i infarkt miokarda, zatim povećani rizik od infarkta mozga, osteoporoze i osteoporotične frakture kostiju, fatalne masne embolije). Zbog toga se danas OA ne preporučuje u adjuvantnom lečenju ove kategorije premenopauznih žena. OA se nudi umesto OvS „starijim“ premenopauznim pacijentkinjama, naročito starijim od 45 godina jer ulazak u menopauzu u tim godinama ne predstavlja ranu menopauzu, a može biti konformnija jer se izbegava ponavljano davanje LHRH agonista u obliku injekcija u intervalu od 3-5 godina.

Prognostički faktor diferencira pacijente sa dobrom prognozom od pacijenata sa lošom prognozom, nezavisno od primenjene terapije [137,138]. Prognostička vrednost nekog markera u ranom karcinomu dojke ispituje se u populaciji pacijentkinja koje su podvrgnute lokoregionalnoj terapiji (radikalni hirurški zahvat sa ili bez postoperativne RT), ali nisu primale adjuvantnu sistemsku terapiju [139]. Dobro je poznato da su ER i HER2 status prognostički faktori (pozitivni ER status je relativno slab faktor dobre prognoze, dok je pozitivan HER2 status faktor loše prognoze) [140].

Prediktivni faktor označava relativnu osetljivost ili rezistenciju na lečenje. To znači da u odsustvu specifične terapije prisustvo prediktivnog faktora ne bi trebalo da ima uticaja na ishod bolesti, ali razlika se pojavljuje u prisustvu specifične terapije za koju marker predviđa osetljivost ili rezistenciju [101,141]. Ispitivanje prediktivne vrednosti nekog faktora podrazumevalo bi da se na osnovu prisustva ispitivanog faktora pacijenti randomizuju na dve terapijske grane od kojih jedna sadrži, a druga ne sadrži ispitivani lek na koji se ispituje prediktivna vrednost markera. Primeri za to u karcinomu dojke predstavljaju studije koje su ispitivale prognostička i prediktivna vrednost uPA/PAI-1 biomarkera [142] i HER2 statusa [60-62]. U karcinomu dojke status ER i HER2 istovremeno su i prognostički i prediktivni markeri odgovora na ET, odnosno na

biološku HER2 usmerenu terapiju. Zbog toga je određivanje ER i HER2 statusa obavezno u donošenju odluke o vrsti sistemske terapije kod karcinoma dojke.

U našoj grupi ispitivanih pacijentkinja sa HR-pozitivnim karcinomima dojke lečenih adjuvantnom ET, retrospektivno ispitivanje različitih markera može da ukaže na njihov prognostički značaj u ovoj grupi. Tako smo u ranijoj analizi ispitivali prognostički značaj HER2 statusa unutar ove iste grupe pacijentkinja [143]. Naše prethodno istraživanje uticaja HER2 statusa (određen CISH analizom koja meri amplifikaciju HER2 gena) na ishod bolesti u istoj grupi pacijentkinja, urađeno nakon medijane praćenja od 12 godina, nije pokazalo da je HER2 pozitivni status bio udružen sa višom stopom relapsa [143,144], što znači da pacijentkinje sa luminalnim HER2-pozitivnim tumorima nisu imale lošiji ishod bolesti u odnosu na pacijentkinje sa luminalnim HER2-negativnim tumorima. Međutim, naše istraživanje je pokazalo da su u podgrupi sa relapsom raka dojke, pacijentkinje sa luminalnim HER2-pozitivnim tumorima imale značajno duži interval do pojave relapsa u odnosu na pacijentkinje sa luminalnim HER2-negativnim tumorima [mediana 11 godina (95%CI 1,8 – 17,8) prema medijana 4,5 godina (95%CI 0,5 – 15,6), Mann-Whitney Exact Test,  $p=0,049$ ], ali nije zabeležena razlika u ukupnom preživljavanju između ove dve podgrupe. Ovaj rezultat ide u prilog tome da je estrogena deprivacija naročito efikasna u luminalnom HER2-pozitivnom podtipu karcinoma dojke u svetlu novih istraživanja na osnovu kojih je ovaj podtip karcinoma dojke identifikovan i specifičan, kako po svojoj prognozi, tako i po osetljivosti na ET [145].

Nakon 17 godina praćenja, ponovo smo ispitali klasične prognostičke faktore i njihovu udruženost sa ishodom lečenja. Ispitali smo životno doba (mlađe od 45 godina prema starije od 45 godina), veličinu tumora (jednako i manje od 2 cm, veći od 2cm i manji od 5 cm i jednaki i veći od 5 cm), nodusni status (nodus-negativne prema nodus-pozitivne), sadržaj ER (jednaki i manji od 50 fmol/mg proteina prema veći od 50 fmol/mg proteina) i HR fenotip (ER-poz/PgR-poz prema ER-poz/PgR-neg i ER-neg/PgR-poz) i HER2 status (CISH-poz prema CISH-neg). Gradus tumora nije uzet u obzir jer mali broj pacijentkinja sa tumorima gradusa 1 i 3, tako da analiza nije moguća. Ni za jedan od navedenih faktora nije jasno pokazano da su povezani sa ishodom lečenja. Takođe, urađena je i univarijantna analiza svih pomenutih faktora. Pokazan je trend ka lošijem ishodu bolesti kod pacijentkinja sa tumorima većim od 5 cm u odnosu

na pacijentkinje sa tumorima veličine do 5 cm: a) postoji 3 puta veći rizik od pojave događaja koji definišu DFS [HR 3,11 (95%CI 1,07-9,04), Likelihood ratio test, p=0,067], b) postoji 4 puta veći rizik od smrtnog ishoda bez obzira na njen uzrok [HR 4,19 (95% CI 1,42-12,39, Likelihood ratio test, p=0,027] ic) postoji 4 puta veći rizik od smrtnog ishoda zbog raka dojke [HR 4,16 (95% CI 1,40-12,34, Likelihood ratio test, p=0,028]. Trend ka dužem ukupnom preživljavanju zabeležena je kod pacijentkinja sa ER-poz/PgR-poz tumorima u odnosu na druga dva ER/PgR fenotipa [HR 2,26 (95%CI 0,93-5,48, Likelihood ratio test, p=0,049]. Međutim, kako su intervali poverenja veoma široki, pouzdanost dobijenih rezultata je manja, te ne možemo zaključiti da ovi faktori imaju statistički značajan uticaj na ishod lečenja u našoj grupi pacijentkinja,

Prema ekspresiji PTEN proteina naša ispitivana grupa pacijentkinja podeljena je na podgrupu bez ekspresije PTEN proteina (PTEN-negativna) i na podgrupu sa prisutnom ekspresijom PTEN proteina (PTEN-pozitivna). Verifikovali smo 29% pacijentkinja bez ekspresije PTEN proteina. U prethodnom istraživanju sprovedenom u grupi pacijentkinja sa ranim karcinomima dojke, koje su imale identične faktore rizika kao naša grupa ispitanica, osim što su sve bile postmenopauzne i lečene su samo adjuvantnom primenom tamoksifena, pokazano da je gubitak ekspresije PTEN proteina u postmenopauznoj grupi pacijentkinja bio zabeležen kod 32% pacijentkinja. [118]. Naši rezultati se uklapaju sa podacima iz literature da je odsustvo PTEN ekspresije zabeleženo u 28%-48% pacijentkinja sa karcinomima dojke [115,106,146,141]. Mogući razlozi za različite rezultate u vezi sa brojem pacijentkinja sa karcinomima dojke kod kojih je zabeležen gubitak ekspresije PTEN proteina su: a) mali broj pacijentkinja u ispitivanim grupama, što je i kod nas slučaj, b) različita metodologija određivanja i nedostatak standardizovanog tumačenja PTEN ekspresije, c) dihotomna podela na pozitivan i negativan status može biti insuficijentna u ispitivanju prognostičkog značaja PTEN ekspresije.

