

**MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU**

Dr Zoran B. Kozomara

**Povezanost hipermetilacije promotora *BRCA1*, *p16*,
MGMT, *RASSF1* i *CDH-1* gena i toka bolesti
bolesnica sa estrogen-receptor, progesteron-receptor
i her-2 receptor negativnim karcinomom dojke**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Dr Zoran B. Kozomara

**Promotor hypermethylation of *BRCA1*, *p16*, *MGMT*,
RASSF1 and *CDH-1* genes in correlation with
clinical course of disease in estrogen receptor,
progesterone receptor and her-2 receptor negative
breast cancer**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Mentor: Prof Dr Radan Džodić, redovni profesor na Katedri za hirurgiju,
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komentor:

N.Sav. Dr sci med Mirjana Branković Magić, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Članovi komisije:

1. Prof. dr Svetislav Tatić, patolog, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu

2. Prof.dr. Vesna Plešinac Karapandžić, radiolog, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu

3.N.Sar.dr Snežana Šušnjar, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

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

- *Svom mentoru, Prof Dr Radanu Džodiću, na nesebičnoj pomoći i stručnom usmeravanju.*
- *Svom komentoru, Dr sc med Mirjani Branković Magić, NSav bez čije pomoći i podrške ovaj rad ne bi bio učinjen.*
- *Zahvaljujem se kolegama sa Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije koji odavaju Banku tumora Instituta i koji su učestvovali u pripremi i obradi uzoraka za dalje genetičke analize.*
- *Prof Dr Zvonku Magiću i Prof Dr Gordani Šupić sa Instituta za medicinska istraživanja VMA gde je za potrebe ove teze uradjen metilaciono specifični PCR.*
- *MSc Dušici Gavrilović, na statističkoj obradi i Dr sc Ani Krivokući, NS na grafičkoj obradi rezultata istraživanja.*
- *Mojim najbližima, koji su svojom ljubavlju bili moja svakodnevna podrška.*
- *Ovaj doktorat posvećujem bolesnicama iz Srbije, obolelim od karcinoma dojke.*

Povezanost hipermetilacije promotora *BRCA1*, *p16*, *MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena i toka bolesti bolesnica sa estrogen-receptor, progesteron-receptor i Her-2 receptor negativnim karcinomom dojke

REZIME

Uvod: Trostruko-negativni karcinom dojke (engl. triple-negative breast cancer –TNBC) predstavlja subtip karcinoma dojke koji zauzima 15-20% od svih karcinoma dojke, karakteriše se odsustvom receptora za ER i PR, kao i odsustvom povećane ekspresije Her-2 receptora. Kao posledica agresivnog tumorskog fenotipa, nemogućnosti sprovođenja ciljane antitumorske terapije zbog odsustva pomenutih receptora, kao i parcijalnog odgovora na hemioterapije koje se primenjuju za karcinom dojke, ovaj subtip ima lošu prognozu. Intenzivno se izučavaju molekulske mete za praćenje kliničkog toka bolesti i efekata antitumorke terapije. Epigenetičke promene igraju isto tako značajnu ulogu u nastanku kancera kao i promene koje se odvijaju u nivou gena.

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi da li metilacioni status promotora ispitivanih *BRCA1*, *p16*, *MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena kod bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke, kao prognostički najlošijom grupom karcinoma dojke sa agresivnim fenotipom, može da se poveže sa kliničkim tokom bolesti i da posluži kao eventualni pokazatelj prognoze bolesti.

Materijal i metode: U rad je uključena 131 bolesnica sa karcinomom dojke koje su na početku lečenja bile podvrgnute hirurškom lečenju (61 sa trostruko negativnim karcinomom dojke, a drugu grupu čini 70 bolesnica koje spadaju u najbolju prognostičku grupu karcinoma dojke (ER+, PR+, Her2-). Bolesnice su praćene između 1 i 87 meseci (medijana 78 meseci). Hipermetilacioni status promotorskog regiona *BRCA1*, *p16*, *MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena je određivan u tumorskom tkivu, obzirom da je metilacija tkivno i tumor specifična. DNK iz uzoraka sveže smrznutog tumorskog tkiva je izolovana metodom isoljavanja. Određivanje hipermetilacije promotora specifičnih gena je urađeno metilaciono-specifičnim PCR metodom.

Rezultati: Poređenje hipermetilacije promotora *BRCA1*, *p16*, *MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena pokazalo je da se ove dve grupe statistički značajno razlikuju samo u odnosu na učestalost hipermetilacije promotora *p16* gena – statistički značajno veći broj hipermetilacija promotora gena pronađen je u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke, 33 (54.1%) vs. 20 (28.6%), $p=0.00298$. Iako nije pokazana statistički značajna razlika u učestalosti hipermetilacije promotora *BRCA1* gena između ispitivanih grupa bolesnica, uočen je trend ka većem broju hipermetilacija u trostruko negativnom karcinomu dojke grupi

bolesnica: 33 (54.1%) prema 27 (38.6%), χ^2 test, $p=0.0752$. Ako se posmatra učestalost ko-metilovanih gena uočava se da je učestalost kometilovanih promotora **p16** i **RASSF1A** (**p16+RASSF1A+**) gena značajno veća u trostruko negativanom karcinomu dojke grupi nego u ER+PR+Her2- grupi : 20 (32.8%) prema 10 (14.3%), χ^2 test, $p=0.0225$. Pokazano je da se u trostruko negativanom karcinomu dojke grupi bolesnica veća učestalost hipermetilacije promotora **CDH1** gena javlja u podgrupi bolesnica sa prisutnim regionalnim metastazama u limfnim čvorovima (χ^2 test, $p=0.01952$). Kada se upoređi ko-metilacija **p16** i **RASSF1A** gena, (**p16+RASSF1A+**), uočava se da je DFS značajno kraći kod bolesnica sa oba metilovana gena iz trostruko negativnog karcinoma dojke grupe u odnosu na ER+PR+Her-2- grupu, log-rank test, $p=0.03272$.

Zaključak: Rezultati ovog rada ukazuju na to da hipermetilacija promotora **p16** i **RASSF1A** gena može biti marker loše prognoze u karcinomu dojke. Hipermetilacija ovih gena možda može uticati na klinički tok bolesti izdvajajući posebnu podgrupu bolesnica sa trostruko-negativnim karcinomom dojke sa još agresivnijim fenotipom. Obrasci DNK metilacije različitih tumor-asociranih gena mogu u budućnosti predstavljati neinvazivni marker za pojavu i razvoj maligne bolesti.

Ključne reči: karcinom dojke, epigenetičke promene, hipermetilacija, **BRCA1**, **p16**, **MGMT**, **RASSF1** i **CDH-1**

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: onkologija

UDK broj:

Promotor hypermethylation of *BRCA1*, *p16*, *MGMT*, *RASSF1* and *CDH-1* genes in correlation with clinical course of disease in estrogen receptor, progesterone receptor and Her-2 receptor negative breast cancer

ABSTRACT

Background: Triple-negative breast cancer, present with frequency of about 15-20% of all breast cancers, is characterized with the lack of estrogen, progesterone and Her-2 receptors and aggressive form of disease. As the consequence of aggressive tumor phenotype, lack of targeted anticancer therapy due to the absence of biological markers, as well as poor response to conventional chemotherapy, triple-negative breast cancer is associated with poor prognosis. Molecular targets that can serve as prognostic as well as predictive markers are intensively studied. It has been proposed that epigenetic changes in the cancer development are as significant as genetic changes.

Aim: This work was done in order to evaluate if methylation status of *BRCA1*, *p16*, *MGMT*, *RASSF1* and *CDH-1* genes in triple-negative breast cancer as prognostically the worst subtype of breast cancer, can be correlated with clinical course and can serve as prognostic markers of disease.

Material and Methods: 131 breast cancer patients with surgery as primary treatment were included: 61 with triple-negative breast cancer (TNBC) and 70 with estrogen, progesterone positive and Her2 negative (ER+, PR+, Her2-) breast cancer that represents prognostically the best subtype of breast cancer. The patients were followed up between 1 and 87 months (median 78 months). Status of promotor hypermethylation of *BRCA1*, *p16*, *MGMT*, *RASSF1* and *CDH-1* genes was determined in the tumor tissue since methylation is tissue and tumor specific. DNA was isolated from fresh frozen tissues by salting out procedure. Status of promotor hypermethylation was determined by methylation-specific PCR.

Results: There was statistically significant difference only in *p16* hypermethylated breast cancer cases when TNBC was compared with ER+PR+Her2- group, 33 (54.1%) vs. 20 (28.6%), $p=0.00298$. Although the difference between the incidences of *BRCA1* hypermethylation between the examined groups of patients did not reach statistical significance, we observed a tendency towards higher occurrence of *BRCA1* hypermethylation in TNBC compared to ER+PR+Her2- cases: 33 (54.1%) vs. 27 (38.6%), $p=0.0752$. When the frequencies of co-methylated (combined hypermethylation of the examined genes) *p16* and *RASSF1A* genes (*p16+RASSF1A+*) were compared between the breast cancer patients with TNBC and ER+PR+Her2- characteristics, we found that the number of

patients with both hypermethylated genes was significantly higher in the TNBC than in ER+PR+Her2- group: 20 (32.8%) vs. 10 (14.3%), $p=0.0225$. In TNBC group, the subgroup of patients with regional lymph node metastasis showed higher frequency of *CDH1* hypermethylation compared to those without regional lymph node metastasis (χ^2 test, $p=0.01952$). When we analyzed co-methylation of *p16* and *RASSF1A* (*p16+RASSF1A+*), we found that DFS was significantly shorter in the patients with both genes co-methylated in TNBC than with ER+PR+Her2- group, $p=0.03272$.

Conclusions: The obtained data indicate that hypermethylated *p16* and *RASSF1A* cell-cycle inhibitor genes might be considered as biomarkers for bad prognosis in breast cancer patients. Hypermethylation of these genes may influence clinical course of disease distinguishing a particular group of TNBC patients with even more aggressive phenotype. Pattern of DNA methylation of various tumor-associated genes could be a powerful future non-invasive screening marker.

Keywords: breast cancer, epigenetic changes, hypermethylation, *BRCA1*, *p16*, *MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1*

Scientific field: medicine

Scientific subfield: oncology

UDK number:

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Karcinom dojke	1
1.2. Epidemiologija.....	1
1.3. Faktori rizika za nastanak karcinoma dojke	3
1.4. Određivanje kliničkog stadijuma karcinoma dojke - TNM klasifikacija karcinoma dojke	5
1.5. Prognostički i prediktivni faktori rizika karcinoma dojke	9
1.5.1. Prisustvo udaljenih metastaza	11
1.5.2. Veličina tumora i histološki tipovi karcinoma dojke	11
1.5.3. Stepen histološke diferencijacije karcinoma (gradus)	13
1.5.4. Status aksilarnih limfnih nodusa	14
1.5.5. Biološki marker karcinoma dojke – steroidni receptori.....	15
1.5.6. Biološki marker karcinoma dojke - HER2	16
1.5.7. Biološki marker karcinoma dojke Ki-67.....	17
1.5.8. Kompletan patohistološki odgovor na terapiju kao prognostički faktor	17
1.5.9. Drugi prognostički faktori	18
1.6. Biološka klasifikacija karcinoma dojke	18
1.6.1. Luminalni A tip karcinoma dojke.....	19
1.6.2. Luminalni B tip karcinoma dojke.....	19
1.6.3. Trostruko negativni karcinom dojke	19
1.6.4. HER2 pozitivni karcinom dojke	20
1.7. Epigenetičke promene u karcinomu dojke-hipermetilacije promotora gena	20
1.7.1. <i>BRCA1</i> gen i značaj hipermetilacije promotora u karcinomu dojke	23
1.7.2. p16 gen i značaj hipermetilacije promotora u karcinomu dojke	24
1.7.3. <i>O⁶MGMT</i> gen i značaj hipermetilacije promotora u karcinomu dojke	25
1.7.4. <i>RASSF1</i> gen i značaj hipermetilacije promotora u karcinomu dojke	25
1.7.5. <i>CDH-1</i> gen i značaj hipermetilacije promotora u karcinomu dojke	25
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	27
3. MATERIJAL I METODE	28
3.1. Bolesnice	28

3.1.1. Grupa trostruko negativnog karcinoma dojke.....	28
3.1.2. Grupa steroid receptor pozitivnog Her2 negativnog karcinoma dojke	29
3.2. Izolovanje genomske DNK metodom isoljavanja.....	32
3.3. Merenje koncentracije DNK.....	32
3.4. Određivanje hipermetilacije promotora specifičnih gena metilaciono-specifičnim PCR-om.....	32
3.5. Statističke metode	33
4. REZULTATI	35
4.1. Poređenje podataka u odnosu na klinički tok bolesti.....	35
4.2. Poređenje hipermetilacije promotora <i>BRCA1</i> , <i>p16</i> , <i>O⁶MGMT</i> , <i>RASSF1</i> i <i>CDH-1</i> gena.....	46
4.3. Poređenje ko-metilacije promotora <i>BRCA1</i> , <i>p16</i> , <i>O⁶MGMT</i> , <i>RASSF1</i> i <i>CDH-1</i> gena	48
4.4. Poređenje pojave lokalnog recidiva i metastaza bolesti.....	49
5. DISKUSIJA	57
6. ZAKLJUČCI.....	72
7. LITERATURA	73

1. UVOD

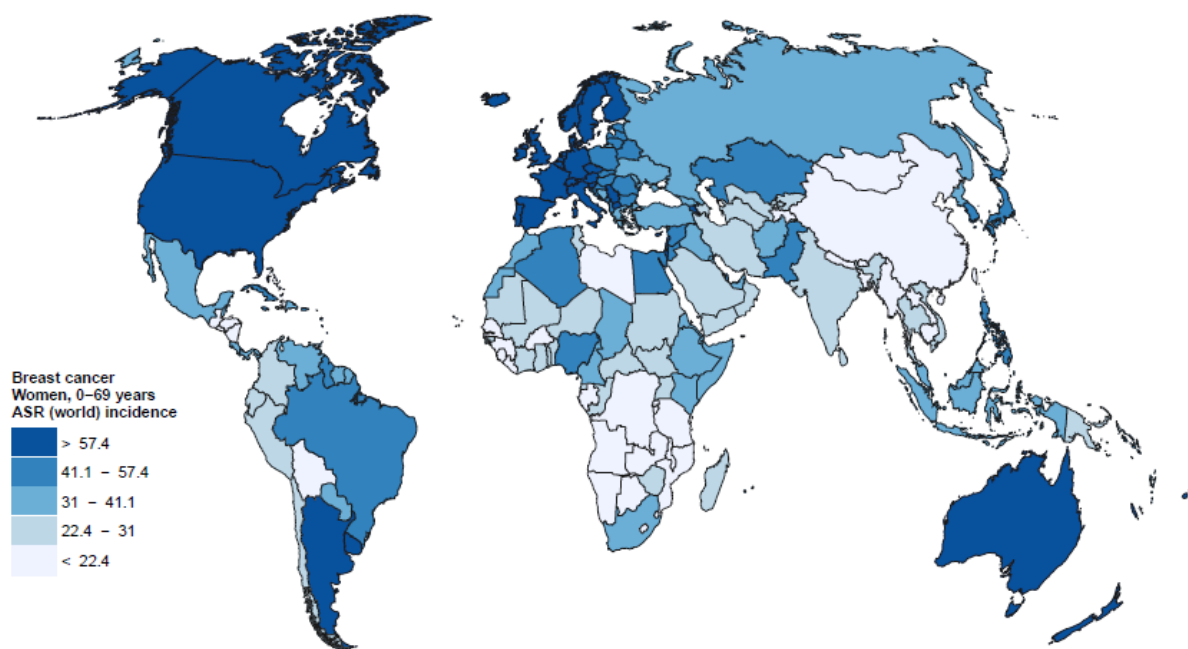
1.1. Karcinom dojke

Karcinom dojke je najzastupljenije maligno oboljenje i jedan od vodećih uzroka smrtnosti od malignih oboljenja među ženama u industrijski-razvijenim zemljama, u najvećoj mjeri zbog sklonosti primarnih karcinoma dojke da metastaziraju do limfnih čvorova u pazušnjakama i udaljenih mesta u organizmu. Karcinom dojke predstavlja heterogenu bolest sa različitim morfološkim i molekularnim karakteristikama, biološkim ponašanjem i reagovanjem na terapiju. Predstavlja najrasprostranjeniji maligni tumor kod žena, odgovoran za 20% smrtnih ishoda u onkologiji, po čemu je u populaciji između 30-55-te godine, na prvom mestu (1).