Do sada još uvek nije prihvaćen konsenzus o načinu interpretacije ekspresije PTEN proteina u ćeliji, tj. još uvek ne postoje tačno definisana granične vrednosti koja razdvaja pozitivne od negativnih vrednosti. U literaturi se koriste različite skale intenziteta imunoreaktivnog bojenja, različiti imunohistohemijski skorovi i njihove modifikacije. U našoj studiji koristili smo jednu od već korišćenih metoda određivanja PTEN statusa, tj. semikvantitativnu metodu interpretacije PTEN ekspresije baziranu na



bodovnom sistemu koji sabira procenat obojenih malignih ćelija i intenzitetu njihovog bojenja [147,122]. Analogno podacima iz literature, kao internu pozitivnu kontrolu, u cilju pravilne interpretacije bojenja, koristili smo imunoreaktivnost okolnog zdravog tkiva dojke, tj. epitel duktusa, fibroците, nerve ili ćelije endotela [147,122,148]

Prilikom patohistološke analize imunohistohemijske ekspresije PTEN proteina, uočeno je da je u većini karcinoma imunoreaktivnost prisutna ili pretežno u citoplazmi ili pretežno u nivou jedra, a ređe da je istovremeno prisutna i u jedrima i u citoplazmi. Zapaženo je da distribucija obojenosti kao i intenzitet bojenja mogu biti različiti u jednom istom tumoru, što ukazuje na postojanje heterogenosti samih malignih ćelija unutar istog tumora.

Jedna grupa autora zalaže se za usavršavanje kvaliteta semikvantitativnog skorovanja PTEN ekspresije, s obzirom na to da je pravilna procena količine detektabilnog PTEN proteina u tumorskim ćelijama, a koja se određuje na osnovu intenziteta bojenja, od značaja za prognozu bolesti kao i kvalitet ćelija koje ekspimiraju bilo koju količinu proteina. Jedno od pitanja koje je nedovoljno razjašnjeno, upravo je subjektivna procena intenziteta bojenja, kao i poređenje intenziteta bojenja malignih ćelija sa intenzitetom bojenja okolnih zdravih struktura (epitel duktusa, fibroцитi, nervi, ćelije endotela). Upravo iz tih razloga postoji druga grupa autora koja smatra da bi bilo bolje svesti subjektivnu procenu intenziteta bojenja samo na pozitivnu, odnosno negativnu ekspresiju proteina [149].

Takođe, upotreba različitih antigena u različitim studijama može da bude uzrok postojanja razlika u učestalosti redukovane ekspresije PTEN proteina [150]. Moguće je da IHH metoda postane optimalni metod za evaluaciju funkcionalnog statusa PTEN gena, ukoliko se izvrši adekvatna standardizacija procene imunoekspresije.

Smanjena ekspresija PTEN proteina je najčešće uzrokovana poremećajem na nivou gena. Gubitak funkcije PTEN gena nastaje zbog mutacija, delecija ili hipermetilacije promotornog gena [151]. Gubitak heterozigotnosti PTEN gena (*engl. Loss of heterozygosity – LOH*) jedan je od najčešćih uzroka gubitka PTEN aktivnosti i prisutan je u 30% do 40% karcinoma dojke [152-154], dok su mutacije PTEN gena prisutne u 5% do 12% sporadičnih karcinoma dojke [154,155]. Mi nismo radili ispitivanja aktivnosti PTEN na genskom nivou da bismo mogli da poredimo rezultate sa literaturnim.

U poređenju sa podgrupom sa PTEN pozitivnim karcinomom dojke, podgrupa pacijentkinja sa PTEN negativnim karcinomima dojke ima statistički značajno veći sadržaj receptora za ER. Postoje kontroverzni literaturni rezultati o uzajamnoj povezanosti ekspresije PTEN proteina i sadržaja ER. Neke analize potvrđuju naš rezultat da niska ekspresija PTEN proteina značajno korelira sa visokom ekspresijom ER [149]. Suprotno tome ima autora koji nisu potvrdili ovu udruženost [156,118]. Ovaj rezultat je interesantan i mogao bi se diskutovati zajedno sa rezultatom Cox-ove univarijantne analize koja je pokazala da pacijentkinje sa ER-poz/PgR-poz fenotipom imaju 2 x veći rizik od smrtnog ishoda od druga dva fenotipa. Moguća objašnjenja su: a) mali broj pacijentkinja pa je i rezultat nepouzdan (već smo diskutovali u prethodnom poglavlju ovaj nalaz), b) gubitak PTEN ekspresije mogao bi biti pokazatelj gubitka aktivnosti ER signalnog puta, bez obzira na prisustvo HR, što bi odvajalo ovu grupu pacijentkinja kao rezistentnu na HT.

S obzirom na to da postoji trend da u stadijumu IIB ima više pacijenata sa gubitkom ekspresije PTEN proteina u poređenju sa nižim stadijumima, mogli bi da pretpostavimo da sa hronološkom starošću tumora, kada se bolest širi, dolazi i do promene u ponašanju u smislu povećane invazivnosti i metastatičnosti tumora. U našem ispitivanju nije potvrđena značajne veza između ekspresije PTEN proteina i veličine tumora i gradusa, nodalnog statusa i PgR statusa što je u saglasnosti sa literaturnim podacima [110].

Takođe, nije zabeležena udruženost između ekspresije PTEN proteina i HER2 statusa. Status ekspresije PTEN proteina ispitivan je u HER2-pozitivnom karcinomu dojke. Pokazano je u nekoliko studija da je gubitak ekspresije PTEN proteina povezan sa izostankom odgovora na trastuzumab. [113,157,158]. Vezivanjem za HER2 receptor, Trastuzumab stabilizuje i aktivira PTEN tumor supresor i posledično reguliše PI3K/Akt signalni put. Kada je ekspresija PTEN proteina smanjena ili ukinuta, prekida se ovaj lanac događaja i antitumorski efekat trastuzumaba je poremećen [159,160,112].

U našem istraživanju, pacijentkinje sa HR-pozitivnim karcinomima dojke (luminalni HER2-poz) nisu primali hemioterapiju i trastuzumab, već samo estrogen deprivacionu terapiju. Međutim, samo su 2/10 bolesnica sa HER2 pozitivnim karcinomom imale su PTEN negativni status i obe bolesnice su umrle. Nasuprot tome, 8/10 bolesnica sa HER2 pozitivnim karcinomima dojke bile su takođe PTEN pozitivne, od kojih je 5 bolesnica imalo relaps bolesti, dok je 4 pacijentkinje umrlo. Naši rezultati pokazuju da

je 3/10 (30%) pacijentkinja sa luminalnim HER2-pozitivnim tumorima posle veoma dugog vremena praćenja bez relapsa bolesti, iako su sve bile nodus-pozitivne i nisu lečene ni adjuvantnom primenom hemioterapije, niti trastuzumaba. Iako dobijeni na malom broju pacijentkinja, ovakav ishod kod luminalnih HER2-pozitivnih pacijentkinja može se objasniti time što nisu svi luminalni HER2 pozitivni tumori isti. Ovu tezu su postavili Loi i saradnici nakon analize ishoda bolesti kod pacijentkinja koje su uključene u HERA studiju. [145]. Sekundarna analiza HERA studije pokazala je da je značajan terapijski efekat trastuzumaba dobijen kod svih pacijentkinja osim kod podgrupe pacijentkinja koje su ER pozitivne i sa niskom amplifikacijom HER2 gena (FISH ratio  $\geq 2$  do  $< 5$ ). Treba napomenuti, da je od 1720 pacijentkinja sa luminalnim HER2-pozitivnim karcinomima dojke u HERA studiji 90% primalo adjuvantnu endokrinu terapiju (17% premenopauznih bolesnica je lečeno adjuvantnom OA/OvS) .

U našoj analiziranoj grupi pacijentkinja sa HR-pozitivnim karcinomima dojke lečenih samo adjuvantnom OA, relaps bolesti (relaps raka dojke i pojava dva primarna tumora drugih organskih sistema) zabeležen je kod 37/66 (56,06%) pacijentkinja, sa medijanom preživljavanja od 15,6 godina (95% CI  $\geq 10,5$  godina, što znači da gornja granica 95% CI nije dostignuta). Najviše je bilo udaljenih metastaza, od toga najviše koštanih lezija što je u skladu sa literaturnim podacima da luminalni karcinomi dojke najčešće metastaziraju u koštani sistem.

Kod pacijentkinja sa PTEN negativnim tumorima zabeležena je značajno veća stopa relapsa bolesti u odnosu na pacijentkinje sa PTEN pozitivnim tumorima. Petogodišnje i desetogodišnje stope DFS su za 47% odnosno za 60% veće u PTEN-pozitivnoj u poređenju sa PTEN- negativnom podgrupom pacijentkinja. Iako su 95% intervali poverenja (CI) široki, naročito u podgrupi pacijentkinja sa PTEN-negativnim tumorima (jer je i broj ovih pacijentkinja mali), ipak se može zaključiti da su naši rezultati pouzdani iz dva razloga: a) relaps bolesti je zabeležen kod 17/19 (89,5%) pacijentkinja sa PTEN-negativnim tumorima, za razliku od 20/47 (42,5%) pacijentkinja sa PTEN-pozitivnim tumorima i b) medijana 15-godišnjeg DFS u pacijentkinja sa PTEN-pozitivnim tumorima nije dostignuta, a donja granica 95% CI je iznad 50%, što znači da u ponavljanim merenjima neće biti dostignuta medijana vremena do prvog relapsa bolesti u 15-godišnjem periodu praćenja. U prilog dobre prognoze pacijentkinja sa PTEN-pozitivnim tumorima govore i naši rezultati koji pokazuju da se posle 20-te

godine praćenja procenat pacijentkinja bez relapsa bolesti ne menja i iznosi 58,8%, što ukazuje na to da ni nakon 29 godina praćenja medijana DFS nije dostignuta u ovoj podgrupi pacijentkinja (luminalni PTEN-pozitivni tumori), a gornja granica granica 95% CI iznosi 75%.

U našoj studiji smrtni ishod je registrovan kod 34/66 (51,5%) pacijentkinja, sa medijanom ukupnog preživljavanja od 23 godine (95%CI  $\geq$ 14,2 godine). Kao i kod DFS, naši rezultati pokazuju da pacijentkinje sa PTEN-negativnim tumorima imaju značajno kraće ukupno preživljavanje u odnosu na pacijentkinje sa PTEN-pozitivnim tumorima (Log rank test,  $p < 0,001$ ). Petogodišnje i desetogodišnje stope OS su za 34,7% odnosno 78% veće u PTEN-pozitivnoj u poređenju sa PTEN-negativnom podgrupom pacijentkinja.

Iako su 95% CI široki, naročito u podgrupi pacijentkinja sa PTEN-negativnim tumorima, i za OS se može zaključiti da su naši rezultati pouzdani iz dva razloga: a) smrtni ishod zabeležen je kod svih 17/19 (89,5%) pacijentkinja sa PTEN-negativnim tumorima kod kojih je zabeležen i relaps karcinoma dojke (znači da su sve pacijentkinje u PTEN-negativnoj grupi koje su doživele relaps karcinoma dojke i umrle zbog progresije osnovne bolesti), za razliku od pacijentkinja sa PTEN-pozitivnim tumorima gde je 17/47 (36%) preminulo i b) medijana 20-godišnjeg OS u pacijentkinja sa PTEN-pozitivnim tumorima nije dostignuta, a donja granica 95% CI je iznad 50%, što znači da u ponavljanim merenjima neće biti dostignuta medijana vremena do prvog relapsa bolesti u 20-godišnjem periodu praćenja. U prilog dobre prognoze pacijentkinja sa PTEN-pozitivnim tumorima govore i naši rezultati koji pokazuju da se posle 25-te godine praćenja procenat živih pacijentkinja ne menja i iznosi 61%, što ukazuje na to da ni nakon 29 godina praćenja medijana OS nije dostignuta u ovoj podgrupi pacijentkinja (luminalni PTEN-pozitivni tumori), a gornja granica granica 95% CI iznosi 77,7%.

U našoj analiziranoj grupi zabeležen je smrtni ishod zbog raka dojke u 32/66 (48,5%) pacijentkinja. Sve pacijentkinje sa PTEN-negativnim tumorima kod kojih je zabeležen relaps bolesti (17/19), imale su relaps karcinoma dojke, i sve su preminule zbog raka dojke, dok je od 17 pacijentkinja sa PTEN-pozitivnim karcinomima dojke koje su preminule, 15/47 (31,9%) preminulo je zbog raka dojke, dok su 2/47 (4,2%) pacijentkinje preminule bez relapsa raka dojke. Uzimajući u obzir da se OS i BCSS ne

razlikuju među sobom, odnosno da je BCSS još veće u grupi pacijentkinja sa PTEN-pozitivnim tumorima, isti komentar koji važi za OS u podgrupama sa različitom ekspresijom PTEN proteina važi i za BCSS. Dakle, 29 – godišnja stopa BCSS u PTEN-pozitivnom podgrupi pacijentkinja sa luminalnim tumorima iznosi 64,2% sa donjom granicom 95%CI iznad 50%, što znači da u ponavljanim merenjima na većem broju pacijentkinja, medijana neće biti dostignuta.

Milovanović i saradnici [118] su takođe pokazali da je odsustvo ekspresije PTEN proteina povezano sa značajno kraćim DFS i OS kod postmenopauznih pacijentkinja sa HR-pozitivnim karcinomima dojke koje su lečene samo adjuvantnom primenom Tamoksifena (ova grupa pacijentkinja imala je sve faktore rizika jednake kao naša ispitivana grupa pacijentkinja sa rakom dojke, samo su one bile postmenopauzne i lečene su adjuvantnom primenom tamoksifena, bez adjuvantne hemioterapije). Tako je medijana preživaljavanja bez znakova bolesti kod pacijentkinja bez ekspresije PTEN proteina, u zavisnosti od toga da li se radi o duktalnom ili lobularnom karcinomu, kreće od 43,5-46 meseci što je slično našem rezultatu od 44 meseca. I u ovoj grupi PTEN pozitivne pacijentkinje imaju značajno duže medijane DFS, kod duktalnih karcinoma 206 meseci a kod lobularnih ona još nije dostignuta.

Naši rezultati takođe koreliraju sa nalazima koje su publikovali Shoman i saradnici [115]. I oni su dobili značajnu povezanost između redukovane PTEN ekspresije, kraćeg DFS i kraćeg BCSS kod pacijentkinja sa HR pozitivnim karcinomima dojke koje su lečene Tamoksifenom. Oni su takođe pokazali da postoji i značajna negativna korelacija između ekspresije PTEN proteina i prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, čime sugerišu da bi gubitak ekspresije PTEN proteina mogao biti povezan sa povećanjem invazivnosti tumora.

Takođe, naši rezultati koreliraju sa ranim radovima koji su pokazali da bolesnice sa karcinomima dojke sa redukovanom ekspresijom PTEN proteina imaju goru prognozu bolesti u odnosu na one sa normalnom ekspresijom proteina, ali multivarijantna analiza nije potvrdila da ekspresija PTEN proteina predstavlja nezavisni faktor prognoze [146,161]. Winter i saradnici takođe dolaze do sličnih rezultata, tj. oni su u grupi od 146 pacijentkinja sa duktalnim invazivnim karcinomima dojke pokazali da je DFS bio duži ukoliko je PTEN protein bio eksprimiran u tumorskim ćelijama dojke [162].