1.2. Epidemiologija

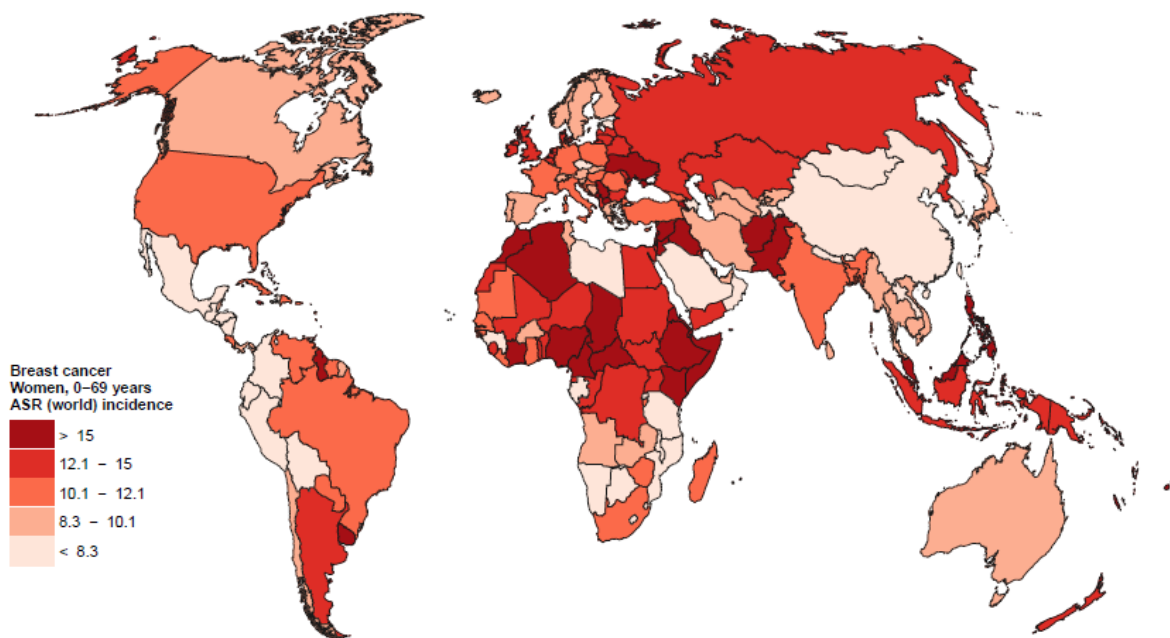
Karcinom dojke je najčešći zloćudni tumor kod žena širom sveta i čini više od 20% svih malignih bolesti u ženskoj populaciji (2). Godišnje u svetu se registruje preko 1,5 miliona novih slučajeva bolesti (u Evropi preko 360.000) i preko 500.000 smrtnih ishoda sa ovom dijagnozom (u Evropi oko 92.000) (3, 4). Kumulativna verovatnoća obolevanja iznosi oko 12,5%, odnosno jedna od osam žena može očekivati da će tokom svoga života oboleti od ove bolesti (5). Epidemski talas karcinoma dojke pogađa i razvijene i zemlje u razvoju.

Geografska distribucija karcinoma dojke na globalnom nivou nije ravnomerna. Područja u kojima se registruje najviša učestalost bolesti su zapadna Evropa, severna Amerika i Australija, što se pripisuje višoj prevalenciji poznatih faktora rizika za ovu bolest u pomenutim regionima. Nešto niži rizik od pojave oboljenja javlja se u manje razvijenim regionima subsaharske Afrike, južne i istočne Azije, uključujući i Japan, gde je verovatnoća za pojavu karcinoma dojke tri puta manja nego u zemljama Evrope i Amerike (vidi sliku 1.).



Slika 1. Procenjena incidenca raka karcinoma dojke širom sveta u 2012, kod populacije od 100.000 ljudi; Svetska zdravstvena organizacija; WHO 2015;
<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>

Uvođenjem organizovanog skrininga za karcinom dojke, novih metoda rane dijagnostike i ciljane onkološke terapije, smrtnost od ove bolesti u Americi i zemljama EU opada iz godine u godinu (vidi sliku 2), tako da je u poslednjih 35 godina smanjena za 35% (6).



Slika 2. Procenjena smrtnost raka dojke širom sveta u 2012, kod populacije od 100.000 ljudi; Svetska zdravstvena organizacija; WHO 2015; <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>

U Srbiji je karcinom dojke vodeći uzrok smrti žena i godišnje se otkrije oko 4000 novodijagnostikovanih slučajeva karcinoma dojke (7). Prosečna standardizovana stopa incidencije raka dojke u centralnoj Srbiji u periodu 1999-2009. godine iznosila je 60,8/100.000, a mortalitetna stopa 20,2/100.000 (8), a u evropskim zemljama je smrtnost od karcinoma dojke na trećem mestu, posle karcinoma pluća i kolorektalnog karcinoma.

1.3. Faktori rizika za nastanak karcinoma dojke

Pravi uzročnik karcinoma dojke nije poznat ni danas. Mnogobrojna istraživanja i studije bave se definisanjem etioloških faktora odgovornih za nastanak karcinoma dojke. I pored toga nije u potpunosti poznato koji sve činioci i na koji način dovode do pokretanja mehanizma i nastanka bolesti. Epidemiološka analiza ukazuje na tri moguće grupe činilaca: genske, endokrine i egzogene činioce. Oni dovode do aktivacije protoonkogena, inaktivacije tumor-supresor gena i inaktivacije gena odgovornih za reparaciju oštećene DNK (9).

Poznato je više faktora rizika, koji ako postoje mogu povećati rizik za nastanak karcinoma dojke. Ali srećemo i bolesnice koje su obolele a da nisu imale ni jedan poznati faktor rizika.

U literaturi se navode mnogobrojni faktori rizika za nastanak karcinoma dojke. Ženski pol - žene oboljevaju 100 puta češće od muškaraca (10); Godine starosti - sa starenjem povećava se i rizik za nastanak karcinoma dojke, tako da u 95% obolelih čine žene starije od 40 godina (4); Genski faktori - navodi se da su genetske mutacije odgovorne za 5-10% žena obolelih od karcinoma dojke. Kod pozitivne porodične anamneze za karcinom dojke, taj procenat raste čak na 15-20% (5, 11). Rizik za nastanak bolesti zavisi od stepena srodstva, pola obolelih srodnika i njihovog broja, njihove starosti kada je otkriven karcinom dojke. Na osnovu sumnje da je prisutna nasledna forma bolesti, indikuje se određivanje mutacije u tumor supresorskim genima **BRCA1** (breast cancer type I susceptibility protein) ili BRCA2. Ove mutacije prenose se na potomstvo na autozomno-dominantan način. Takođe kao faktor rizika se navodi predhodni rak dojke: žene koje su bolovale i bile lečene od karcinoma dojke, imaju veći rizik za ponovni karcinom dojke u istoj ili kontralateralnoj dojci (5, 10, 11, 12); tu možemo dodati i one operisane žene zbog benigne promene na dojci, ali sa patohistološkim nalazom atipična hiperplazija, sklerozirajuća adenoza i duktalna papilomatoza, ako se otkriju u mlađem uzrastu, mogu povećati rizik za rak dojke (13, 14).

Takođe da pomenemo i reproduktivni faktor: rana menarha (pre 12-te godine), kasna menopauza (posle 55-te godine), nerađanje, nedojenje, kasni prvi porođaj (posle 30-te godine) povećavaju rizik za nastanak karcinoma dojke (15, 16). Upotreba kontraceptivnih pilula i upotreba kombinovane supstitucione terapije u menopauzi povećava rizik za karcinom dojke (17). Takođe se navodi da povećanje telesne težine, odnosno povećan BMI (body mass index) povećava rizik za karcinom dojke (18).

Rizik za karcinom dojke povećava se kod osoba koje su u mladosti tokom puberteta bile izložene zračenju. Rizik raste sa povećanjem doze i dužinom izloženosti zračenju i povećava se sa vremenom proteklim od zračenja. Primer je terapijsko zračenje limfoma u detinjstvu (19).

Gustina tkiva dojke na mamografskom snimku: gustina tkiva dojke 75% (ACR 3) povezuje se sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke, u odnosu na mamografski nalaz bez povećane gustine (ACR 1 i 2) (20).

Takođe se navodi da svakodnevno konzumiranje po četiri alkoholna pića na dan povećava rizik za karcinom dojke za 30% (21, 22). I ishrana bogata kalorijama, mastima i proteinima životinjskog porekla, uz fizičku neaktivnost, dovode do gojaznosti i tako na indirektan način povećava se rizik za karcinom dojke (23).

Fizička neaktivnost se navodi kao nezavistan faktor za nastanak karcinoma dojke. Osobe koje su fizički neaktivne imaju 7-30% veći rizik za nastanak karcinoma dojke od onih fizički aktivnih (24).

I pored poznavanja brojnih faktora rizika za karcinom dojke, više od 70% obolelih žena starijih od 50 godina, nemaju u anamnezi nijedan poznati faktor rizika (25).

1.4. Određivanje kliničkog stadijuma karcinoma dojke - TNM klasifikacija karcinoma dojke

Kod primarnog malignog tumora dojke, pre započinjanja lečenja neophodno je izvršiti kompletnu dijagnostičku obradu koja omogućava TNM klasifikaciju bolesnika sa karcinomom dojke, na osnovu koje se određuje stadijum bolesti i donosi odluka konzilijuma o daljem lečenju (26, 27).

TNM klasifikacija uključuje veličinu primarnog tumora, proširenost tumora u regionalne limfne čvorove i udaljene metastaze.

TNM klasifikacija tumora dojke (28):

T - primarni tumor:

TX - primarni tumor se ne može odrediti

T0 - primarni tumor nije dokazan

Tis - karcinom in situ

T1 - tumor \leq 2 cm

T1a: tumor $>$ 0,1 cm, ali ne veći od 0,5 cm

T1b: tumor $>$ 0,5 cm, ali ne veći od 1 cm

T1c: tumor $>$ 1 cm, ali ne veći od 2 cm

T2 - tumor $>$ od 2 cm, ali ne veći od 5 cm

T3 - tumor $>$ 5 cm

T4 - tumor bilo koje veličine sa direktnim širenjem na zid grudnog koša ili kožu

T4a: širenje u zid grudnog koša

T4b: ulceracija kože dojke, istostrani satelitski čvorovi u koži ili edem kože (uključujući peau d'orange)

T4c: 4a i 4b

T4d: inflamatorni karcinom

Klinička klasifikacija regionalnih limfnih čvorova (N):

NX - regionalni limfni čvorovi se ne mogu proceniti (npr. prethodno su uklonjeni)

N0 - regionalni limfni čvor bez metastaze

N1 - metastaza u pokretnom istostranom aksilarnom limfnom čvoru/čvorovima nivoa I i II

N2 - metastaze u istostranom aksilarnom limfnom čvoru/čvorovima nivoa I i II, klinički fiksirani ili sliveni ili klinički evidentnom istostranom limfnom čvoru/čvorovima oko arterije mamarije interne (ili unutrašnje mamarne arterije) u odsustvu klinički evidentnih metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

N2a - metastaze u aksilarnom limfnom čvoru/čvorovima fiksirane međusobno (slivene) ili za druge strukture

N2b - metastaze samo u klinički evidentnom limfnom čvoru/čvorovima oko arterije mamarije interne (ili unutrašnje mamarne arterije) u odsustvu klinički evidentnih metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

N3 - metastaze u istostranom infraklavikularnom (nivo III aksile) limfnom čvoru/čvorovima sa ili bez zahvatanja limfnih čvorova nivoa I i II aksile ili u klinički evidentnom limfnom čvoru/čvorovima oko arterije mamarije interne (ili unutrašnje mamarne arterije) sa klinički evidentnim metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima ili metastaza u istostranom supraklavikularnom limfnom čvoru/čvorovima sa ili bez zahvatanja aksilarnih ili limfnih čvorova oko arterije mamarije interne

N3a - metastaze u infraklavikularnom limfnom čvoru/čvorovima

N3b - metastaze u limfnom čvoru/čvorovima aksile ili oko arterije mamarije interne

N3c - metastaze u supraklavikularnom limfnom čvoru/čvorovima

Patohistološka klasifikacija regionalnih limfnih čvorova (pN):

pNX - regionalni limfni čvorovi se ne mogu proceniti (nisu uklonjeni radi ispitivanja ili su prethodno uklonjeni)

pN0 - regionalni limfni čvor bez metastaze

pN1 - mikrometastaze ili metastaza u 1 do 3 istostrana aksilarna limfna čvora, odnosno istostranim unutrašnjim čvorovima dojke sa metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog čvora, ali klinički nije očigledna.

pN1mi - mikrometastaza (veća od 0,2 mm i/ili više od 200 ćelija, ali ne veće od 2 mm)

pN1a - metastaza u 1 do 3 aksilarna limfna čvora, uključujući bar jedan čija najveća dimenzija prelazi 2 mm

pN1b - unutrašnji limfni čvorovi dojke sa mikroskopskom metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog čvora, ali koja klinički nije očigledna

pN1c - metastaza u 1 do 3 limfna čvora, a unutrašnji limfni čvorovi dojke sadrže mikroskopsku metastazu otkrivenu disekcijom stražarskog limfnog čvora, koja nije klinički očigledna

pN2 - metastaze u 4-9 istostranih aksilarnih limfnih čvorova, ili klinički očigledan limfni čvor duž mamarije interne u odsustvu aksilarnih limfonodalnih metastaza

pN2a - metastaza u 4-9 aksilarnih limfnih čvorova, uključujući bar jedan koji je veći od 2 mm

pN2b - metastaza u klinički očiglednom unutrašnjem limfnom čvoru/čvorovima dojke, u odsustvu metastaze aksilarnog limfnog čvora.

pN3 - metastaze opisane kao:

pN3a - metastaza u 10 ili više aksilarnih limfnih čvorova (od kojih je bar jedan veći od 2 mm) ili metastaza u infraklavikularnim limfnim čvorovima

pN3b - metastaza u klinički očiglednom unutrašnjem limfnom čvoru/čvorovima) dojke u prisustvu pozitivnog aksilarnog limfnog čvora/čvorova ili metastaza u više od 3 aksilarna

limfna čvora i u unutrašnjim limfnim čvorovima dojke sa mikroskopskom metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog čvora, a koja nije klinički očigledna.

pN3c - metastaza u supraklavikularnom limfnom čvoru (čvorovima).

M - udaljene metastaze:

MX - postojanje udaljenih metastaza ne može se odrediti

M0 - nema udaljenih metastaza

M1 - udaljene metastaze

Tabela 1. Stadijumi karcinoma dojke prema TNM klasifikaciji (Edge B, Byrd R, Compton C. AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: Springer; 2010.)

Stadijum			
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
T1		N1	M0
T2		N0	M0
IIB	T2	N1	M0
T3		N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
T1		N2	M0
T2		N2	M0
T3		N1	M0
T3		N2	M0
IIB	T4	N0	M0
T4		N1	M0
T4		N2	M0
IIIC	svaki T	N3	M0
IV	svaki T	svaki N	M1

1.5. Prognošički i prediktivni faktori rizika karcinoma dojke

Karcinom dojke je heterogena bolest koja obuhvata brojne entitete sa specifičnim patološkim karakteristikama i različitim biološkim ponašanjem. U trenutku postavljanja dijagnoze, kod

mnogih bolesnica obolelih od primarnog karcinoma dojke u ranoj fazi su prisutne mikro-metastaze u organizmu zbog čega postoji određena verovatnoća za nastanak udaljenih metastaza, a samim tim i za razvoj metastatske bolesti i smrtni ishod (29).

Zato je važno da se za svakog pojedinačnog bolesnika predvidi rizik za pojavu udaljenih metastaza.

Prognoza bolesti vrlo je različita pa se izbor najprikladnijeg terapijskog pristupa procenjuje individualno prema čitavom nizu prognostičkih faktora (29).

Prognostički faktori predstavljaju različite kliničke, mikroskopske i imunohistohemijske karakteristike malignog tumora, na osnovu kojih možemo da procenjujemo agresivnost tumora i predvidimo prognozu bolesti. Oni se određuju iz tkiva tumora nakon biopsije ili operacije dojke. Prognostički faktori su u vezi sa karakteristikama tumora, dok su prediktivni faktori povezani sa reagovanjem na terapiju. Neki faktori, kao status estrogenskih i progesteronskih receptora (ER/PR) i HER2 amplifikacija i/ili overekspresija, su i prognostički i prediktivni, jer na osnovu njih određujemo i odgovarajući terapijski tretman (29, 30). Prognostički faktori kod karcinoma dojke mogu se grubo podeliti na one tradicionalne i novije koji obuhvataju niz faktora od kojih su mnogi još predmet ispitivanja i kliničkih studija (29). Standardni (klasični) prognostički faktori kod karcinoma dojke mogu biti vezani za bolesnicu, a isto tako i za tumor (26).

Faktori vezani za bolesnicu su:

- prisustvo udaljenih metastaza
- starost (starosna granica nije jasno definisana; smatra se da bolesnice mlađe od 35 godina imaju lošiju prognozu) (31)
- menstrualni status
- komorbiditeti, početni nivo tumor markera Ca 15.3.

Faktori vezani za tumor:

- patološka veličina tumora
- patohistološke karakteristike tumora (patohistološki tip, gradus maligniteta, limfovaskularna invazija, Nottingham prognostički indeks) (21)
- status aksilarnih limfnih nodusa
- status estrogenskih i progesteronskih receptora
- status HER2/neu (c-erb B2) onkogeno
- Ki-67 marker ćelijske proliferacije
- ostali faktori (niz patoloških i bioloških faktora koji se nalaze u procesu istraživanja radi ocene njihovog kliničkog značaja).

1.5.1. Prisustvo udaljenih metastaza

Prisustvo udaljenih metastaza je dokazano najznačajniji prognostički faktor (32). Hematogene metastaze vode generalizovanoj diseminaciji karcinoma dojke u kosti, pluća, jetru, jajnike, nadbubrežne žlezde, pleuru i druga mesta. Najčešće zahvaćene kosti su rebra, lobanjske kosti, kičmeni pršljenovi, humerus i klavikula. Navodi se da 25% žena obolelih od karcinoma dojke još prilikom dijagnostikovanja bolesti poseduje mikrometastatske depozite u kosnoj srži, što umanjuje i preživljavanje (33). Metastaze karcinoma dojke u kosti su, slično drugim tipovima karcinoma, najčešće osteolitičke, a u oko 10% slučajeva su osteoblastičnog tipa (34). Ukoliko je metastatska bolest prisutna samo u kostima, takve bolesnice imaju bolju prognozu nego one sa visceralnim metastazama (35).