U našoj grupi ispitivanih pacijentkinja nismo radili multivarijantnu analizu jer univarijantnom Cox-ovom regresionom analizom nismo identifikovali drugi značajan faktor koji utiče na ishod lečenja ni za DFS, ni za BCSS, niti za OS osim ekspresije PTEN proteina, što multivarijantnu analizu čini izlišnom.

PI3K-AKT-mTOR signalni put je važna terapijska meta za razvoja novih lekova kod karcinoma dojke [163]. Poznato je da 30% odmaklih HR pozitivnih HER2 negativnih karcinoma dojke imaju ove mutacije gena koje kodiraju PI3K [164-166]. Aktuelna su klinička ispitivanja na sledećim inhibitorima PI3K signalnog puta u metastatskom i lokalno uznapredovalom karcinomu dojke: a) rapamicin i njegovi analozi: everolimus, temsirolimus, deforolimus, b) inhibitori mTOR kinaza, c) pan PI3K inhibitori (buparlisib, pictilisib), d) p110 $\alpha$  specifični PI3K inhibitor ili ilsoform-specifični PI3K inhibitori (taselisib, alpelisib), e) Dualni PI3K/mTOR inhibitori, f) AKT inhibitori. Ispitivanje ovih lekova još uvek je u fazi ispitivanja u metastatskom i lokalno odmaklom karcinomu dojke bilo kao pojedinačni agensi, bilo u kombinaciji sa drugim agensima, kao što su receptori tirozin kinaza (HER2, EGFR, FGFR) ili standardna ET (IA, selektivni *down*-regulatori ER, fulvestrant). Kombinacija inhibicije PI3K signalnog puta sa ET pokazuje sinergistički efekat i predstavlja novu metu razvoja ciljane terapije u lečenju pacijentkinja sa luminalnim HER2-negativnim karcinomima dojke [167]. Buduća istraživanja mogla bi da se usmere i na ispitivanje prediktivnog značaja gubitka PTEN ekspresije radi identifikacije pacijenata sa tumorima sa odgovorom na inhibitore PI3K/Akt signalnog puta [168].

Naša sadašnja analiza u grupi premenopauzних pacijentkinja, kao i prethodna analiza urađena u grupi postmenopauzних pacijentkinja sa luminalnim tumorima (neselektovanim prema HER2 statusu) [118], ukazuju na to da ekspresija PTEN proteina može da razdvaja podgrupe pacijentkinja sa dobrom i lošom prognozom, koje su sve lečene adjuvantnom hormonskom terapijom. Iako pacijentkinje sa gubitkom ekspresije PTEN proteina imaju lošiju prognozu, postavlja se pitanje da li bi dodavanje adjuvantne hemioterapije ovoj podgrupi pacijentkinja sa luminalnim tumorima doprinela smanjenju stope relapsa bolesti i smrtnog ishoda, jer prediktivna vrednost ekspresije PTEN proteina nije ispitivana. Radi postavljanja hipoteze da bi PTEN mogao da bude prediktivni faktor odgovora na standardnu hemioterapiju u grupi pacijentkinja sa luminalnim HER2-negativnim karcinomima dojke, mogla bi se uraditi retrospektivna

analiza koja bi uključivala dve podgrupe ovih pacijentkinja: a) lečenih samo adjuvantnom ET i b) lečenih kombinacijom adjuvantne ET i hemioterapije.

Iako se danas smatra da primena OA/OvS kao jedinog vida adjuvantne hormonoterapije predstavlja insuficijentno lečenje u ranom karcinomu dojke, pacijenti lečeni kao što su lečeni pacijenti u našem istraživanju predstavljaju dragocenu grupu pogodnu za ispitivanje uticaja estrogene deprivacije na ishod bolesti u različitim podtipovima karcinoma dojke.

Nedostaci naše analize su sledeće:

1. mali broj pacijentkinja i mali broj događaja, što rezultira širokim 95%CI koji ukazuju na manju pouzdanost rezultata
2. retrospektivna analiza na osnovu koje ne možemo da donesemo generalizovani zaključak, ali nam pomaže da postavimo hipotezu: gubitak ekspresije PTEN proteina predstavlja loš prognostički faktor u grupi pacijentkinja sa luminalnim karcinomima dojke, koji od svih prognostičkih faktora najbolje razdvaja podgrupe sa dobrom i lošom prognozom; izuzetak je nodusni status, ali je nedovoljan broj pacijentkinja sa nodus-negativnim tumorima participirao u ovoj analizi; prognostička vrednost ekspresije PTEN proteina veća je i od HER2 statusa

Prednosti naše analize su sledeće:

1. izdvojena je visoko selektovana grupa pacijentkinja sa HR-pozitivnim karcinomima dojke (sa nodus negativnim statusom kod tumora histološkog gradusa 3 i do 3 pozitivna regionalna limfna čvora bez obzira na histološki gradus tumora) lečenih prema tadašnjem važećem protokolu za dijagnostiku i lečenje karcinoma dojke [119] i prospektivno praćena za ishod lečenja;
2. analizirana grupa predstavlja homogenu grupu pacijentkinja sa relativno dobrom prognozom na osnovu klasičnih prognostičkih faktora (broj zahvaćenih limfnih čvorova, veličina i gradus tumora, status HR);
3. uključene su pacijentkinje kod kojih je korišćena ista metodologija određivanja sadržaja ER i PgR (biohemijska metoda) [120]. Ispitivanja su pokazala da su biohemijska i IHH metode određivanja HR ravnopravne u rutinskoj praksi iako

- se u 10%-30% merenja dobijaju nesaglasni podaci, sa izdvajanjem većeg procenta pozitivnog statusa ER IHH metodom;
4. isključen je uticaj hemioterapije;
  5. veoma dug interval praćenja pacijentkinja.

Naši rezultati su potvrdili radnu hipotezu da, u grupi pacijentkinja sa luminalnim karcinomima dojke dijagnostikovanim u stadijumu I i II lečenih radikalnom mastektomijom i adjuvantnom OA, gubitak ekspresije PTEN proteina predstavlja loš prognostički faktor, tj. faktor kraćeg DFS, OS i BCSS. Naši rezultati mogu da znače da PTEN status određen kao ekspresija PTEN proteina može da razdvoji podgrupe bolesnica sa dobrom i lošom prognozom. I pored toga što nije pokazana prediktivna vrednost PTEN statusa tumora dojke za odgovor na hemioterapiju, PTEN status bi mogao da identifikuje bolesnice sa većim rizikom za razvoj odgovora/rezistencije na adjuvantnu endokrinu terapiju i tako omogućiti da se lakše donese odluka o primeni/ili ne i adjuvantne hemioterapije uz hormono terapiju.

Mali broj događaja (smrti) u celoj grupi, generalno, čini dobijene rezultate Cox-ove univarijantne regresione analize prilično nepouzdanim za dalje zaključivanje i primenu multivarijantne Cox-ove regresione analize. Do pouzdanijih rezultata bi se moglo doći kasnije, naknadnom analizom, kada broj događaja (smrti) bude bio veći.



## 6. ZAKLJUČCI

Nakon urađene planirane analize u grupi pacijentkinja sa HR pozitivnim karcinomima dojke dijagnostikovanim u stadijumu I/II i lečenih adjuvantnom ovarijalnom ablacijom zaključeno je sledeće:

1. Procenjen je značajan uticaj ekspresije PTEN proteina na preživljavanje bez bolesti: pacijentkinje sa PTEN pozitivnim karcinomima dojke imaju značajno duže preživljavanje bez bolesti (DFS) u odnosu na pacijentkinje sa PTEN negativnim karcinomima dojke.
2. Procenjen je značajan uticaj ekspresije PTEN proteina na ukupno preživljavanje: pacijentkinje sa PTEN pozitivnim karcinomima dojke imaju značajno duže ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na pacijentkinje sa PTEN negativnim karcinomima dojke.
3. Procenjen je značajan uticaj ekspresije PTEN proteina na preživljavanje specifično za karcinom dojke: pacijentkinje sa PTEN pozitivnim karcinomima dojke imaju značajno duže preživljavanje specifično za karcinom dojke (BCSS) u odnosu na pacijentkinje sa PTEN negativnim karcinomima dojke.

## 7. LITERATURA

1. Dong G, Wang D, Liang X, Gao H, Wang L, Yu X, et al. Factors related to survival rates for breast cancer patients. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Oct 15;7(10):3719-3724
2. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJL, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2011;378:1461–1484
3. Registar za rak centralne Srbije. Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 1999-2009. Institut za zaštitu zdravlja Srbije, Beograd, 1999-2009
4. Theriault RL, Sellin RV. Estrogen-replacement therapy in younger women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994;16:149–52
5. DeSantis C, Ma J, Brzan L, Jemal A. Breast cancer statistics 2013. *CA Cancer J.Clin* 2014;62:52-62.
6. Pujol P, Daures JP, Thezenas S et al. Changing estrogen and progesterone receptor patterns in breast carcinoma during the menstrual cycle and menopause. *Cancer* 1998;83:698–705
7. Edge SB, Byrd DR, Compton CC (eds). *AJCC Cancer Staging Handbook*, 7th edition New York, NY. Springer 2010
8. Singletary E, Allred C, Ashly P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(17):3628-36
9. Association of Breast Surgery at Baso 2009. Surgical guidelines for the management of breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2009; 35(Suppl 1): 1-22

10. Curigliano G, Burstein, HJ, Winer EP, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017 *Annals of Oncology* 2017;28:1700–12
11. Schmitt S, Moran M, Houssami N, Morrow M. The Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology Consensus Guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer: perspectives for pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2015; 139: 575-77.
12. Poortmans P, Aznar M, Bryrlink H. Quality indicators for breast cancer: revisiting historical evidence in the context of technology changes. *Semin Radiat Oncol* 2012;22:29-39
13. Morrow M, Van Zee KJ, Solin LJ, Houssami N, Chavez-MacGregor M, Harris JR, et al. Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology-American Society of Clinical Oncology Consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in ductal carcinoma in situ. *J Clin Oncol* 2016 Nov 20;34(33):4040–6.
14. Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, Morrow M. The Association of Surgical Margins and Local Recurrence in Women with Early-Stage Invasive Breast Cancer Treated with Breast-Conserving Therapy: A Meta-Analysis *Ann Surg Oncol* (2014) 21:717–30
15. Moran MS, Schnitt SJ, Giuliano AE, et al. Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with wholebreast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *J Clin Oncol* 2014;32:1507–15.
16. Lyman GH, Temin S, Edge SB, Newman LA, Turner RR, Weaver DL, et al. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American

Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2014 May 1;32(13):1365-83

17. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981–22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol* 2014;15: 1303–1310

18. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown A, Harlow SP, Costantino J, et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11: 927-933

19. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Breast Cancer Version 3.2017. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_pdf/breast.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_pdf/breast.pdf)

20. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, , Viale G, Luini A, Veronesi P, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases(BCSG 23-1): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2013;14(4): 297-305

21. Giuliano AE, Hawes D, Ballman KV et al. Association of occult metastases in sentinel lymph nodes and bone marrow with survival among women with early stage invasive breast cancer. *JAMA* 2011; 306: 385–393

22. Weaver DL. Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: protocol recommendations and rationale. *Mod Pathol* 2010;23(Suppl2):S26–S32

23. Halsted WS. The results of operations for the cure of cancer of the breast performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann Surg* 1894;20(5):497–555.

24. Jerome A. Urban M.D. Extended radical mastectomy for breast cancer. *Am J Surg* 1963;106:399–404.]
25. Patey DH, Dyson WH. The prognosis of carcinoma of the breast in relation to the type of mastectomy performed. *Br J Cancer* 1948;2:7–13.
26. Auchincloss H. Modified radical mastectomy: why not? *Am J Surg* 1970;119(5):506–509.
27. Madden JL, Kandalaf S, Bourque RA. Modified radical mastectomy. *Ann Surg* 1972;175(5):624–34.
28. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26(Suppl 5):v8-v30
29. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet* 2014;383: 2127–2135
30. Darby S, McGale P et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 2011; 378: 1707–1716
31. Werkhoven EV, Hart G, Tinteren HV et al. Nomogram to predict ipsilateral breast relapse based on pathology review from the EORTC 22881–10882 boost versus no boost trial. *Radiother Oncol* 2011;100: 101–107
32. Kunkler IH, Williams LJ, Jack WJL, Cameron DA, Dixon JM, on behalf of the PRIME II investigators. Breast-conserving surgery with or without irradiation in women

aged 65 years or older with early breast cancer (PRIME II): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 266–73.

33. Bartelink H, Maingon P, Poortmans P et al. Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 47–56

34. Vrieling C, van Werkhoven E, Maingon P et al. Prognostic factors for local control in breast cancer after long-term follow-up in the EORTC boost vs no boost trial: a randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2017; 3:42–48.

35. Strnad V, Ott OJ, Hildebrandt G et al. Groupe Europeen de Curietherapie of European Society for Radiotherapy and Oncology (GEC-ESTRO). 5-Year results of accelerated partial breast irradiation using sole interstitial multicatheter brachytherapy versus whole-breast irradiation with boost after breast-conserving surgery for low-risk invasive and in-situ carcinoma of the female breast: a randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet* 2016; 387(10015): 229–38.

36. Whelan TJ, Pignol JP, Levine MN et al. Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer. *N Engl J Med* 2010; 362:513–20.

37. Whelan TJ, Olivotto IA, Parulekar WR, et al. Regional nodal irradiation in early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 307–316

38. Poortmans PM, Collette S, Kirkove C, et al. Internal mammary and medial supraclavicular irradiation in breast cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 317–327

39. Coates AS, Winer ER, Goldhirsch A, Gelber R, Gnani M, Piccart M, et al. Tailoring therapies- improving the management of early breast cancer:St Galen Inter Experts Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 2015;26:1533-46

40. Gnant M, Mlineritch B, Stoeger H, et al. Zoledronic acid combined with adjuvant endocrine therapy of tamoxifen versus anastrozol plus ovarian function suppression in premenopausal early breast cancer: final analysis of the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 12. *Ann Oncol* 2014;26:313-20.
41. Pagani O, Regan M, Walley B, et al. Adjuvant Exemestane with Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med* 2014;371:107-18.
42. Francis P, Regan M, Fleming G, et al. Adjuvant Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med* 2015;372:436-46
43. Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomized trial. *Lancet* 2013;381:805–16
44. Tjan-Heijnen VCG, van Hellemond IEG, Peer PGM, Swinkels ACP, Smorenburg CH, van der Sangen MJC, et al. Extended adjuvant aromatase inhibition after sequential endocrine therapy (DATA): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18:1502–11.
45. Blok EJ, Kroep JR, Meershoek-Klein Kranenbarg E, Duijm-de Carpentier M, Putter H, van den Bosch J, et al. Optimal Duration of Extended Adjuvant Endocrine Therapy for Early Breast Cancer; Results of the IDEAL Trial (BOOG Blok-05).
46. Mamounas T et al. Extended Letrozole Therapy Showed Limited Benefit in Postmenopausal Women With Early-Stage, Hormone Receptor–Positive Breast Cancer. *SABCS*
47. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St Gallen/Vienna 2017: A Brief Summary of the Consensus Discussion about Escalation and De/Escalation of Primary Breast Cancer Treatment. *BreastCare* 2017; 12: 102/107

48. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(8):717-29
49. Gnant M, Filipits M, Greil R et al. Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 risk of recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol* 2014; 25: 339–345
50. Peto R, Daves C, on behalf of the ATLAS Collaboration. ATLAS (Adjuvant Tamoxifen, Longer Against Shorter): International randomized trial of 10 versus 5 years of adjuvant tamoxifen among 11500 women – preliminary results. *Breast Cancer Res Treat* 2007 (suppl 1): late breaking abstract No 48
51. Lewis JP. An Interpretation of the EBCTCG Data. *Oncologist* 2007; 12:505–9.][ Love RR, Van Dinh N, Tu Quy T, Dieu Linh N, Dinh Tung N, Shen T, et al. Survival After Adjuvant Oophorectomy and Tamoxifen in Operable Breast Cancer in Premenopausal Women. *J Clin Oncol* 2008; 26:253-7.
52. The Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Trialists' Group. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 2008; 9:45–5381-83)
53. Coates AS, Keshaviah A, Thürlimann B, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, et al. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: Update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol* 2007; 25:486–92.
54. Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF, Paridaens R, Coleman RE, Jones RE et al. on behalf of the Intergroup Exemestane Study. Survival and safety of exemestane



versus tamoxifen after 2–3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369:559–70.