1.5.2. Veličina tumora i histološki tipovi karcinoma dojke

Veličina tumora je jedan od važnijih prognostičkih faktora, posebno u bolesnica bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima (36). Predstavlja jednu od komponenti TNM sistema za određivanje stadijuma bolesti. Može se odrediti klinički, (palpacijom, mamografski) i patološko-anatomski (direktno merenje ekstripiranog tumora i mikroskopski). Između veličine tumora i preživljavanja postoji pozitivna korelacija, odnosno bolesnice sa manjim tumorima imaju bolju prognozu (26, 36, 37). Mali invazivni

tumor udružen sa ekstenzivnom DCIS G.III komponentom ima lošiju prognozu od malih tumora bez DCIS ili sa DCIS G.I (34).

Kod multifokalnih tumora, promer najvećeg tumora je uzor za stažiranje, ali je prognoza multifokalnih tumora ipak lošija od unifokalnih tumora sličnih dimenzija jer su češće aksilarne metastaze (38).

Histopatološki tip tumora je važan prognostički faktor. Skoro 90% karcinoma dojke nastaje iz duktalnog epitela i to pretežno od terminalnih duktusa, a samo 10% od acinusa dojke. Karcinom dojke pokazuje infiltrativan rast, limfogenu i hematogenu diseminaciju. Širenje duž limfnih sudova, nerava i krvnih sudova (perineuralna, perivaskularna diseminacija) znak je rane diseminacije karcinoma ka limfnim nodusima (39). Invazivnost je jedan od glavnih pokazatelje maligniteta, a uz metastaziranje, glavni uzrok letaliteta. Predstavlja sposobnost maligne ćelije da se odvoji od osnovne, intraepitelno lokalizovane tumorske mase, da probije bazalnu membranu i izvrši infiltraciju i destrukciju okolnog tkiva (40). Prema ovoj fenotipskoj osobini, karcinomi dojke mogu biti: *in situ* karcinomi (neinvazivni), mikroinvazivni (invazija od 3-5mm) i invazivni karcinomi.

Svetska zdravstvena organizacija (WHO) je, obzirom na histološki tip tumora, predložila sledeću podelu invazivnih karcinoma dojke (41):

1. Invazivni duktalni karcinom (NOS-not otherwise specified)
2. Invazivni duktalni karcinom sa predominantnom intraduktalnom komponentom
3. Medularni karcinom
4. Koloidni (mucinozni) karcinom
5. Papilarni karcinom
6. Tubularni karcinom
7. Invazivni kribriformni karcinom
8. Invazivni lobularni karcinom
9. Adenoidno-cistični karcinom
10. Sekretorni (juvenilni) karcinom

11. Apokrini karcinom
12. Signet ring cell karcinom
13. Metaplastični karcinom
14. Drugi karcinomi

Lošiju prognozu imaju duktalni karcinom, lobularni i medularni, dok nešto bolju prognozu imaju tubularni, mucinozni i kribriformni karcinom (42). Duktalni karcinom je najčešći tip karcinoma dojke, koji čini ukupno 65-80% svih karcinoma dojke. Lobularni karcinom je na drugom mestu po učestalosti među invazivnim karcinomom dojke i na njega otpada od 5-10% svih karcinoma dojke. Medularni karcinom se češće sreće kod mlađih žena koje su nosioci *BRCA1* i *BRCA2* mutacija, dok je mucinozni karcinom češći kod starijih žena (43).

1.5.3. Stepen histološke diferencijacije karcinoma (gradus)

Predstavlja značajan prognostički faktor. Stepen histološke diferencijacije odnosno histološki gradus ima za cilj da ukaže na manju ili veću agresivnost tumora i samim tim predstavlja jedan od standardnih prognostičkih parametara, naročito za invazivne karcinome veće od 10 mm (36). Histološki gradus tumora obuhvata dve, međusobno nezavisne osobine malignih ćelija: proliferativnost i diferentovanost (44). Proliferativnost je izražena kroz prisustvo malignih ćelija u mitozu, hiperhromatizam i pleomorfizam. Diferentovanost je izražena kroz prisustvo /odsustvo sposobnosti malignih ćelija da obrazuju tkivo (tubularne strukture) dojke (45).

Prilikom određivanja histološkog gradusa (G) analiziraju se tri osobine tumora, koje se graduiraju od 1 do 3: 1. formiranje tubula, 2. nuklearni polimorfizam i 3. broj mitozu. Histološki gradus izračunava se iz zbira bodova iz čega proizlaze gradusi (46):

G1 (dobro diferentovani) - 3 do 5 bodova

G2 (umereno diferentovani) - 6 do 7 bodova

G3 (slabo diferentovani) - 8 do 9 bodova (46, 47).

Nottinghamski prognostički index (NPI – tabela 2) bazira se na standardnim prognostičkim faktorima (veličini tumora, statusu aksilarnih limfnih nodusa i histološkom gradusu) (36, 46). Koristi se u kliničkoj praksi u nekim evropskim zemljama (Velika Britanija) i pokazano je da značajno predviđa preživljavanje bolesnica prema grupama NPI u petogodišnjem praćenju.

NPI se izračunava sabiranjem: veličina tumora (cm) x 0,2 + status limfnih čvorova (1-3; 1- bez pozitivnih nodusa, 2-jedan do tri pozitivna nodusa, 3- više od četiri pozitivna nodusa) + histološki gradus (1-3).

Tabela 2. Nottinghamski prognostički indeks (NPI)

NPI	Prognoza	Preživljavanje 15 godina
<3,4	Dobra	80%
3,4-5,4	Osrednja	42%
>5,4	Loša	8%

Tako da je kod skora većeg od 5,4 loša prognoza (5-ogodišnje preživljavanje 50%, 15-togodišnje preživljavanje 8%)(48).

1.5.4. Status aksilarnih limfnih nodusa

Izuzetno važan prognostički faktor u bolesnica sa karcinomom dojke koji ukazuje na verovatnoću recidiva bolesti, i predstavlja značajan parametar pri selekciji bolesnica kod kojih treba primeniti adjuvantnu hemioterapiju (34, 36). Status se određuje prilikom operacije dojke biopsijom limfnog čvora stražara (“sentinel” nodus - SN) ili disekcijom limfnih nodusa pazušne jame, pri čemu je preporuka da bude uklonjeno i PH pregledano 10 limfnih nodusa iz I i II nivoa aksile po Bergu. Disekcija III nivoa zavisi od intraoperativnog nalaza, a postoji i preporuka za ex tempore PH pregled limfnog čvora na spoju drugog i trećeg sprata (49).

Rizik pojave recidiva i ukupno preživljenje zavise od broja zahvaćenih limfnih čvorova (50). Bolesnice sa negativnim limfnim čvorovima imaju petogodišnje preživljenje bez bolesti preko 80%, a ako su čvorovi pozitivni, preživljenje je ispod 65%, odnosno prognoza je lošija

što je broj zahvaćenih limfnih čvorova veći. Nivo zahvćenosti limfnih čvorova takođe je prognostički značajan. Naime, metastaze u viši nivo aksile i apeks ukazuju na lošiju prognozu (51).

Nakon pazuha, drugo po važnosti drenažno područje je u limfne čvorove duž unutrašnje mamarne arterije. Oni su zahvaćeni ukupno u 22% slučajeva, češće kod tumora u medijalnoj polovini dojke i kod pozitivne aksile. Supraklavikularni limfni čvorovi zahvaćeni su u oko 20% slučajeva sa pozitivnom aksilom, a gotovo nikad nisu zahvaćeni kod negativne aksile (52).

1.5.5. Biološki marker karcinoma dojke – steroidni receptori

Status steroidnih receptora (SR), t.j. estrogenih i progesteronskih (ER/PR) predstavlja značajan prognostički i najznačajniji prediktivni faktor za procenu hormonske senzitivnosti tumora i reagovanja na hormonsku terapiju (53, 54). Na celularnom nivou na ciljanim organima hormoni deluju vežući se na specifične receptore (receptori za hidrofilne hormone su na membrani, a za lipofilne steroidne hormone su unutar ćelije, najviše unutar jedra). Steroidni receptori su tkivno specifične belančevine, koje imaju visok afinitet za steroidne hormone. Spajanjem nastaje kompleks steroidni hormon-receptor. Neki od gena, čija je aktivnost regulisana steroidnim receptorima, su uključeni u kontrolu ćeliskog ciklusa. Temeljno načelo hormonske terapije jeste sprečavanje uticaja rasta tumora hormonima (onemogućavanjem spajanja stimulišućeg hormona i receptora u tumorskoj ćeliji).

Imunohistohemiskom analizom tumorske ćelije na tkivnim presecima iz parafinskog bloka određuje se ekspresija ER i PR u skladu sa tkz. "jednostavnim bod sistemom (55). Boduje se procenat imunoreaktivnih jedara tumorskih ćelija i intenzitet imunoreaktivnog bojenja jedara. Visok sadržaj receptora ukazuje da će odgovor na hormonsku terapiju biti dobar. Pozitivan status steroidnih receptora je povoljan prognostički faktor (32).

Definicija receptor pozitivnog tumora podrazumeva pozitivan status oba (ER/PR) ili samo jednog. Receptor negativan tumor smatra se onaj sa negativnim i ER i PR. Oko 60-75% svih

karcinoma dojke je hormonski pozitivno (56, 57). Receptor pozitivni karcinomi dojke su češći u postmenopauznih žena, dok su negativni receptori češći u mlađih žena (34).

1.5.6. Biološki marker karcinoma dojke - HER2

Status HER/2 neu receptora - c-erb B2 (receptor za humani epidermalni faktor rasta-2) predstavlja značajan prognostički i prediktivni faktor za ciljanu terapiju trastuzumabom (58).

Do sada su nađena četiri HER membranska receptora (proteina): HER1/EGFR, HER2, HER3 i HER4 (36). HER receptori se sastoje iz tri regiona: ekstracelularno područje za vezivanje liganda, područje u kome se receptor vezuje za ćelijsku membranu i intracelularno područje sa aktivnošću tirozin kinaze. U inaktivnom stanju HER receptori su monomeri. Vezivanjem liganda i aktivacijom receptora dolazi do njihove homo i heterodimerizacije i aktivacije enzima tirozin kinaze. Na taj način aktivira se kaskadni mehanizam biohemijskih promena u samoj ćeliji što dovodi do ćelijske proliferacije, apoptoze, angiogeneze, promena u adhezivnosti i motilitetu ćelija (59, 60). Poremećaj neke faze ovog mehanizma dovodi do prekomerne proliferacije, migracije ćelija i njihovog metastaziranja (60).

Prisustvo HER 2 receptora na površini tumorske ćelije određuje se imunohistohemijskom (IHH) metodom na parafinskim blokovima, korišćenjem monoklonskih antitela koji se specifično vezuju za ektramembranski deo receptora. Za preciznije određivanje rezultata koriste se fluorescentna in situ hibridizacija (FISH), hromogena in situ hibridizacija (CISH) i srebrom poboljšana in situ hibridizacija (SISH). Rezultati testiranja izražavaju se skalom od 0 do 3+. Rezultat je negativan kod skora 0, 1 i 2+ (retestiranjem ako je negativna amplifikacija). Pozitivan je nalaz 2+ (retestiranjem prisutna amplifikacija) i 3+(61).

HER2 pozitivnost je negativan prognostički faktor, povezana je sa agresivnim tokom bolesti, kraćim vremenskim intervalom do relapsa i lošijim preživljavanjima (62). Povećana ekspresija HER2 udružena je i sa drugim faktorima loše prognoze karcinoma dojke, kao što su pozitivni limfni čvorovi, veći promer tumora, loš stepen histološke diferentovanosti, visoka proliferaciona stopa i negativan estrogen i progesteron receptorni status (63).

HER2 pozitivnost nađena je u 10-40% invazivnih duktalnih karcinoma dojke dok se ređe sreće kod lobularnog karcinoma (64).

Poslednjih decenija najveće interesovanje postoji oko blokade HER 2 receptora u ciljanoj (target) terapiji kod karcinoma dojke. Kod bolesnica sa HER2 pozitivnim tumorom dojke primenjuje se anti-HER2 terapija (58).

1.5.7. Biološki marker karcinoma dojke Ki-67

Indeks proliferacije Ki-67 takođe se ubraja u prognostičke faktore za karcinom dojke (65). Jedna od metoda za određivanje stepena proliferacije u tumoru je imunohistohemijska, korišćenjem anti-Ki-67 antitela (MIB-1) koje markira jedra u svim fazama ćelijskog ciklusa osim G0 i rane G1 faze. Visok nivo ekspresije Ki-67 proteina (veće od 14%) povezan je sa visokim histološkim gradusom tumorske ćelije, komedo tipom nekroze tkiva kao i prisustvom mikroinvazija (66).

Tumori koji imaju veću proliferativnu aktivnost imaju lošiju prognozu i kraći interval do pojave relapsa (67). Studije koje su ispitivale prediktivni značaj indeksa proliferacije kod bolesnica koje su primale hemio ili endokrinu terapiju, nisu pokazale da se protein Ki-67 može smatrati samostalnim prediktorom odgovora na terapiju (68). Generalno, podaci ukazuju na to da bolesnice sa visokim indeksom proliferacije imaju bolji odgovor na delovanje taksana u odnosu na netaksansku terapiju, kao i na delovanje terapije letrozolom u odnosu na tamoksifen (68).

1.5.8. Kompletan patohistološki odgovor na terapiju kao prognostički faktor

Rezultati brojnih neoadjuvantnih studija ukazuju na to da se bolesnice koje su ostvarile kompletan patohistološki odgovor (pCR) na terapiju, imaju bolju prognozu i duže žive. To sugerše pCR kao značajan prognostički faktor (69). Definicija pCR je bila različita u studijama koje su ispitivale značaj postizanja pCR na ishod bolesti: jedne studije su pratile samo pCR u dojci, sa ili bez prisustva DCIS, a druge su imale strožiji kriterijum – pCR tumora u dojci i negativan nodalni status (70, 71). Analiza Nemačke grupe za dojku (GBG)

da kod luminal A i luminal B karcinoma dojke, pCR nema uticaj na preživljavanje, dok je kod bolesnica sa visoko proliferativnim karcinomom dojke poput trostruko negativnog karcinoma dojke i HER 2+/ER – tumora, pCR značajno utiče na preživljavanje i može ove bolesnice podeliti na grupu sa lošom i grupu sa dobrom prognozom (71). Nedavna meta analiza navodi da je nakon neoadjuvantne hemioterapije bolesnica sa karcinomom dojke, pCR kao prognostički faktor značajan samo kod trostruko negativnog karcinoma dojke i HER2+/ER- karcinom dojke (72).

1.5.9. Drugi prognostički faktori

Tu spadaju faktori koji mogu imati prognostički značaj, ali se ne koriste u rutinskoj praksi, ili su još u procesu istraživanja. Tu spadaju:

- Tumor supresorski geni (p53; nm23) (73).
- Ostali faktori (hsp27; katepsin D; TGF alfa, urokinaza plazminogen aktivator) (74, 75).
- Profil genske ekspresije pojedinačnih tumora (laboratorijskim metodama MammaPrint- ekspresija 70 gena; OncotypeDX- analizira 21 gen), i za sada služe jedino za prognozu rizika za relaps bolesti (76).

1.6. Biološka klasifikacija karcinoma dojke

Na osnovu imunohistohemijske ekspresije (ER, PR, HER 2, Ki-67) panel eksperata u St. Gallen-u 2011 godine predložio je novu biološku klasifikaciju karcinoma dojke na pet molekularnih subtipova (77, 78, 79):

- LUMINALNI A TIP: (ER+, PR+ , HER2-, Ki-67 nizak nivo ekspresije, manji od 14%)
- LUMINALNI B TIP:
 - a) HER 2 - (ER+, PR+, HER2 -, Ki-67 visok)
 - b) HER2 + (ER+, PR+, HER 2 +, bilo koji Ki-67)

- HER2 POZITIVNI TIP: (ER-, PR-, HER2 +, visok Ki-67)
- BAZALOIDNI TIP (trostruko negativni karcinom dojke): (ER-, PR-, HER2 -) .

Luminalni tip karcinoma dojke dobio je ime po veoma sličnoj ekspresiji bioloških markera ovih tumora i luminalnog epitela dojke. Za oba je specifična ekspresija luminalnih citokeratina 8 i 18. Luminalni tip karcinoma dojke čini većinu ER pozitivnih karcinoma dojke, kao i ekspresija PR i specifičnih gena koji su uključeni u aktivaciju estrogena. Postoje dva tipa luminalnog karcinoma dojke koji se međusobno razlikuju po svom molekularnom profilu i prognostičkim osobinama (79):

1.6.1. Luminalni A tip karcinoma dojke

Luminalni A tip karcinoma dojke čini više od 40% tipova karcinoma dojke; obično ima visoku ekspresiju ER, nisku ekspresiju HER2 receptora i nizak nivo markera ćelijske proliferacije Ki-67 (<14%); marker specifičan za ovaj tip karcinoma je GATA3; manje od 9% ovih karcinoma ima visok histološki gradus G3; ima najbolju prognozu u odnosu na sve ostale tipove karcinoma dojke (78, 79, 80).