55. Al Asiri M, Tunio M, Abdulmoniem R. Is radiation-induced ovarian ablation in breast cancer an obsolete procedure? Results of a meta-analysis. *Breast Cancer* 2016; 8:109–16.

56. Davidson N. What Is the Role of Ovarian Ablation in the Management of Primary and Metastatic Breast Cancer Today? *The Oncologist* 2004;9(5):507-17.]

57. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Ovarian ablation for early breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 1998, Issue 2. Art. No.: CD000485. DOI: 10.1002/14651858.CD000485

58. Klijn JGM: LHRH agonists in the treatment of metastatic breast cancer: Ten years' experience. *Recent Results Cancer Res* 1992;124:75-90

59. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Davies C, Godwin J, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta analysis of randomized trials. *Lancet* 2011; 378:771/784

60. Gianni L, Dafni U, Gelber RD et al. Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2011; 12: 236–244

61. Perez EA, Romond EH, Suman VJ et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol* 2014; 32: 3744–3752

62. Slamon D, Eiermann W, Robert N et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2011; 365: 1273–1283
63. Gonzalez-Angulo AM, Litton JK, Broglio KR et al. High risk of recurrence for patients with breast cancer who have human epidermal growth factor receptor 2-positive, node-negative tumors 1 cm or smaller. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5700–5706
64. Pivot X, Romieu G, Debled M et al. 6 months versus 12 months of adjuvant trastuzumab for patients with HER2-positive early breast cancer (PHARE): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 741–748
65. Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ et al. 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2013; 382: 1021–1028
66. Joensuu H, Bono P, Kataja V et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide with either docetaxel or vinorelbine, with or without trastuzumab, as adjuvant treatments of breast cancer: final results of the FinHer Trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5685–5692
67. Yager JD, Davidson NE. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2006; 354:270-82
68. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:10393–8.
69. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting Highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(18):3817-27.

70. Saphner T, Tormey DC, Gray R. Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J Clin Oncol* 1996; 14:2738-2746.
71. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365:1687-717
72. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn H-J & Panel Members. Progress and promise: Highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 2007; 18:1133-44.]
73. Henderson C, Patek AJ. The relation between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52:261-88
74. Elledge R, McGuire W, Osborne K. Prognostic factors in Breast Cancer. *Semin Oncol* 1992; 19(3):244-53][ Loprinzi CL, Thome SD. Understanding the Utility of Adjuvant Systemic Therapy for Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(4):972-7
75. Recht A, Houlihan MJ. Axillary lymph nodes and breast cancer: a review. *Cancer* 1995; 76:1491-512][ Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983; 52:1551-7.
76. Montero JA, Rouzier R, Lluch A, Theriault RL, Buzdar AU, Delaloge S, et al. The Natural History of Breast Carcinoma in Patients with  $\geq 10$  Metastatic Axillary Lymph Nodes before and after the Advent of Adjuvant Therapy. A Multiinstitutional Retrospective Study. *Cancer* 2005; 104(2):229-35.
77. Adjuvant! Online: decision making tools for health care professionals. (Accessed August 31, 2008, at <http://www.adjuvantonline.com>.)

78. A. Goldhirsch J. H. Glick R. D. Gelber A. S. Coates B. Thürlimann H.-J. Senn and Panel Members. Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. *Ann Oncol*, Volume 2005; 16, Issue 10: 1569–1583.
79. Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: today and tomorrow. *Cancer Treat Rev* 2014;40:434-444
80. Blamey RW, Pinder SE, Ball GR, Ellis IO, Elston CW, Mitchell MJ, et al. Reading the prognosis of the individual with breast cancer. *Eur J Cancer* 2007;43:1545-1547
81. Ravdin PM, Siminoff LA, Davis G, Mercer MB, Hewlett J, Gerson N, et al. Computer program to assist in making decision about adjuvant therapy for woman with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:980-991
82. Wishart GC, Bajdik CD, Azzato EM, Dicks E, Greenberg DC, Rashbass J, et al. A population-based validation of the prognostic model PREDICT for early breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2011;37:411-417
83. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:2817–26
84. National Comprehensive Cancer Network: Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast cancer, v.2.2008 /PDF/breast.pdf. Last accessed 31 August 2008
85. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, et al.: Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 2016;34:1134-1150

86. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, et al.: Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer*, 2017;75:284-298
87. Pan H, Gray R, Braybrooke J, et al. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *N Engl J Med* 2017;377:1836-46
88. De Sombre ER, Smith S, Block GE, Ferguson DJ, Jensen EV. Prediction of breast cancer response to endocrine therapy. *Cancer Chemother Rep* 1974; 58:5113-9
89. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 351:1451–67
90. Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ekena K, Herman ME, McInerney EM. Antiestrogens: Mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 44:23-38
91. Macgregor JI, Jordan VC. Basic Guide to the Mechanisms of Antiestrogen Action. *Pharmacol Rev* 1998; 50(2):151-96
92. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-Receptor Biology: Continuing Progress and Therapeutic Implications. *J Clin Oncol* 2005; 23(8):1616-22
93. Baselga J, Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for therapy in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29(1):127-38
94. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1998; 58: 2825-31

95. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, et al. Phase II Study of Weekly Intravenous Recombinant Humanized Anti-p185HER2 Monoclonal Antibody in Patients with HER2/neu-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14(3):737-44
96. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, et al. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody (rhuMAb) plus cisplatin in patients with HER2/neu -overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998; 16:2659-71
97. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpress HER2. *N Engl J Med* 2001; 344(11):783-92
98. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith J, et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1659-72
99. Romond E, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1673-84
100. Šušnjar S, Bošnjak S, Radulović S. Primena trastuzumaba u metastatkom karcinomu dojke. *Srp Arh Celok Lek* 2001; 129(5-6):147-52
101. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606–16
102. Panigrahi AR, Pinder SE, Chan SY, Paish EC, Robertson JFR, Elis IO. The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of

relationships with other prognostic factors and with outcome. *J Pathol* 2004;204:93-100

103. Perez-Tenorio G, Alkhorri L, Olsson B et al. PIK3CA Mutations and PTEN Loss Correlate with Similar Prognostic Factors and Are Not Mutually Exclusive in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3577-3584

104. Rojo F, Domingo L, Saala M, et al. Gene expression profiling in true interval breast cancer reveals overactivation of the mTOR signaling pathway. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(2):288-99

105. Wang X, Jiang X. PTEN: a default gate-keeping tumor suppressor with a versatile tail. *Cell Research* 2008;18:807-16

106. Miller T, Perez-Torres M, Narasanna A, et al. Loss of Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10 Engages ErbB3 and Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Signaling to Promote Antiestrogen Resistance in Breast Cancer. *Cancer Res* 2009;69:4192-4201

107. ESMO Translational Research and Personalised Medicine Working Group. ESMO Glossary in Molecular Biology of Cancer and Molecular Techniques, 3rd edition. Lugano: ESMO Press 2015

108. Beelen K, Opdam M, Severson TM, Koornstra RH, Vincent AD, Wesseling J, et al. PIK3CA mutations, phosphatase and tensin homolog, human epidermal growth factor receptor 2 and insulin-like growth factor 1 receptor and adjuvant tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2014;16(1):R13

109. Yang J, Yan Ren, Wang L, Li BL, Chen Y, Zhao WX, et al. PTEN mutation spectrum in breast cancers and breast hyperplasia. *J Cancer Res Clin Oncol* (2010) 136:1303-1311.