1.6.2. Luminalni B tip karcinoma dojke

Luminalni B tip karcinoma dojke javlja se u 9-16% svih slučajeva; ispoljava se kao HER2- (negativan) i kao HER 2+(pozitivni) podtip; luminalni B HER2- podtip ima sličnu ekspresiju ER, PR i HER2 receptora kao i luminalni A tip karcinoma, ali se od njega razlikuje po visokom proliferativnom markeru Ki-67 i agresivnijem toku i lošijem ishodu bolesti; HER2+ je ER i PR pozitivan i ima ekspresiju HER2 receptora, EGFR1 i ciklin E1; indeks proliferacije Ki-67 je veći nego kod luminalnog A tipa karcinoma dojke (>14%)(78, 79).

1.6.3. Trostruko negativni karcinom dojke

Trostruko negativni karcinom dojke čini oko 15-20% svih karcinoma dojke (81, 82). Karakteriše ga smanjena ekspresija ER, PR i HER2 receptora i visok nivo markera ćelijske proliferacije Ki-67. To je podgrupa karcinoma dojke sa najlošijom prognozom jer su često udruženi i sa odmaklijim stadijumom bolesti i sa visokom proliferativnošću tumorskih ćelija;

velikim potencijalom za metastaziranje naročito u visceralne organe i CNS. Trostruko negativni karcinom dojke se javlja uglavnom kod žena mlađe životne dobi i ima agresivniji tok bolesti u odnosu na druge tipove karcinoma dojke. Generalno, karakterišu se velikom osetljivošću na hemioterapiju, ali i brzo stiču rezistenciju. Iako imaju dobar terapijski odgovor na hemioterapiju, sa visokom stopom pCR, imaju lošu prognozu sa visokom stopom relapsa u prve tri godine od početka lečenja i kraćim preživljavanjem (83, 84). Najveći stepen smrtnosti registruje se u roku od pet godina nakon prve terapije (85). Bolesnice sa trostruko negativnim karcinomom dojke nemaju koristi od hormonske terapije i lečenja trastuzumabom. Hemioterapija je osnovni vid sistemskog lečenja, mada je ishod lečenja lošiji nego kod bolesnica sa drugim podtipovima karcinoma dojke (84).

1.6.4. HER2 pozitivni karcinom dojke

HER2 pozitivni karcinom dojke javlja se kod 8-16% bolesnica. Ovaj tip karcinoma dojke najčešće je gradusa 3; ER-/PR-, p53+, visok Ki-67; metastazira često u mozak, 10% je epigenetički mehanizam (78, 86). Na osnovu ekspresije ER, postoje dva podtipa ovog karcinoma: (ER -, HER2+) i (ER+, HER2 + i oni su slični luminal B tipu karcinoma).

Na osnovu navedenih prognostičkih kriterijuma i molekularne klasifikacije karcinoma dojke, konzilijum lekara donosi odluku o vrsti tretmana koja bi trebalo da se primeni u daljem toku lečenja (27).

1.7. Epigenetičke promene u karcinomu dojke-hipermetilacije promotora gena

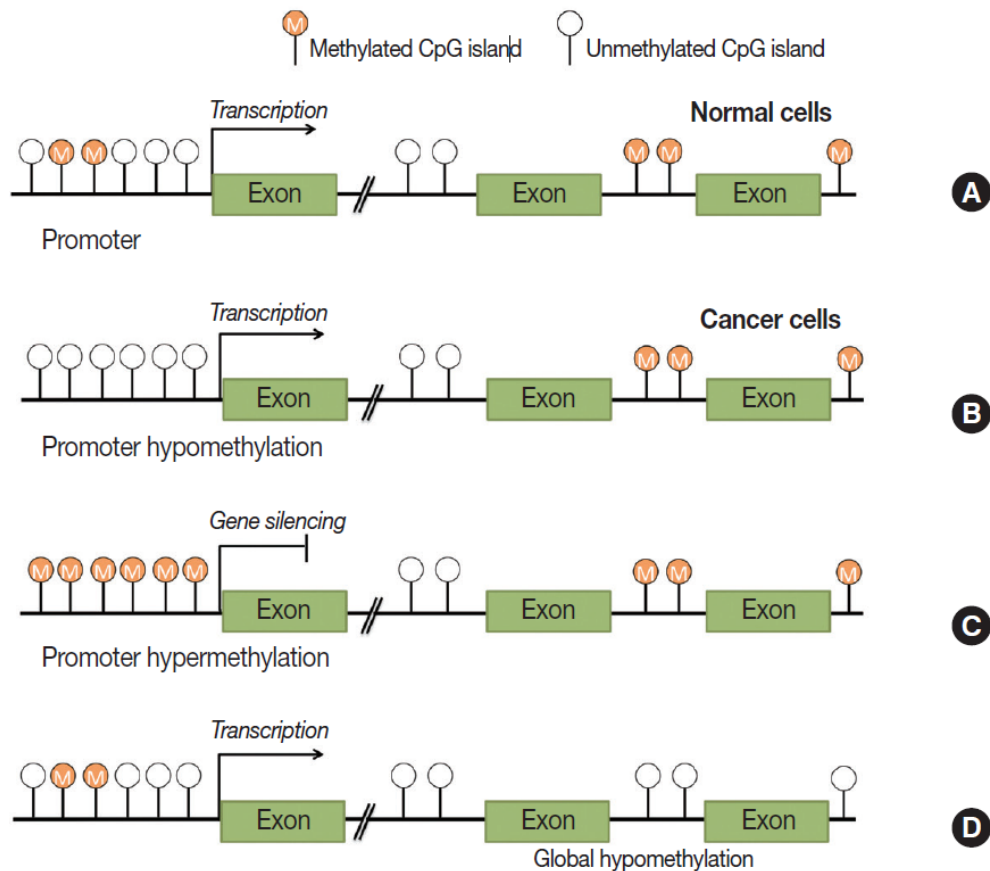
Epigenetika je definisana kao "pojava koja reguliše ekspresiju gena putem mehanizma za proizvodnju promena u ćelijama i organizmu" (87, 88). Termin epigenetika je prvi upotrebio britanski genetičar i embriolog Konrad Hal Vaddington 1940 godine (89). Metilacija je globalni proces kod sisara u poređenju sa drugim životinjama. Metilacija DNK igra vitalnu ulogu u regulisanju ekspresije gena, nasledna je sa mehanizmom propagacije putem ćelijske podele (90, 91, 92).

Epigenetičke promene su promene genske ekspresije, do kojih dolazi bez promene primarne nukleotidne sekvence. Epigenetičke promene igraju značajnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, apoptozi, signalnoj transdukciji i tumorigenezi. Najvažniji tipovi epigenetičke aktivnosti genske regulacije su DNK metilacija, modifikacije histona i regulacija preko nekodirajućih RNK (93, 94, 95). Epigenetička inaktivacija dovedena je u vezu sa prognozom i preživljavanjem bolesnika sa karcinomom. Smatra se da bi reverzibilnost epigenetičkih promena mogla biti modulirana ili epigenetičkom terapijom, ili ishranom i bioaktivnim jedinjenjima. Dalja istraživanja kompleksnih mehanizama koji leže u osnovi epigenetičkih promena, mogla bi doprineti korišćenju ovih promena kao dijagnostičkih i prediktivnih markera, ili omogućiti primenu epigenetičke terapije u lečenju kancera (96).

Metilacija DNK je najčešće izučavan model epigenetičke promene kod ljudi. Odnosi se na mehanizme utišavanja gena što dalje ima značajnu ulogu u regulaciji genske ekspresije i strukture hromatina (93). Kod sisara se metilacija DNK primarno dešava kovalentnim modifikacijama citozinskih ostataka u CpG dinukleotidnim sekvencama. CpG dinukleotidi su u humanom genomu koncentrisani u kratkim CpG bogatim regionima DNK nazvanim "CpG ostrvca" kao i u regionima velikih ponavljajućih sekvenci (npr. regioni centromera). CpG ostrvca su primarno smeštena u 5' promotorskim regionima gena i čak oko 70% humanih gena u okviru svojih promotora poseduje CpG ostrvca, koji su najčešće zastupljeni na mestima početka transkripcije (97).

Dok je većina CpG dinukleotida u genomu metilovano, CpG dinukleotidi locirani u okviru ostrvaca promotora gena najčešće ostaju nemetilovani tokom razvoja i diferencijacije tkiva (98, 99).

Za razliku od genetske mutacije, metilacija DNK je reverzibilan proces koji menja obrazac genske ekspresije bez modifikacije DNK sekvence. Hipometilacija i stanja hipermetilacije su oba povezana sa karcinomom kod ljudi i pokazano je da zahvatanje različitog regiona genoma utiče na pojavu različitog tog tipa raka (slika 3.) (93).



Slika 3. Hipometilacija i hipermetilacija ljudskog genoma. (A) U normalnim ćelijama, ostaci citozina i guanina dinukleotida (CpG) u regiji promotor su nemetilovani. (B) U ćelijama karcinoma, hipometilacija promotora onkogenih gena dovodi do inicijacije transkripcije. (C) Promotor hipermetilacija gena supresora tumora dovodi do utišavanja gena. (D) Globalna hipometilacija utiče na integritet i stabilnost gena (100).

Ipak, postoje slučajevi kada se CpG ostrvca metiluju tokom razvića što dalje vodi dugoročnom transkripcionom utišavanju. Klasičan primer ovog mehanizma je inaktivacija X hromozoma tokom razvića (94, 101). Tokom normalnog procesa histogeneze takođe su primećeni mehanizmi tkivno-specifične metilacije CpG ostrvaca najpre u genima odgovornim za razviće (102).

Pored metilacije DNK koja se dešava kao normalan proces tokom razvića, ovaj mehanizam je povezan i sa inicijacijom i progresijom humanih kancera. Metilacija DNK je bio prvi epigenetički mehanizam koji je opisan u nastanku i progresiji kancera kod ljudi (103).

Za razliku od hipometilacije koja povećava genomsku nestabilnost i aktivira proto onkogene, mesto-specifična hipermetilacija doprinosi tumorigenezi utišavanjem tumor supresornih gena. Ova pojava definisana je kao metilacioni disbalans gde sa jedne strane dolazi do globalne hipometilacije, uz potencijalnu aktivaciju onkogeni, a sa druge strane do regionalne hipermetilacije tumor-supresorskih gena, što dovodi do njihove inaktivacije i maligne transformacije. Znači epigenom kancera je definisan opštom genomskom hipometilacijom i mesto-specifičnom hipermetilacijom CpG ostrvaca promotora gena (104). Te promene su tumor specifične sa potencijalom da se koriste kao biološki marker (105). Iako mehanizmi koji iniciraju ove promene još uvek nisu potpuno jasni, skorašnje studije ukazuju da se neke od ovih promena dešavaju veoma rano u kancerogenezi i da doprinose inicijaciji kancera (106, 107).

1.7.1. *BRCA1* gen i značaj hipermetilacije promotora u karcinomu dojke

BRCA1/2 geni spadaju u grupu tumor supresornih gena, koji aktiviraju procese popravke grešaka u DNK. Mutacije ovih gena povećavaju rizik od nastanka naslednog raka dojke, koji je u visokom procentu bilateralan. Gen *BRCA1* mapiran je na hromozomu 17q21, a *BRCA2* na hromozomu 13q12 (108). Postojanje ovih mutacija nosi visok rizik za karcinoma dojke (50-85%) i rak jajnika (20-40%). Muškarci sa mutacijom gena *BRCA2* imaju 6% rizik da će oboleti od karcinoma dojke, što je oko 100 puta veći rizik nego u opštoj populaciji (109). Prisustvo *BRCA1* ili *BRCA2* mutacija povećava rizik i za nastanak bilateralnog karcinoma dojke (110). Karcinom dojke udružen sa *BRCA1* mutacijom u 50% slučajeva se dijagnostikuje do 41 godine života, često u uznapredovalom stadijumu, a po histološkom tipu je slabo diferentovan invazivni duktalni karcinom, sa negativnim statusom ER/PR (ER je negativno kod oko 90%, a PR kod 79% ovih tumora) (111, 112). Oko 95% *BRCA1* i *BRCA2* asociranih tumora ne ispoljava HER2/neu receptore (113). Geni čije mutacije takođe mogu da dovedu do pojave familijarnog karcinoma dojke su: p53, CHK2, i ATM (114). Cilj

genetskih istraživanja je da se otkriju mlade žene sa povećanim rizikom da obole od karcinoma dojke i njegovo rano otkrivanje, tako da bi adekvatno lečenje u ranoj fazi dovelo do visokog procenta izlečenja (115).

Hipermetilacija **BRCA1** gena javlja se u oko 15% sporadičnih karcinoma dojke, sa tendencijom ka većoj učestalosti kod trostruko negativnog karcinoma dojke tumora (20-30%) (116, 117). Pokazano je takođe da sporadični karcinom dojke sa **BRCA1** metilovanim promotorima imaju molekularni i kliničko patološki fenotip sličan onima sa naslednim **BRCA1** mutiranim karcinomima (118) i njihovo biološko ponašanje može se smatrati BRCA-om (116).

Drugi mehanizam inaktivacije **BRCA1** gena, kao što je aberantna metilacija, može biti prisutan u trostruko negativnom karcinomu dojke (116). U naslednom karcinomu dojke mutaciona inaktivacija **BRCA1** gena povezana je sa visokim histološkim gradusom, i odsustvom estrogene zavisnosti i povećane ekspresije Her-2 receptora (znači bolesnice sa **BRCA1** metilovanim krcinomom dojke neće imati koristi od tradicionalnih hormonskih ili ciljanih terapija). Sličan fenotip ispoljavaju i tumori trostruko negativnog karcinoma dojke, pa se može pretpostaviti da bi terapijski pristupi koji se razvijaju za **BRCA1**-pozitivni nasledni kancer mogli da važe i za trostruko negativni karcinom dojke kod koga je došlo do inaktivacije **BRCA1** gena (to se pre svega odnosi na terapiju PARP inhibitorima, ali i na povećanu senzitivnost ovih tumora na cisplatinu (119).

1.7.2. p16 gen i značaj hipermetilacije promotora u karcinomu dojke

p16 je protein kodiran lokusom 9p21-22 i spada u grupu tumor supresorskih gena. Njegova disregulacija vodi nekontrolisanoj proliferaciji i izbegavanju kontrolnih tačaka, koje vode zaustavljanju ćelijskog ciklusa u G1 fazi, tako što inhibira ciklin zavisne kinaze CDK4 i CDK6, koje vrše fosforilaciju *pRb*. Hiperfosforilisan *Rb* inaktivira supresivno delovanje **p16** i ćelija ulazi u S fazu. **p16** je hipermetilovan u ćelijskim linijama karcinoma dojke, kao i u malignom tkivu dojke(120). Metilacioni status **p16** gena može biti potencijalni marker osetljivosti na hemioterapiju antraciklinima u karcinomu dojke (121).

1.7.3. *O⁶MGMT* gen i značaj hipermetilacije promotora u karcinomu dojke

MGMT gen pripada grupi gena koji učestvuju u uklanjanju mutagenih O⁶-guaninskih adukata sa DNK. *O⁶MGMT* je lociran na hromozomu 10, lokusu 10q26 i sastoji se od 5 egzona. Najčešći vid inaktivacije ovog gena jeste njegova hipermetilacija i detektovana je u limfomima, karcinomu pluća i kolona. Takođe je metilovan kod primarnih karcinoma dojke (122). Mutacija u ovom genu je najčešće letalna. Pod dejstvom enzima O⁶ metilguanin metiltransferaze uklanjaju se alkilirajuća oštećenja guanozina i čijim utišavanjem hipermetilacijom se akumuliraju G→A mutacije (123). Time dolazi do ponovnog uspostavljanja normalne baze i ireverzibilne inaktivacije enzima, njegove ubikvitacije i degradacije. Sposobnost ćelije da ukloni alkilirajuća jedinjenja direktno zavisi od broja *MGMT* molekula i njegove *de novo* sinteze. Hipermetilacija *MGMT* može biti i faktor predviđanja dobrog odgovora na alkilirajuće agense (124).

1.7.4. *RASSF1* gen i značaj hipermetilacije promotora u karcinomu dojke

RASSF1 gen je gen čija je inaktivacija dovedena u vezu sa brojnim humanim kancerima. Hipermetilacija ovog gena jedna je od najranijih epigenetičkih promena u karcinomu dojke (125) - detektovana je kod oko 62% primarnih karcinoma dojke. (126, 127). *RASSF1* metilacija i izmenjena ekspresija proteina može da bude pomogne u razdvajanju malignih od ne-malignih lezija tkiva dojke. (128).

1.7.5. *CDH-1* gen i značaj hipermetilacije promotora u karcinomu dojke

Ćelijski adhezivni molekul E-kadherin **E-cad**, kodiran od strane *CDH-1* gena se označava i kao supresor metastaza. Epitelni E-kadherin gen *CDH-1* (smešten je na hromozomu 16 i ima 16 egzona.) je član familije gena koji kodiraju kalcijum-zavisne adhezivne molekule. Osim njegove poznate uloge u održavanju adherens veza u regionima interćelijske adhezije u normalnom epitelu, uključen je i u procese migracije, proliferacije i ćelijske diferencijacije preko Wnt signalnog puta. Ima važnu ulogu u malignoj transformaciji ćelije, posebno u razvoju i progresiji tumora. Glavni vid inaktivacije *CDH-1* gena je upravo hipermetilacija.

Demetilacija i reekspresija E-kadherina neophodna za epitelijalno-mezenhimsku tranziciju i za umetanje metastatskih ćelija u novo ćelijsko okruženje (129).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi da li metilacioni status promotora ispitivanih *BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena kod bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke, kao prognostički najlošijom grupom karcinoma dojke sa agresivnim fenotipom, može da se poveže sa kliničkim tokom bolesti i da posluži kao eventualni pokazatelj prognoze bolesti.

Da bismo dostigli postavljeni cilj, bilo je neophodno da se:

- Odredi hipermetilacioni status ispitivanih gena (*BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1*) u grupi bolesnica trostruko negativnog karcinoma dojke i kontrolnoj grupi bolesnica (ER+PR+Her2-); da bi se utvrdilo da li je hipermetilacioni profil promotora gena koji se ispituju karakterističan za obolele od trostruko negativnog karcinoma dojke;
- Uporede dobijeni rezultati sa klasičnim faktorima prognoze obolelih od trostruko negativnog karcinoma dojke da bismo utvrdili da li se metilacioni status analiziranih gena može povezati sa parametrima koji ukazuju na lošu/dobru prognozu bolesti;
- Uporede dobijeni rezultati sa parametrima kliničkog toka bolesti (učestalost relapsa, DFS i OS) da bismo utvrdili da li se tok bolesti, kao i odgovor na primenjenu adjuvantnu terapiju karcinoma dojke može povezati sa metilacionim statusom analiziranih gena.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bolesnice

Bolesnice uključene u ovaj rad su deo sistematskog uzorka Banke tumora na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS). Uzorci malignih tumora su sveže smrznuti i čuvani u tečnom azotu (-196°C) do procesovanja. Uzorci su sakupljeni kao ostatak tkiva tokom operacije, a posle uzimanja uzoraka neophodnih za histopatološku karakterizaciju karcinoma dojke.

Parametri domaćina tumora uključuju godine bolesnica (opseg 31 do 85 godina) i menopauzni status. Bolesnice u premenopauzi su definisane kao one koje imaju redovan menstrualni ciklus kao i one kod kojih se izostanak menstruacije desio u intervalu do jedne godine pre operacije.

Sve bolesnice su operisane na IORS-u, bilo radikalno, bilo pošteđno, u intervalu između 2009. i 2014. godine. Kod svih je histološki potvrđeno prisustvo karcinoma dojke. Posle operacije klasifikovane su prema TNM klasifikaciji (pTN) UICC-a. Kod svih bolesnica u momentu primarnog tretmana – operacije - nisu detektovane udaljene metastaze (M). pT je podrazumevao podelu na: pT1 (≤ 2 cm), pT2 (> 2 cm ≤ 5 cm) i pT3 (> 5 cm). pN je podrazumevao podelu na histološki utvrđeno odsustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (pN0) i histološki utvrđeno prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (pN1).

3.1.1. Grupa trostruko negativnog karcinoma dojke

U rad je uključeno 75 bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke koje karakteriše imunohistohemijski dokazano odsustvo ili negativan rezultat receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR) (imunohistohemijski skor 0 ili 2+), kao odsustvo Her-2 receptora. Odsustvo Her-2 receptora dokazivano je imunohistohemijski (Her-2 receptori sa skorom 0 ili 1+ spadaju u negativan rezultat), a u slučaju neinformativnog rezultata imunohistohemije (Her-2 receptori sa skorom 2+), odsustvo Her-2 receptora je potvrđeno CISH metodom. Od 75 uzoraka tumorskog tkiva bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke, analiza metilacionog statusa, u odnosu na količinu i kvalitet izolovane DNK je bila moguća u 61 uzorku.

3.1.2. Grupa steroid receptor pozitivnog Her2 negativnog karcinoma dojke

U kontrolnu grupu bolesnica (n=75) su uključene bolesnice obolele od karcinoma dojke koje spadaju u najbolju prognostičku grupu karcinoma dojke (ER+, PR+, Her2-), odgovarajućih karakteristika u odnosu na godine života i status menopauze. Grupa ima što je moguće sličniji sastav u odnosu na klasične parametre prognoze – ne razlikuje se statistički značajno od grupe ispitivane grupe bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke u odnosu na TNM karakteristike (pTN). Od 75 uzoraka tumorskog tkiva bolesnica iz ER+, PR+, Her2-grupe, analiza metilacionog statusa, u odnosu na količinu i kvalitet izolovane DNK je bila moguća u 70 uzoraka.

Poređenje menopauznog statusa između grupe bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke (N=61) i grupe sa ER+PR+Her2- karcinomom dojke (N=70) nije pokazalo statistički značajnu razliku (χ^2 test, p=0.3582). Takođe, između analiziranih grupa nije nađena statistički značajna razlika u starosti u odnosu na oboljevanje (Wilcoxon rank sum test, p= 0.1789). U odnosu na histopatološku veličinu tumora, upoređivanje pomenutih grupa nije pokazalo statistički značajnu razliku (Fisher exact test, p=0.1924). Razlika u odnosu na zahvaćenost regionalnih limfnih žlezda tumorom (N0 prema N1) između ispitivanih grupa bolesnica takođe nije nađena (χ^2 test, p=0.45885).

Parametri domaćina tumora kao i parametri tumora dati su u Tabeli 3.

Tabela 3. Karakteristike domaćina tumora trostruko negativnog karcinoma dojke i ER+PR+Her-2-grupa bolesnica. IDC– invazivni duktalni karcinom; ILC – invazivni lobularni karcinom

	Trostruko negativni karcinom dojke		ER+PR+Her-2-karcinom dojke	
	Broj	%	Broj	%
Karakteristike bolesnica				
<i>Premenopauza</i>	7	11.5	12	17.4
<i>Postmenopauza</i>	54	88.5	58	82.6
<i>Starost (medijana)</i>	60 godina		59 godina	
Karakteristike tumora				
Veličina (pT)				
<i>T1</i>	19	31.1	22	31.4
<i>T2</i>	37	60.7	47	67.1
<i>T3</i>	5	8.2	1	1.5
Histološki tip				
<i>IDC</i>	38	62.3	31	44.3
<i>Ostali (ILC, medularni, mešoviti)</i>	23	37.7	39	55.7
Histološki gradus				
<i>G1</i>	0	0	6	8.5
<i>G2+G3</i>	61	100	64	91.5
Zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova tumorom (pN)				
<i>N0</i>	30	49.2	30	42.9
<i>N1</i>	30	49.2	39	55.7
<i>NA*</i>	1	1.6	1	1.4

*NA nepoznato

Bolesnice su praćene između 1 i 87 meseci (medijana 78 meseci). Bolesnice sa trostruko negativnim karcinomom dojke su praćene u opsegu od 1 do 85 meseci (medijana 43 meseca), dok su bolesnice iz ER+PR+ Her2- grupe praćene između 55 i 87 meseci (medijana 82 meseca).

Definirani su sledeći parametri na osnovu kojih se procenjuje ishod bolesti, (engl. *time to event*):

- Preživljavanje bez znakova bolesti – DFS (engl. *disease-free survival*): vreme od 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 ponovnog javljanja bolesti;
- ukupno preživljavanje – OS (engl. *overall survival*): vreme od operacije do smrti, bez obzira na njen uzrok.

Adjuvantna (dodatna) sistemska terapija

Prema dostupnim podacima, ukupno 98/131 bolesnice (74.8%) je primalo dodatnu sistemsku terapiju posle operacije. U trostruko negativnom karcinomu dojke (n=53), bolesnice su primale adjuvantnu hemioterapiju:

- CMF (ciklofosamid, metotreksat, 5-fluorouracil), 19 bolesnica
- FAC/FEC (5-fluorouracil, adriamicin/epirubicin, ciklofosamid), sam (n=15) ili u kombinaciji sa taksolom (n=9) ili u kombinaciji sa taksoterom (n=7)
- Taksoteru, 1 bolesnica

U ER+PR+Her2- grupi, dodatnu hormonoterapiju primile su sve analizirane bolesnice:

- Tamoksifen je primalo 69 bolesnica, dok je inhibitore aromataze primala samo 1 bolesnica.

Među ovim bolesnicama, njih 45 je primilo i dodatnu hemioterapiju i to:

- CMF 6 bolesnica
- FAC/FEC, sam (n=18), ili u kombinaciji sa taksolom (n=6) ili u kombinaciji sa taksoterom (n=15)

3.2. Izolovanje genomske DNK metodom isoljavanja

Hipermetilacioni status promotorskog regiona *BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSSF1* i *CDH-1* gena je određivan u tumorskom tkivu, obzirom da je metilacija tkivno i tumor specifična. Uzorci malignih tumora su sveže smrznuti i čuvani u tečnom azotu (-196°C) do procesovanja. Uzorci su sakupljeni kao ostatak tkiva tokom operacije, a posle uzimanja uzoraka neophodnih za histopatološku karakterizaciju karcinoma dojke. Bolesnice su dale svoju pismenu saglasnost za učešće u ovoj istraživačkoj studiji. DNK iz uzoraka sveže smrznutog tumorskog tkiva je izolovana metodom isoljavanja.

3.3. Merenje koncentracije DNK

DNK je uspešno izolovana iz 131 uzorka (61 trostruko negativni karcinom dojke i 70 Er+Pr+Her2-). Procedura podrazumeva inicijalnu homogenizaciju tkiva radi razaranja ćelija i digestiju sa SDS–proteinazom K. Zatim se dodaje visoka koncentracija soli (6 M natrijum hlorid). DNK se precipitira pomoću etanola i dalje prečišćava dodavanjem 70% etanola. Koncentracija i kvalitet izolovane DNK se meri pomoću and BioSpec-nano spektrofotometra (Shimadzu).

3.4. Određivanje hipermetilacije promotora specifičnih gena metilaciono-specifičnim PCR-om

Metilacioni status je određivan nested metilaciono-specifičnim PCR metodom (MS-PCR) (130, 131) na Institutu za medicinska istraživanja VMA. Metilaciono-specifični PCR je metod koji omogućava detekciju metilovanih sekvenci u promotorima gena. Zasniva se na standardnoj PCR metodi, ali sa posebno dizajniranim prajmerima koji razlikuju metilovane od nemetilovanih sekvenci u bisulfitom modifikovanoj DNK (130). Bisulfitna modifikacija se zasniva na selektivnoj deaminaciji citozina u uracil dejstvom natrijum metabisulfita, pri čemu je od ove modifikacije zaštićen metilovani 5-metilcitozin u okviru CpG ostrvaca promotora gena.

- Nakon izolacije genomske DNK metodom isoljavanja, DNK je podvrgnuta bisulfitnoj modifikaciji korišćenjem kita za bisulfitnu modifikaciju EpiTec Kit, Qiagen, Germany.

- Određivanje hipermetilacije promotora specifičnih gena je urađeno metilaciono-specifičnim PCR, (MSP) metodom (130). Za sve analizirane gene koriste se sekvence prajmera koje su prethodno dizajnirane i validirane bisulfitnim sekvenciranjem i za koje je pokazan efekat hipermetilacije na ekspresiju analiziranih gena kod većeg broja tumora (130, 131, 132). Osim toga, dobar dizajn prajmera je potvrđen i korišćenjem baze podataka Meth Primer DB. Za svaki uzorak amplifikacija je urađena sa prajmerima specifičnim za metilovanu i sa prajmerima specifičnim za nemetilovanu DNK, što je ujedno i interna kontrola uspešnosti bisulfitne modifikacije. Nested varijantom metode se u prvoj PCR reakciji (MasterCycler Gradient, Eppendorf, Germany) specifično amplifikuje širi region promotora bisulfitno-modifikovane DNK prajmerima specifičnim za modifikovanu DNK, koji ne amplifikuju isti region nemodifikovane genomske DNK. U drugoj PCR reakciji se razdvajaju reakcije i specifično amplifikuju i diskriminišu metilovane od nemetilovanih sekvenci (131), čime je senzitivnost metode višestruko povećana, sa 1 u 1000 alela kolika je kod klasičnog MS-PCR-a, na detekciju 1 metilovanog u 50 000 nemetilovanih alela, kolika je senzitivnost nested MS-PCR.
- DNK iz limfocita periferne krvi zdravih osoba je korišćena kao nemetilovana kontrola. Da bismo formirali kompletno metilovanu DNK na svim CpG dinukleotidima, DNK zdravih osoba je tretirana pomoću *SssI* metiltransferazom (New England Biolabs) i upotrebljena kao pozitivna, metilovana kontrola.

3.5. Statističke metode

- Opis parametara od značaja (frekvencije, procenti, prosek, medijana, standardna devijacija -SD i opseg)
- Ispitivanje povezanosti faktora od značaja primenom statističkih testova (Pearson χ^2 test, Fisher exact test, Wilcoxon rank sum test)
- Za analizu preživljavanja bez znakova bolesti i ukupnog preživljavanja u odnosu na parametre od značaja, koristiće se Survival Analysis metodologija (Kaplan-Meier metoda, Log-rank test)

- Za identifikaciju faktora od značaja za preživljavanje bez bolesti, ukupno preživljavanje i preživljavanje bez karcinoma dojke, korišće se regresiona analiza (Cox-ov proporcionalni hazardni model)
- Za nivo statističke značajnosti je usvojena vrednost $p \leq 0.05$.

4. REZULTATI

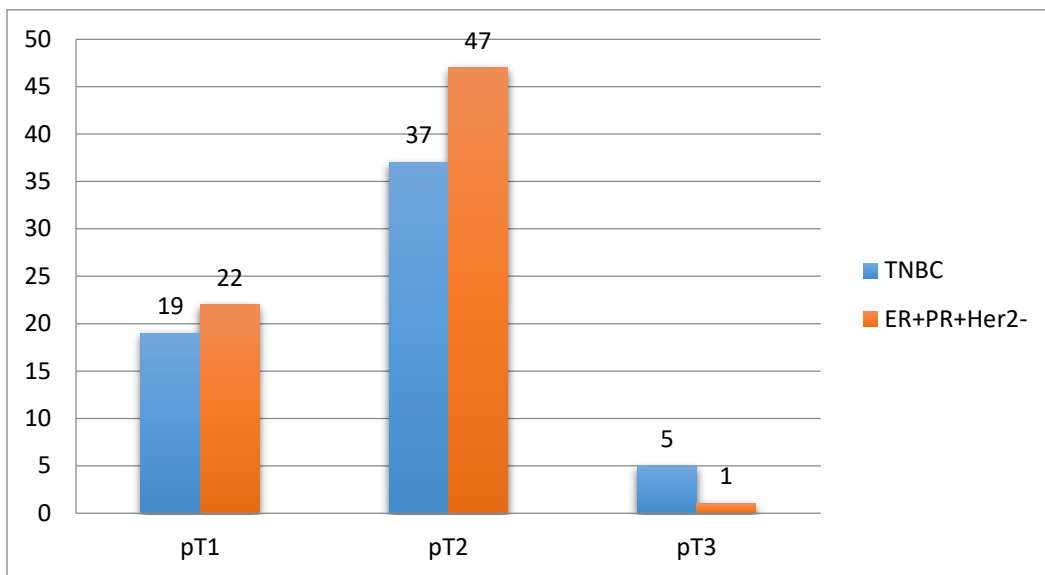
U okviru ovog rada prvo su poređeni dobijeni podaci koji se odnose na klinički tok bolesti u okviru grupe trostruko negativnog karcinoma dojke i kontrolne grupe koju čine bolesnice sa ER+PR+Her2- karcinomom dojke.

4.1. Poređenje podataka u odnosu na klinički tok bolesti

U radu je prvo analizirana učestalost karakteristika tumora: veličine tumora (pT), prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (pN), histološkog tipa tumora, histološkog gradusa kao i nuklearnog gradusa tumora u ispitivanim grupama bolesnica. Analizirana je i učestalost različitih tipova operacija u ispitivanim grupama bolesnica.

U odnosu na veličinu tumora, nije pokazana statistički značajna razlika u učestalosti pT1, pT2 i pT3 veličine tumora između trostruko negativnog karcinoma dojke i ER+PR+Her2- grupe bolesnica, Fisher Exact test, $p=0.1923$ (Grafikon 1).