110. Kechagioglou P, Papi R, Provatopoulou X, et al. Tumor Suppressor PTEN in Breast Cancer: Heterozygosity, Mutation and Protein Expression. *Anticancer Research* 2014;34(3):1387-400
111. Chen M, Nowak DG, Trotman LC. Molecular Pathways Phosphatases as Biomarkers for Cancer Prognosis and Therapy. *Clin Cancer Res* 2014;30:56-63
112. Jensen J, Knoop A, Laenkholm A, Grauslund M, Jensen M, Santoni-Rugiu, et al. PIK3CA mutations, PTEN and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol* 2012, 23: 2034-42.
113. Perez E, Dueck A, McCullough A, Chen B, Geiger X, Jenkins R, et al. Impact of PTEN Protein Expression on Benefit From Adjuvant Trastuzumab in Early-Stage Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer in the North Central Cancer Treatment Group N9831 Trial. *J Clin Oncol*; 2013:2115-22
114. Nuciforo PG, Aura C, Holmes E, Prudkin L, Jimenez J, Martinez P, et al. Benefit to neoadjuvant anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-targeted therapies in HER2-positive primary breast cancer is independent of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) status. *Ann Oncol* 2015;26(7):1494-1500
115. Shoman N, Klassen S, McFadden A, Bickis M, Torlakovic E, Chibbar R. Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen. *Modern Pathology* 2005;18:250-9.
116. Gayathi N, Ma C. Adjuvant Chemotherapy Decisions in Clinical Practice for Early-Stage Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Breast Cancer: Challenges and Considerations. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11:246-251



117. Pandolfi PP. Breast Cancer - Loss of PTEN Predicts Resistance to Treatment. *N Engl J Med* 2004;351:2337-8
118. Milovanović Z, Dzodic R, Susnjar S, Plesinac-Karapandzic V, Juranic Z, Tatic S. PTEN protein expression in postmenopausal steroid receptor positive early breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *J BUON* 2011;16(1):46-51.
119. Brzaković P, Jovanović R, Pantelić M, Tomin R. Maligni tumori dojke . U: Vuletić L, Nikolić S, Šobić V (eds). *Protokol za dijagnostikovanje i lečenje malignih bolesti*, Institut za onkologiju i radiologiju, Belgrade, 1985. [na srpskom]
120. E.O.R.T.C. Breast Co-operative Group. Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer; report of the second E.O.R.T.C. workshop, held on 16-17 March, 1979, in the Netherlands Cancer Institute. *Eur J Cancer* 1980; 16:1513-5
121. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, et al. Chromogenic in Situ Hybridization: A Practical Alternative for Fluorescence in Situ Hybridization to Detect HER-2/neu Oncogene Amplification in Archival Breast Cancer Samples. *Am J Pathol* 2000; 157(5):1467-72
122. Perren A, Weng LP, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, Dahia P, et al. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *AJP* 1999; 155:1253-1260]
123. Statistical Program R (version 3.3.2 (2016-10-31) ‘Sincere Pumpkin Patch’; Copyright © 2016 The R Foundation for Statistical Computing; Platform: x86\_64-w64-mingw32/x64(64-bit); downloaded: January 21, 2017
124. Smyth L, Hudis C. Adjuvant hormonal therapy in premenopausal women with breast cancer. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2015; 36(4): 195–200

125. Jankowitz RC, McGuire KP, Davidson NE. Optimal systemic therapy for premenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer. *Breast*. 2013;22 Suppl 2:165-70
126. Zelnak AB, O`Regan RM. Optimizing endocrine therapy for breast cancer. *J Natl Compr Cancer Netw*. 2015;13(8):e56-64
127. Davies C, Godwin J, Gray R et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011; 378(9793):771-84
128. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet* 2015; 386:1341-52
129. Ezzeldin M. Ibrahim, Marwan R. Al-Hajeili, Ali M. Bayer et al. Extended adjuvant endocrine therapy in early breast cancer: a meta analysis of published randomized trials. *Med Oncol* 2017;34:131
130. Powles TJ. Extended adjuvant tamoxifen for breast cancer—a new era? *Lancet* 2013;381(9869):782-3
131. Gray RG, Rea D, Handley K, Bowden SJ, Perry P, Earl HM. aTTom: Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2013, 31(suppl 18):5-5
132. Gnant M, Mlineritch B, Stoeger H, Luschin-Ebengreuth G, Heck D, Menzel C, et al. Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 62-month follow-up from the ABCSG-12 randomised trial. *Lancet Oncol* 2011;12:631-41

133. Gnant M, Mlineritsch B, Schippinger W et al. Endocrine Therapy plus Zoledronic Acid in Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med* 2009;360(7):679-691
134. Goel S, Sharma R, Hamilton A et al. Tamoxifen agonists for adjuvant therapy of early breast cancer in premenopausal women. *Breast* 2013;22 Suppl 2:165-70
135. Taylor CW, Green S, Dalton WS et al. Multicenter randomized clinical trial of goserelin versus surgical ovariectomy in premenopausal patients with receptor-positive metastatic breast cancer: an intergroup study. *J Clin Oncol* 1998;16:994-999.
136. Boccardo F, Rubagotti A, Perrotta A et al. Ovarian ablation versus goserelin with or without tamoxifen in pre-perimenopausal patients with advanced breast cancer: results of a multicentric Italian study. *Ann Oncol* 1994;5:337-342
137. Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: When is „statistically significant“ clinically useful? *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52:305-19
138. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109: 25-32
139. Iwamoto T, Bianchini G, Booser D et al. Gene pathways associated with prognosis and chemotherapy sensitivity in molecular subtypes of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 264-272
140. Gospodarowicz MK, O’Sullivan B, Koh ES. Prognostic Factors: Principles and Applications. In: Gospodarowicz MK, O’Sullivan B, Sobin LH (Eds). *Prognostic factors in cancer*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, 2006. pp 23-38
141. Saal LH, Johansson P, Holm K et al. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 7564-7569

142. Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, Sweep CG, Lisboa BW, Lux MP, Beck T, Hasmüller S, Kiechle M, Jänicke F, Thomssen C; Chemo-N0 Study Group. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2013;49(8):1825-35. □
143. Susnjar S, Vujasinović T, Abu Rabi Z, Nešković – Konstantinović Z, Milovanović Z, Jovanović D, et al. Positive HER2 status – is it a discriminating factor for disease outcome in steroid receptor – positive early breast cancer patients treated with adjuvant endocrine therapy only? *Eur J Cancer (Suppl)* 2010,8(3):103 (Abstr 156)
144. Šušnjar S. Značaj amplifikacije c-erbB2 gena u stadijumu I/II hormonski zavisnog Ca dojke. Disertacija, Univerzitet u Beogradu, 2009]
145. Loi S, Dafni U, Karlis D, Polydoropoulou V, Young BM, Willis S, et al. Effects of Estrogen Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Levels on the Efficacy of Trastuzumab. A Secondary Analysis of the HERA Trial *JAMA Oncol* 2016;2(8):1040-7
146. Depowski P, Rosenthal S, Ross J. Loss of Expression of the PTEN Gene Protein Product Is Associated with Poor Outcome in Breast Cancer. *Mod Pathol* 2001;14(7):672/676
147. Shi W, Zhang X, Pintilie M, et al. Dysregulated PTEN-PKB and negative receptor status in human breast cancer. *Int J Cancer*. 2003;104(2):195-203
148. Hong Yan Zhang , Feng Liang, Zhi Ling Jia et al. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2004;15(10):1510-6