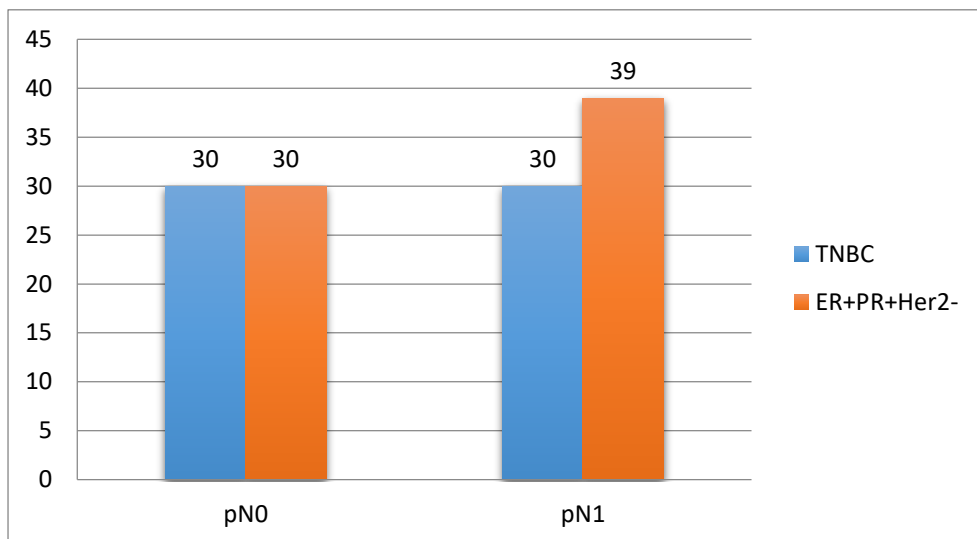
- pT1 (≤ 2 cm) veličina tumora je bila prisutna kod 19 (31.1%) tumora iz grupe trostruko negativnog karcinoma dojke prema 22 (31.4%) u ER+PR+Her2- grupi
- pT2 (>2 cm, ≤ 5 cm) je najčešća veličina tumora u obe ispitivane grupe: 37 (60.7%) tumora iz grupe trostruko negativnog karcinoma dojke prema 47 (67.1%) u ER+PR+Her2- grupi
- pT3 (>5 cm) je najređa veličina tumora među analiziranim uzorcima u obe ispitivane grupe: 5(8.2%) prema 1(1.43%)



Grafikon 1. Poređenje veličine tumora (pT) kod ispitivanih grupa trostruko negativnog karcinoma dojke (n=61) i ER+PR+Her2- (n=70) bolesnica, Fisher Exact test, p=0.1923

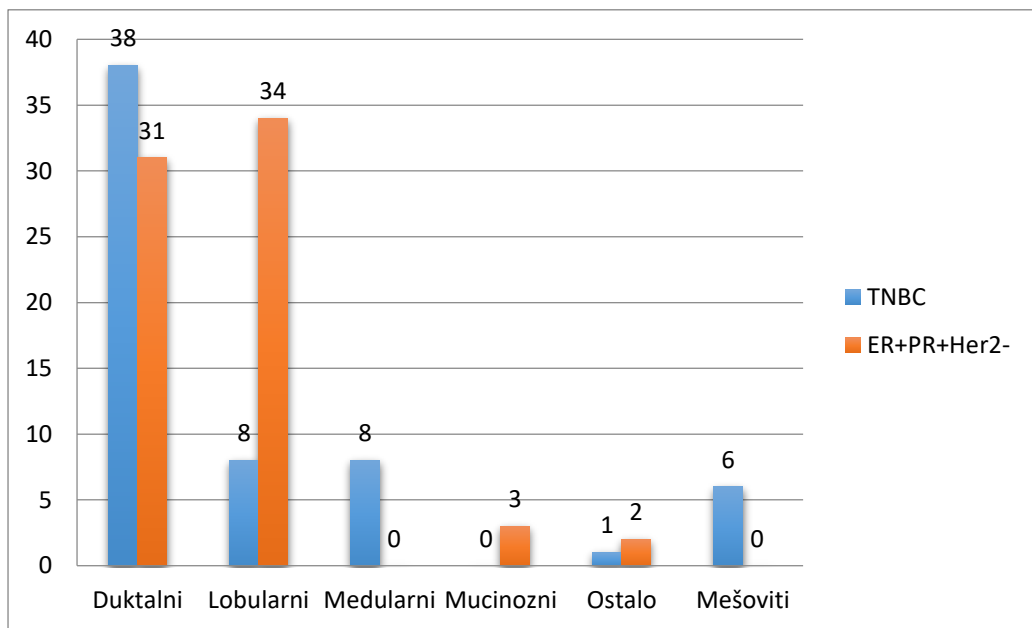
U ispitivanim grupama nije pronađena statistički značajna razlika u odnosu na zastupljenost bolesnica bez prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (pN0), kao i na zastupljenost bolesnica sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (pN1), χ^2 test, p=0.4588 (Grafikon 2).

- Zastupljenost pN0 bolesnica bila je veoma slična u obe ispitivane grupe: 30 (49.2%) među bolesnicama sa trostruko negativnog karcinoma dojke i 30 (42.9%) kod ER+PR+Her2- bolesnica
- Zastupljenost pN1 bolesnica u grupi sa trostruko negativnim karcinomom dojke je bila 30 (49.2%) prema 39 (55.7%) u ER+PR+Her2- grupi



Grafikon 2. Poređenje zastupljenosti odsustva (pN0) i prisustva (pN1) regionalnih metastaza u limfnim čvorovima kod bolesnica iz grupe sa trostruko negativnim karcinomom dojke (n=60) i ER+PR+Her2- (n=69) grupe, χ^2 test, p=0.4588

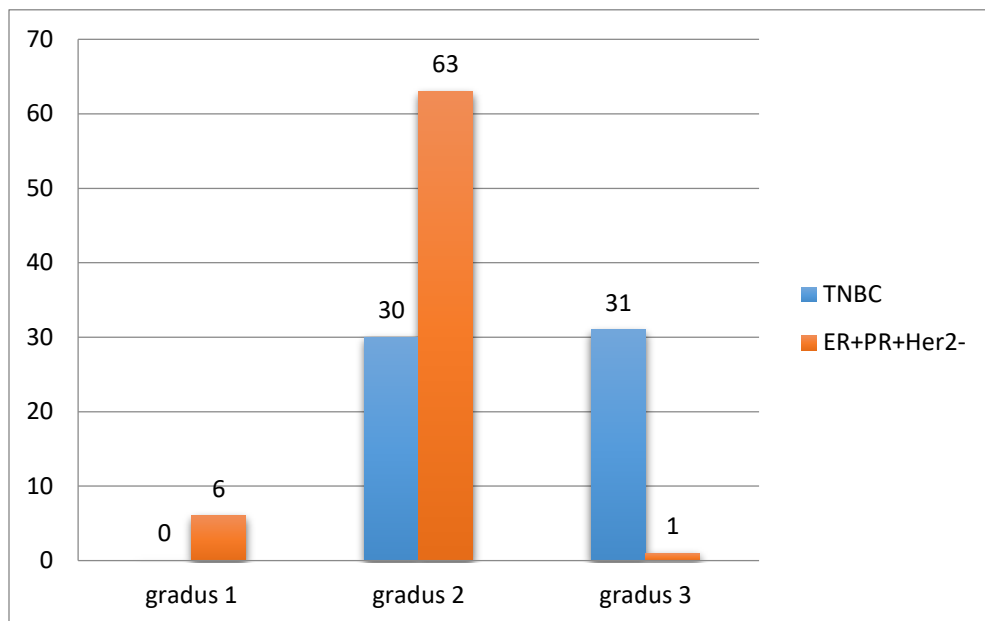
Razmatranje učestalosti različitog histološkog tipa u trostruko negativnom karcinomu dojke i ER+PR+Her2- grupi pokazalo je statistički značajnu razliku u zastupljenosti histoloških tipova invazivnog karcinoma dojke, Fisher exact test, $p=9.4209^{-08}$ (Grafikon 3). U obe ispitivane grupe, invazivni duktalni karcinom je bio najučestaliji histološki tip tumora (38 - 62.3% u trostruko negativnom karcinomu dojke, 31 - 44.3% u ER+PR+Her2-). Invazivni lobularni karcinom je bio izrazito češće zastupljen u grupi ER+PR+Her2- (34 - 48.6%) nego u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke (8 - 13.1%). Prisustvo medularnog histološkog tipa detektovano je samo u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke sa učestalošću od 13.1% (n=8). Mešoviti histološki tip je takođe detektovan samo u grupi sa trostruko negativnim karcinomom dojke (6 - 9.8%).



Grafikon 3. Zastupljenost histoloških tipova karcinoma dojke u ispitivanim grupama, Fisher exact test, $p=9.4209^{-08}$

Statistički značajna razlika je uočena i u zastupljenosti histoloških gradusa (gradus 1, 2, 3) u ispitivanim grupama bolesnica, Fisher Exact test, $p=1.0525^{-12}$ (Grafikon 4).

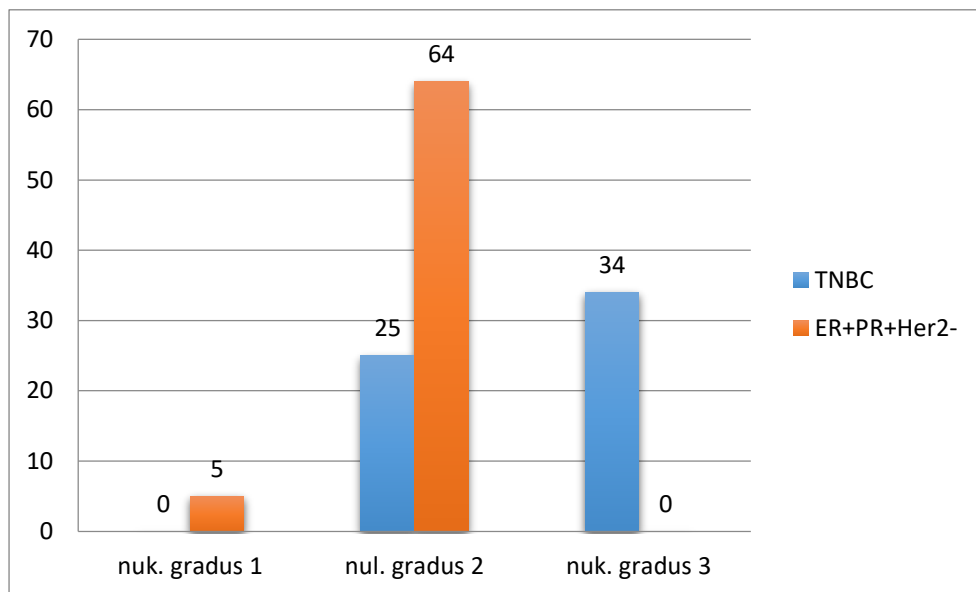
- Histološki gradus 1 detektovan je samo u ER+PR+Her2- grupi sa učestlošću od 8.6% (n=6)
- Histološki gradus 2 bio je češći među tumorima iz ER+PR+Her2- grupe nego kod trostruko negativnog karcinoma dojke: 63 (90%) prema 30 (49.2%)
- Histološki gradus 3 bio je izrazito češće zastupljen u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke nego u ER+PR+Her2- grupi bolesnica: 31 (50.8%) prema 1 (1.4%)



Grafikon 4. Poređenje učestalosti različitog histološkog gradusa tumora kod ispitivanih grupa trostruko negativnog karcinoma dojke (n=61) i ER+PR+Her2- (n=70) bolesnica, Fisher Exact test, $p=1.0525^{-12}$

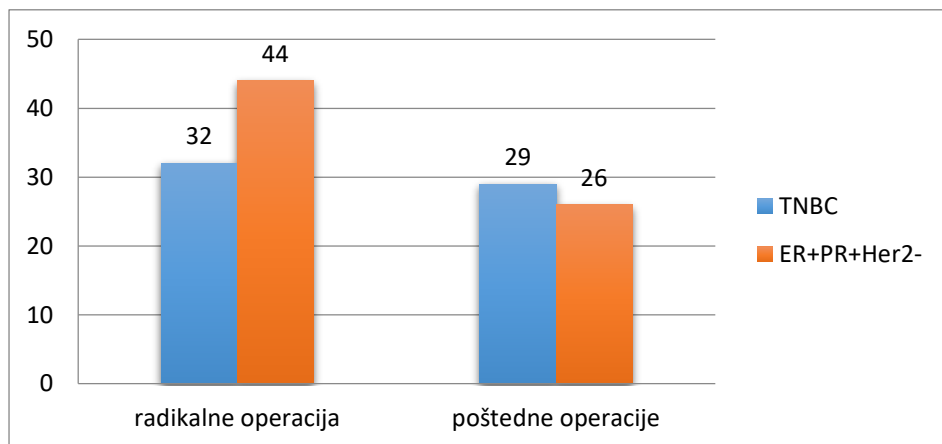
Analiza zastupljenosti nuklearnog gradusa među ispitivanim grupama, pokazala je slične rezultate onima koji su dobijeni za zastupljenost histološkog gradusa tumora, Fisher Exact test, $p=1.0791^{-15}$ (Grafikon 5).

- Nuklearni gradus 1 pronađen je samo u okviru ER+PR+Her2- grupe (5 - 7.14%)
- Nuklearni gradus 2 bio je češći kod ER+PR+Her2- bolesnica nego kod bolesnica sa trostruko negativnim karcinom dojke: 64 (91.4%) prema 25 (41%)
- Nuklearni gradus 3 se češće javlja kod trostruko negativnog karcinoma dojke nego kod ER+PR+Her2- grupe bolesnica: 34 (55.7%) prema 1 (1.4%)



Grafikon 5. Poređenje učestalosti različitog nuklearnog gradusa tumora kod ispitivanih grupa trostruko negativnog karcinoma dojke (n=61) i ER+PR+Her2- (n=70) bolesnica, Fisher Exact test, $p=1.0791^{-15}$

Analizirana je i učestalost dva osnovna tipa operacija u ispitivanim grupama bolesnica – nije bilo statistički značajne razlike u zastupljenosti radikalnih operacija (mastektomija) i poštednih operacija dojke u ispitivanim grupama bolesnica. Većina bolesnica iz obe grupe hirurški je zbrinuta radikalnom operacijom (mastektomija) – 32 u trostruko negativnom karcinomu dojke i 44 u ER+PR+Her2- grupi, ukupno 76. Pored radikalne operacije, rađene su i poštedne operacije dojke sa 29 u trostruko negativnom karcinomu dojke i 26 u ER+PR+Her2- grupi. Statistički značajna razlika između ova dva osnovna tipa operacija nije nađena, Fisher exact test, $p=0.2504$, Grafikon 6.

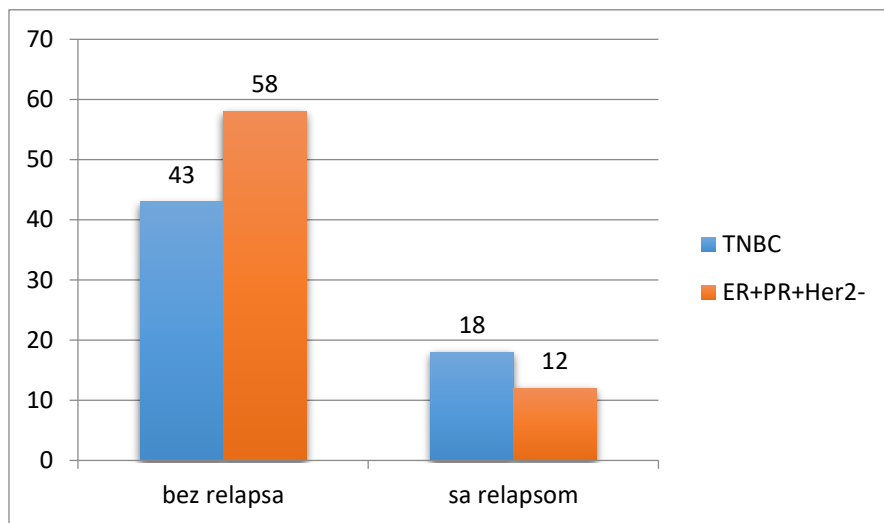


Grafikon 6. Tipovi operacija

Poređen je i klinički tok bolesti između trostruko negativnog karcinoma dojke kod bolesnica koje imaju najlošiju prognozu bolesti i ER+PR+Her2- grupe bolesnica koje imaju najbolju prognozu među obolelima od karcinoma dojke – analizirano je ponovno javljanje bolesti (relaps), zastupljenost metastatskih depozita u različitim tkivima, kao i DFS i OS među ispitivanim grupama bolesnica.

Nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti ponovnog javljanja bolesti (relapsa) između ispitivanih grupa, χ^2 test, $p=0.09294$ (Grafikon 7).

- U grupi trostruko negativnog karcinoma dojke je registrovan nešto veći broj relapsa 18 (29.5%) u odnosu na 12 (17.1%) relapsa u ER+PR+Her2- grupi

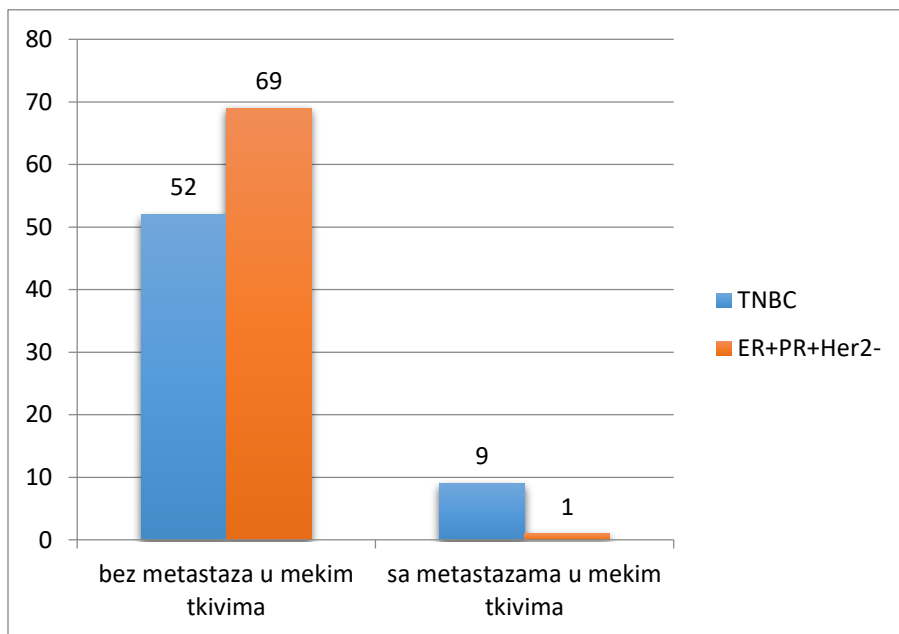


Grafikon 7. Pojava relapsa bolesti u trostruko negativnom karcinomu dojke i ER+PR+Her2- ispitivanim grupama bolesnica

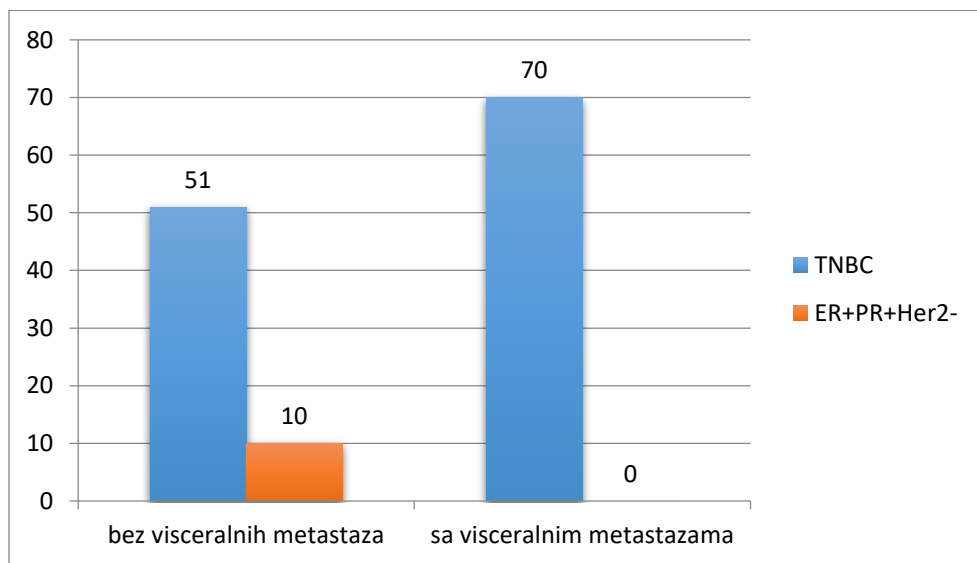
Međutim, kada se posmatra prisustvo udaljenih metastaza, pokazano je da postoji statistički značajna razlika u učestalost metastaza:

- u mekim tkivima – 9 (14.8%) prema 1(1.4%), Fisher exact test, $p=0.00589$ (Grafikon 8).
- u visceri – 10 (16.4%) prema 0, Fisher exact test, $p=0.0484$ (Grafikon 9).
- u mozgu – 4 (6.6%) prema 0, Fisher exact test, $p=0.0445$ (Grafikon 10).