149. Kappes H, Goemann C, Bamberger AM et al. PTEN expression in breast and endometrial cancer: correlations with steroid hormone receptor status. *Pathobiology* 2001;69: 136-142
150. Bose S, Crane A, Hibshoosh H, et al. Reduced expression of PTEN correlateds with breast cancer progression. *Hum Pathol.* 2002;33(4):405-9
151. Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82: 285-291
152. Carroll BT, Couch FJ, Rebbeck TR, Weber BL. Polymorphisms in PTEN in breast cancer families. *J Med Genet* 1999; 36: 94-96
153. Stiles B, Groszer M, Wang S, Jiao J, Wu H. PTEN less means more. *Dev Biol* 2004; 273: 175-184.] [Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, Pavey S, Hayward NK, Eng C. Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 2002; 99: 63-67.
154. Sulis ML, Parsons R. PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 478-483.
155. Li G, Robinson GW, Lesche R et al. Conditional loss of PTEN leads to precocious development and neoplasia in the mammary gland. *Development* 2002; 129: 4159-4170
156. Saall, Holm K, Maurer M et al. PI3KCA Mutations Correlate with Hormone Receptors, Node Metastasis, and ERBB2, and Mutually Excluseve with PTEN loss in Human Breast Carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65(7):2554-2559
157. Gori S, Sidoni A, Colozza M, Ferri I, Marnetti MF, Fenocchio D, et al. EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Ann Oncol* 2009;20:648-54

158. Nagata Y, Lan K-H, Zhou X, Tan M, Esteva JF, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004;6:117-27
159. Pandolfi PP. Breast Cancer - Loss of PTEN Predicts Resistance to Treatment. *N Engl J Med* 2004;351:2337-8][ Loi S, Dafni U, Karlis D, Polydoropoulou V, Young BM, Willis S, et al. Effects of Estrogen Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Levels on the Efficacy of Trastuzumab. A Secondary Analysis of the HERA Trial *JAMA Oncol* 2016;2(8):1040-7
160. Rexer B, Shyr Y, Asteaga C. Phosphatase and Tensin Homolog Deficiency and Resistance to Trastuzumab and Chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013;31(17):2073-6
161. Tsutsui S, Inou H, Yasuda K, et al.Reduced expression of PTEN protein and its prognostic implications in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncology*.2005;68(4/6)398-404
162. Winter JL,Stackhouse BL, Russell GB, et al. Measurement of PTEN expression using tissue microarrays to determine a race-specific prognostic marker in breast cancer,.*Arch Pathol Lab Ma*2007 ;131(5):767-72
163. Cynthia X.Ma. The PI3K Pathway as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *AJ Hem/Oncol* 2015;11(3):23-9
164. Chin YM, Yuan X, Balk SP, et al.Pten-deficient tumors depend on akt2 for maintenance and survival. *Cancer Discov* 2014;4:942-955
165. Gonzalez-Angulo A, Ferrer-Lozano J, Stemke-Hale K, et al. PI3K Pathway Mutations and PTEN Levels in Primary andMetastatis Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 2011;10(6):1093-101

166. Loi S, Haibe-Kains B, Majjaj S et al. PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 10208-10213

167. Turner NC, Neven P, Loibl S, Andre F. Advances in the treatment of advanced oestrogen-receptor-positive breast cancer. *Lancet* 2017; 389: 2403–14

168. DeGraffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE et al. Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway. *Ann Oncol.* 2004 Oct;15(10):1510-6

## Spisak skraćenica

- KD –karcinom dojke
- HR-hormon receptor
- RT –radioterapija
- DCIS- eng. *ductal carcinom in situ*
- SLNB- biopsija stražarskog limfnog čvora (eng. *sentinel lymph node biopsy*)
- IHH- imunohistohemija
- ER- estrogini receptor
- PgR- progesteron receptor
- OvS- ovarijalna supresija
- IA- inhibitor aromataze
- HER2- humani epidermalni faktor rasta
- OA- ovarijalna ablacija
- HT-hormonska terapija
- DFS- preživljavanje bez bolesti (eng. *disease free survival*)
- OS- ukupno preživljavanje (eng. *overall survival*)
- BCSS- preživljavanje specifično za karcinom dojke (eng. *breast cancer specific survival*)
- uPA-urokinazni plazminogen aktivator
- PAI- plazminogen aktivator inhibitor
- NPI- Nottingham Prognostic Index
- RT-PCR-rverzna transkriptaza (eng.*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*)
- PTEN-eng. *Phosphatase and tensin homolog*
- PI3K/AKT – fosfatidil inozitol 3 kinaza, protein B kinaza (eng. phosphatidylinositol-3kinase; AKT protein kinase B)
- FSH- folikulostimulirajući hormon
- LH-luteinizirajući hormon
- CISH- hromogen in situ hibridizacija (eng.*chromogenic in situ hybridization*)
- SERM- elektivni modulatori estogenih receptora (eng. *Selective estrogen receptor modulators*)



HR-odnos rizika, (eng. *hazard ratio*)

CI – interval poverenja, (eng. *confidence interval*)

## Biografija

Dr Tamara Ursulović rođena je 9.2.1969. godine u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju školu kao đak generacije.

Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 1994. godine sa prosečnom ocenom 9.

Specijalizaciju iz interne medicine je završila 2001. godine sa odličnim uspehom.

Nakon uspešno položenih ispita, u martu 2009. godine odbranila je magistarsku tezu marta pod nazivom "Istraživanje prediktivnih faktora za toksičnost neoadjuvantne hemioterapije u lokalno uznapredovalim planocelularnim karcinomima glave i vrata" kod mentora Prof. dr Željka Petrovića.

Užu specijalizaciju iz onkologije završila je 2016. godine odbranivši rad pod nazivom „Ispitivanje efikasnosti i podnošljivosti kombinovanog lečenja, hemio i radioterapijom, lokalno odmaklog nediferentovanog karcinoma nazofarinksa (UCNT)" kod mentora Prof. dr Antona Mikića.

U periodu 1995.-1997. radila je kao stipendista Ministarstva zdravlja RS u KBC "Bežanijska kosa" kao specijalizant interne medicine.

Zaposlena je od 2001. godine u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Klinici za Medikalnu onkologiju, odsek za maligne tumore glave i vrata.

Dr Ursulović je stalni član više konzilijuma: za digestivni trakt i tumore MFR regije na IORS-u kao i tumore ORL regije u KCS. Oblasti njenog interesovanja su klinička istraživanja u svim solidnim tumorima.

Dr Ursulović je član svih vodećih domaćih i međunarodnih onkoloških udruženja; od 2017. član je Predsedništva Srpskog udruženja onkologa glave i vrata koja je pod okriljem SLD i pripada evropskom udruženju onkologije tumora gleve i vrata; član je Kancerološke sekcije i udruženja Medikalnih onkologa Srbije.

Autor je ili koautor većeg broja radova objavljenih u domaćim i internacionalnim časopisima.

Tema ovog doktorata je odobrena od strane Univerziteta u Beogradu dana 12.5.2015.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisana Tamara Ursulović

broj upisa \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Povezanost ekspresije PTEN proteina i prognoze bolesti kod žena obolelih od ranog karcinoma dojke lečenih ovarijalnom ablacijom“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 16.05.2018.

Tamara Ursulović

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Tamara Ursulović

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada: „Povezanost ekspresije PTEN proteina i prognoze bolesti kod žena obolelih od ranog karcinoma dojke lečenih ovarijalnom ablacijom“

Mentor : Prof. dr Vesna Plešinac Karapandžić

Komentor: N.Sar. dr Snežana Šušnjar

Potpisana: Tamara Ursulović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 16.05.2018.

Tamara Ursulović

**Prilog 3.**

**Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Povezanost ekspresije PTEN proteina i prognoze bolesti kod žena obolelih od ranog karcinoma dojke lečenih ovarijalnom ablacijom“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 16.05.2018.

Tamara Krstović