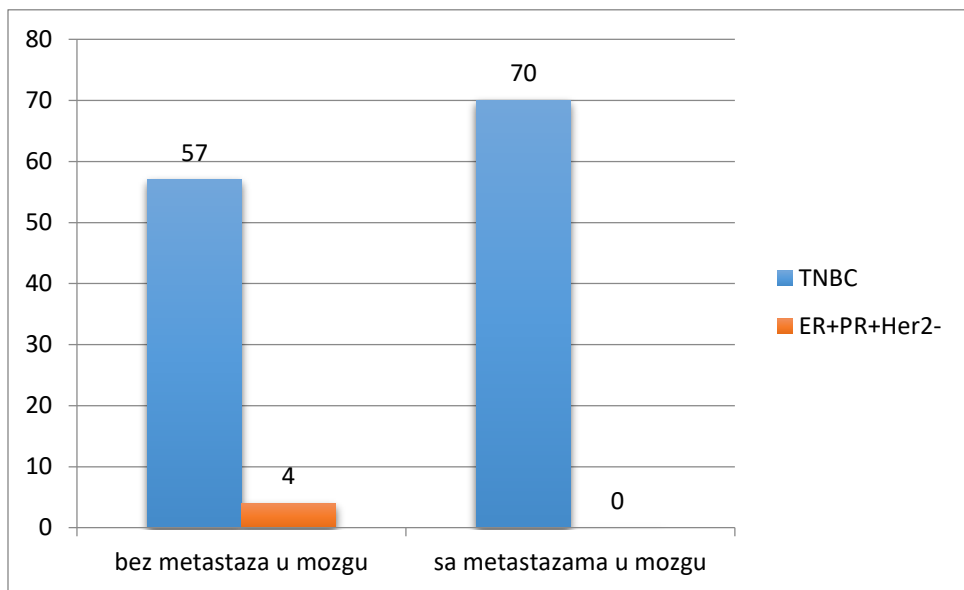
Pokazana je veća učestalost metastaza u mekim tkivima, viscera i mozgu u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke u odnosu na ER+PR+Her2- karcinom dojke. Razlika u zastupljenosti metastaza u kostima između ispitivanih grupa nije nađena (Fisher exact test, $p=0.5131$). U grupi trostruko negativnog karcinoma dojke je detektovano 6 (9.8%) bolesnica koje su razvile metastaze u kostima, dok je u ER+PR+Her2- grupi taj broj iznosio 4 (5.7%).



Grafikon 8. Poređenje pojave metastaza u mekim tkivima između trostruko negativnog karcinoma dojke (n=61) i ER+PR+Her2- grupe (n=70) bolesnica, Fisher exact test, p=0.0059



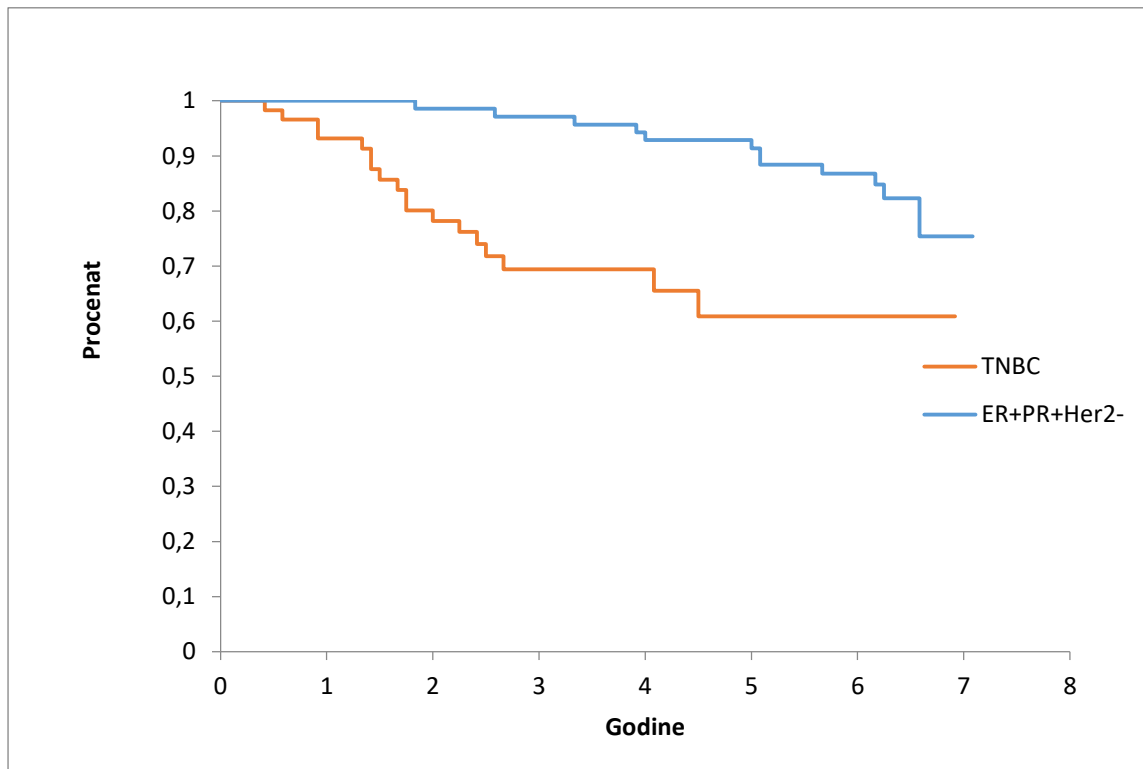
Grafikon 9. Poređenje pojave metastaza u visceri između trostruko negativnog karcinoma dojke (n=61) i ER+PR+Her2- grupe (n=70) bolesnica, Fisher exact test, p=0.0484



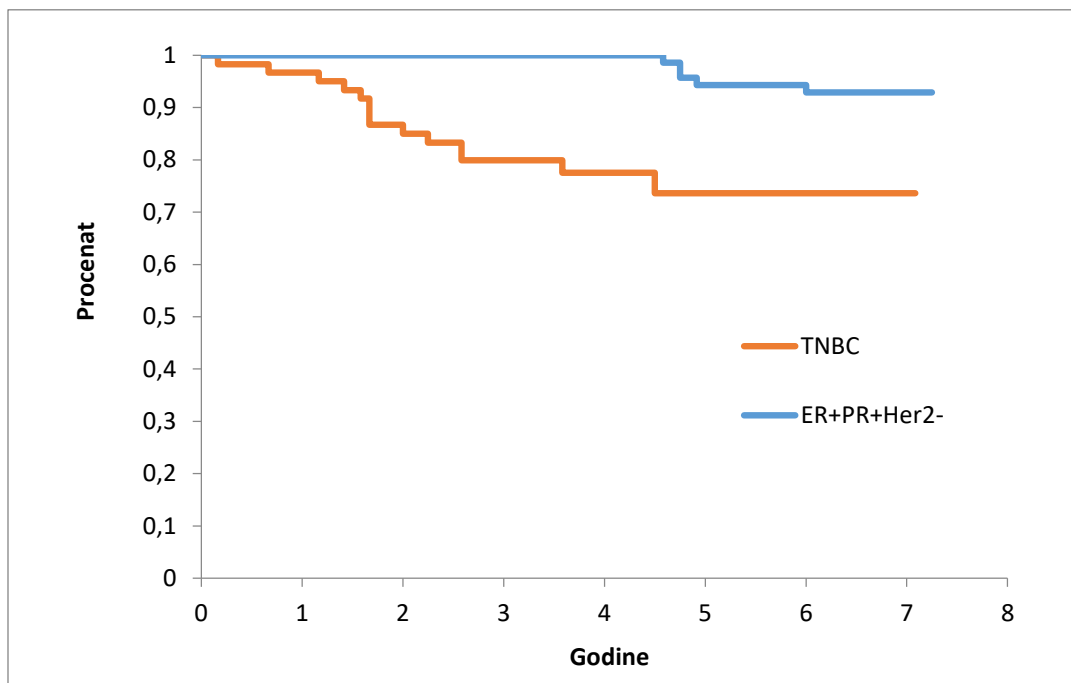
Grafikon 10. Poređenje pojave metastaza u mozgu između trostruko negativnog karcinoma dojke (n=61) i ER+PR+Her2- grupe (n=70) bolesnica, Fisher exact test, p=0.0445

Takođe smo, prateći klinički tok bolesti, upoređivali parametre ishoda bolesti - preživljavanje bez znakova bolesti – DFS i ukupno preživljavanje – OS između analiziranih grupa bolesnica – grupe trostruko negativnog karcinoma dojke i grupe ER+PR+Her2- karcinoma dojke.

Pokazana je statistički značajna razlika između ispitivanih grupa u odnosu na DFS – DFS je bio značajno kraći u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke (medijana nije dostignuta) (log-rank test, p=0.00016). U grupi trostruko negativnog karcinoma dojke je detektovano 18 (29.5%) ponovnih javljanja bolesti prema 12 (17.1%) nađenih u grupi ER+PR+Her2- karcinoma dojke (Grafikon 11). Upoređivanje OS između grupa takođe je ukazalo na značajno kraće preživljavanje bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke u odnosu na obolele od ER+PR+Her2- karcinoma dojke (medijana nije postignuta, log-rank test, p=0.00034). U grupi trostruko negativnog karcinoma dojke je zabeleženo 14 (22.9%) smrtnih ishoda prema 5 (7.1%) u ER+PR+Her2- grupi (Grafikon 12).



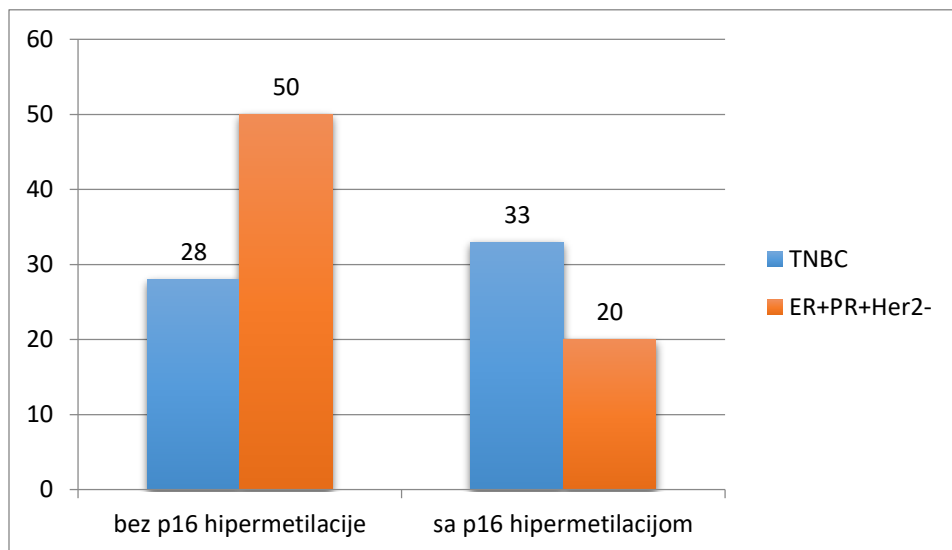
Grafikon 11. Poređenje DFS-a između bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke (n=61) i ER+PR+Her2- bolesnica (n=70), log-rank test, p=0.00016



Grafikon 12. Poređenje OS-a između bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke (n=61) and ER+PR+Her2- bolesnica (n=70), log-rank test, p=0.00034

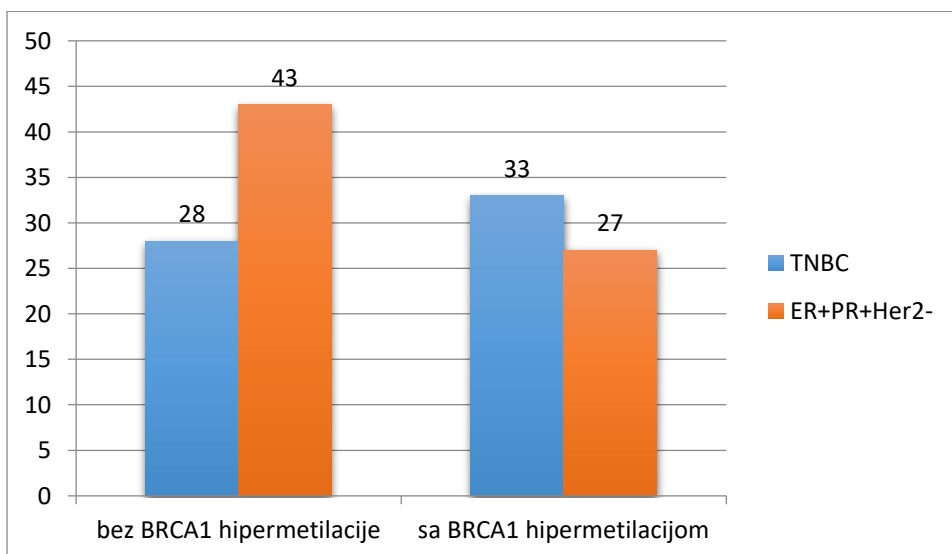
4.2. Poređenje hipermetilacije promotora *BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena

Poređenje hipermetilacije promotora *BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena između grupe trostruko negativnog i grupe ER+PR+, Her2- karcinoma dojke, pokazalo je da se ove dve grupe statistički značajno razlikuju samo u odnosu na učestalost hipermetilacije promotora *p16* gena – statistički značajno veći broj hipermetilacija promotora gena pronađen je u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke: 33 (54.1%) prema 20 (28.6%), χ^2 test, p=0.00298 (Grafikon 13).



Grafikon 13. Poređenje učestalosti hipermetilacije promotora *p16* gena između trostruko negativnog karcinoma dojke (n=61) i ER+PR+Her2- grupe (n=70) bolesnica, χ^2 test, p=0.00298

Iako nije pokazana statistički značajna razlika u učestalosti hipermetilacije promotora *BRCA1* gena između ispitivanih grupa bolesnica, uočen je trend ka većem broju hipermetilacija u bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke: 33 (54.1%) prema 27 (38.6%), χ^2 test, p=0.0752, Grafikon 14.



Grafikon 14. Poređenje učestalosti hipermetilacije promotora *BRCA1* gena između trostruko negativnog karcinoma dojke (n=61) i ER+PR+Her2- grupe (n=70) bolesnica, χ^2 test, p=0.0752.

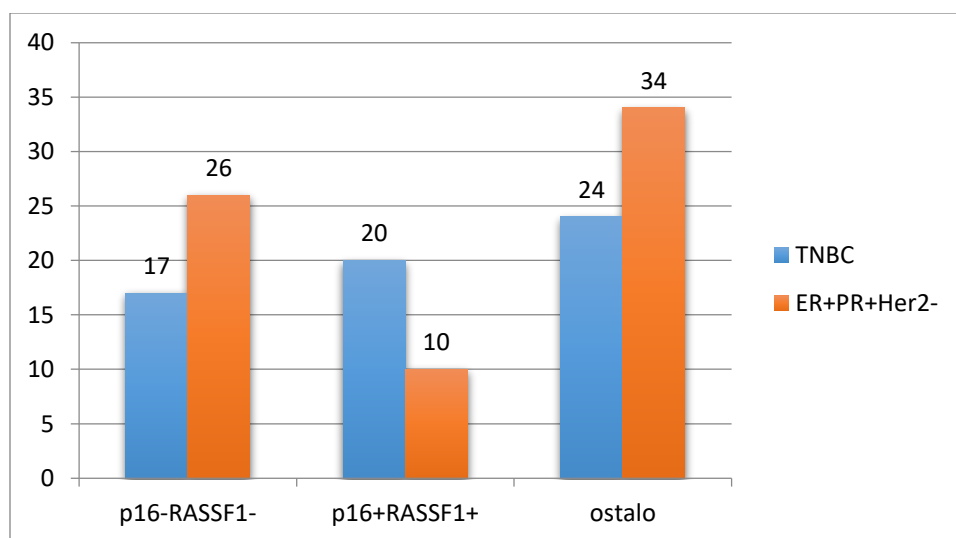
Nisu pronađene statistički značajne razlike u učestalosti hipermetilacije promotora:

- *O⁶MGMT* gena – 22 (36,1%) prema 21 (30%), χ^2 test, p=0.4608
- *CDH1* gena – 28 (45,9%) prema 30 (42,9%), χ^2 test, p=0.7264
- *RASSF1A* gena – 31(50,8%) prema 34 (48,6%), χ^2 test, p=0.7974

između trostruko negativnog karcinoma dojke i ER+PR+Her2- grupe.

4.3. Poređenje ko-metilacije promotora *BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena

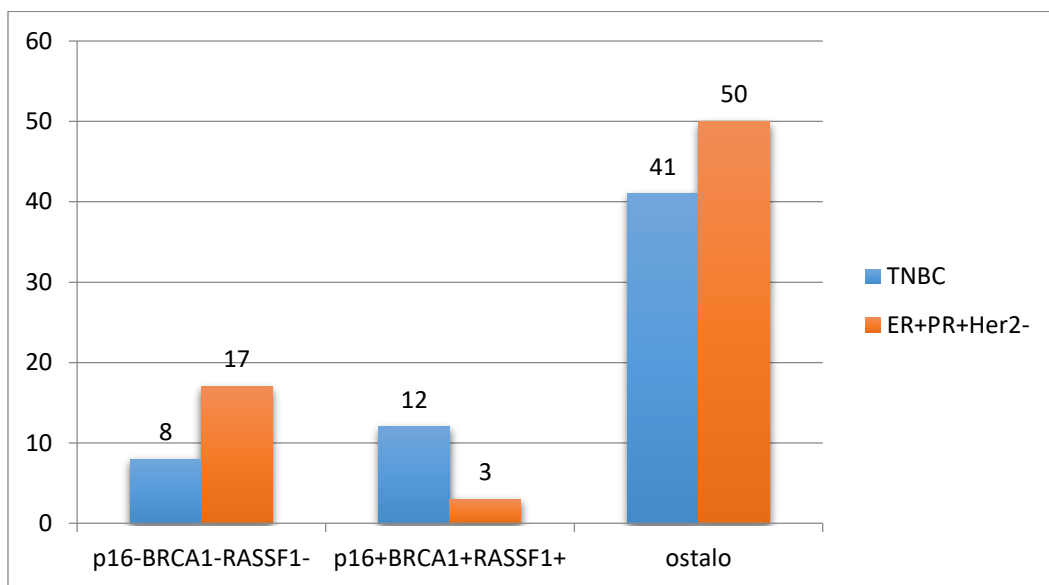
Međutim, ako se posmatra učestalost ko-metilovanih gena u trostruko negativnom karcinomu dojke i ER+PR+Her2- grupi bolesnica, uočava se da je učestalost kometilovanih promotora *p16* i *RASSF1A* (*p16*+*RASSF1A*+) gena značajno veća u grupi sa trostruko negativnim karcinomom dojke nego u ER+PR+Her2- grupi : 20 (32,8%) prema 10 (14,3%), χ^2 test, p=0.0225 (Grafikon 15).



Grafikon 15. Poređenje ko-metilacije promotora *p16* i *RASSF1A* gena između trostruko negativnog karcinoma dojke (n=61) i ER+PR+Her2- grupe (n=70) bolesnica. χ^2 test ,p=0.0225.
+ (hipermetilovani gen), - (nemetilisani gen)

Poređenje učestalosti ko-metilovanih/nemetilovanih *p16*, *BRCA1* and *RASSF1A* promotora gena među bolesnicama sa karcinomom dojke sa trostruko negativnim karcinomom dojke i

ER+PR+Her2- karakteristikama, pokazalo je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa. Statistički značajno veća učestalost hipermetililovanih gena nađena je u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke u odnosu na ER+PR+Her2- grupu: 12 (19.7%) prema 3 (4.3%), χ^2 test $p=0.00791$ (Tabela 16).

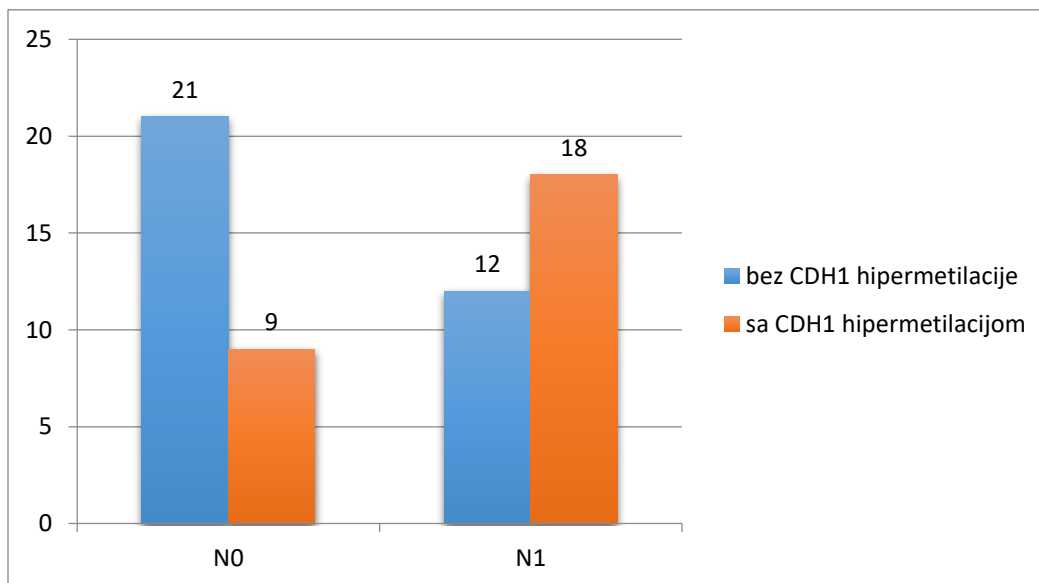


Grafikon 16. Poređenje učestalosti ko-metilisanih promotora *p16*, *BRCA1* i *RASSF1A* gena između trostruko negativnog karcinoma dojke (n=61) i ER+PR+Her2- grupe (n=70) bolesnica, χ^2 test, $p=0.0791$. + (hipermetilovani gen), - (nemetilovani gen)

4.4. Poređenje pojave lokalnog recidiva i metastaza bolesti

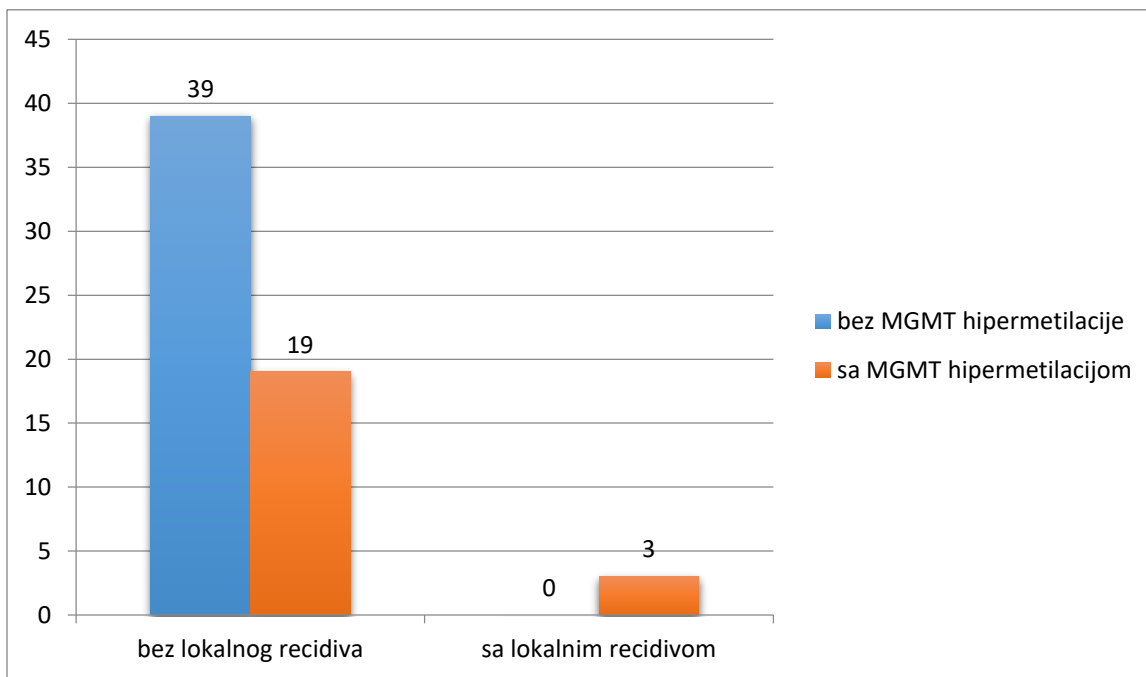
Urađeno je i poređenje parametara tumora sa učestalošću metilacije ispitivanih gena kako u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke, tako i u grupi ER+PR+Her2- bolesnica.

Pokazano je da se u grupi bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke veća učestalost hipermetilacije promotora *CDHI* gena javlja u podgrupi bolesnica sa prisutnim regionalnim metastazama u limfnim čvorovima (pN1). U tumorima bolesnica sa prisutnim metastazama (pN1) detektovano je 18 (64.3%) hipermetilacija *CDHI* gena, dok je kod bolesnica bez regionalnih metastaza (pN0) detektovano 9 (32.1%) hipermetilacija *CDHI* gena (χ^2 test, $p=0.01952$). (Grafikon 17).



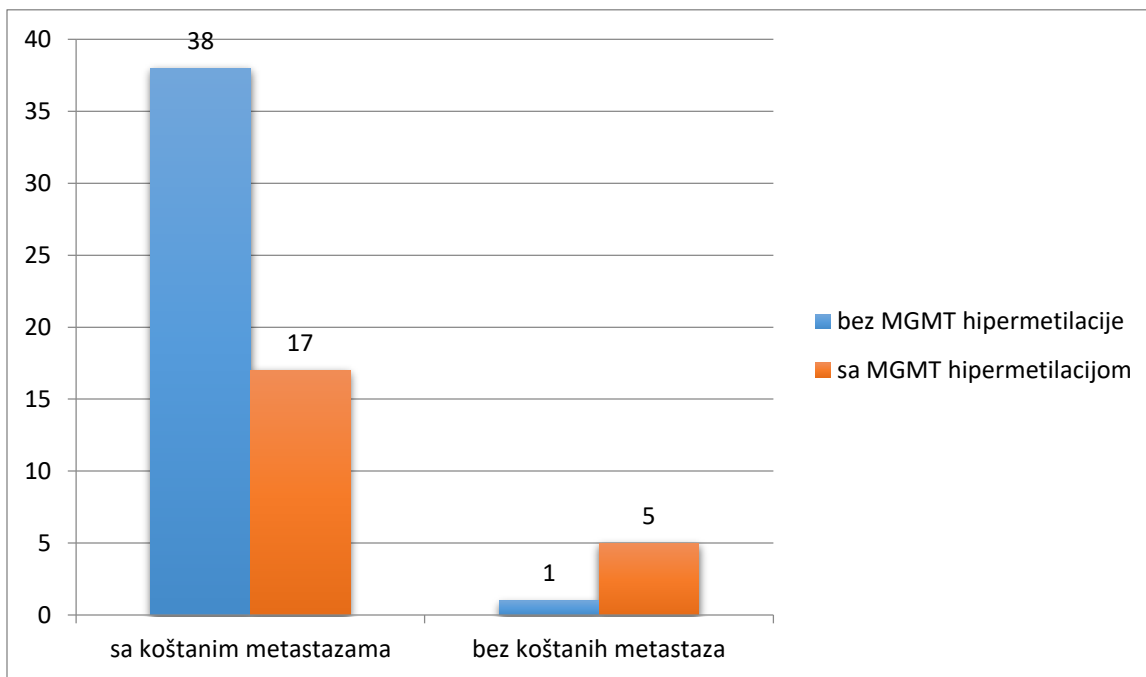
Grafikon 17. Pojava regionalnih metastaza kod bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke poređena sa hipermetilacijom promotora CDH1 gena, χ^2 test, $p=0.01952$

Analiza učestalosti hipermetilacije promotora *O⁶MGMT* gena grupi trostruko negativnog karcinoma dojke, pokazala je da u odnosu na pojavu lokalnog recidiva postoji statistički značajna razlika u učestalosti hipermetilovanog *O⁶MGMT* gena između bolesnica sa ili bez lokalnog recidiva – veći broj hipermetilovanog *O⁶MGMT* gena nađen je u grupi bolesnica bez lokalnog recidiva (19 – 86.4% prema 3 – 13.6%, Fisher exact test, $p=0.0428$) (Grafikon 18).



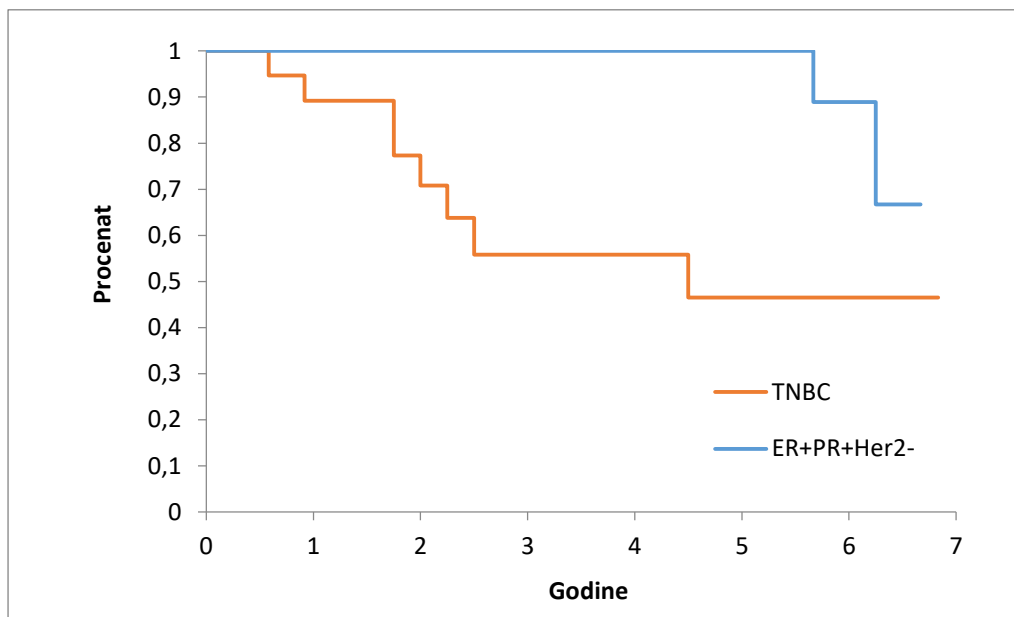
Grafikon 18. Pojava lokalnog recidiva kod bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke poređena sa hipermetilacijom promotora *O⁶MGMT* gena, Fisher exact test, p=0.0428

U istoj grupi bolesnica pokazano je da je manja učestalost hipermetilovanog *O⁶MGMT* gena nađena kod bolesnica sa metastazama na kostima u odnosu na bolesnice bez metastatske bolesti na kostima (5 – 22.7% prema 17 -77.3%, Fisher exact test, p=0.0198) (Grafikon 19).



Grafikon 19. Pojava koštanih metastaza kod bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke poređena sa hipermetilacijom promotora *O⁶MGMT* gena, Fisher exact test, $p=0.0198$

Statistički značajna razlika u DFS-u i OS-u u odnosu na metilacioni status pojedinačno za *p16*, *RASSF1A*, *BRCA1*, *CDH1* gen nije pronađena poređenjem ispitivanih grupa bolesnica. Međutim, ako se uporedi ko-metilacija *p16* i *RASSF1A* gena, (*p16+RASSF1A+*), uočava se da je DFS značajno kraći kod bolesnica sa oba metilovana gena iz grupe trostruko negativnog karcinoma dojke u odnosu na ER+PR+Her-2- grupu (8/20 (40%) prema 2/10 (20%) (medijana 54 meseca prema medijana nije dostignuta), log-rank test, $p=0.03272$ (Grafikon 20).



Grafikon 20. Poređenje DFS u odnosu na ko-metilaciju *p16* i *RASSF1A* gena između trostruko negativnog karcinoma dojke (n=20) i ER+PR+Her2- bolesnica sa karcinomom dojke (n=10), log-rank test, p=0.03272

Među bolesnicama sa trostruko negativnim karcinomom dojke, nije uočena statistički značajna razlika u DFS-u između *p16+RASSF1A+* (n=20) i *p16-RASSF1A-* (n=17) podgrupe bolesnica. Medijana DFS-a za *p16+RASSF1A+* podgrupa trostruko negativnog karcinoma dojke je bila 54 (≥ 27 meseci). Medijana DFS-a u *p16-RASSF1A-* podgrupi nije dostignuta. Broj bolesnica sa relapsom bolesti je bio 8/20 (40%) prema 4/17 (23.5%).

Poređenje OS nije pokazalo statistički značajnu razliku, ali postoji trend ka kraćem ukupnom preživljavanju kod bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke sa ko-metilovanim *p16* i *RASSF1A* genima (log-rank test, p=0.062). Kada se u analizu doda i hipermetilovani promotor *BRCA1* gena (*p16+RASSF1A+BRCA1+*), ne uočava se statistički značajna razlika u DFS-u i OS-u između ispitivanih grupa bolesnica.

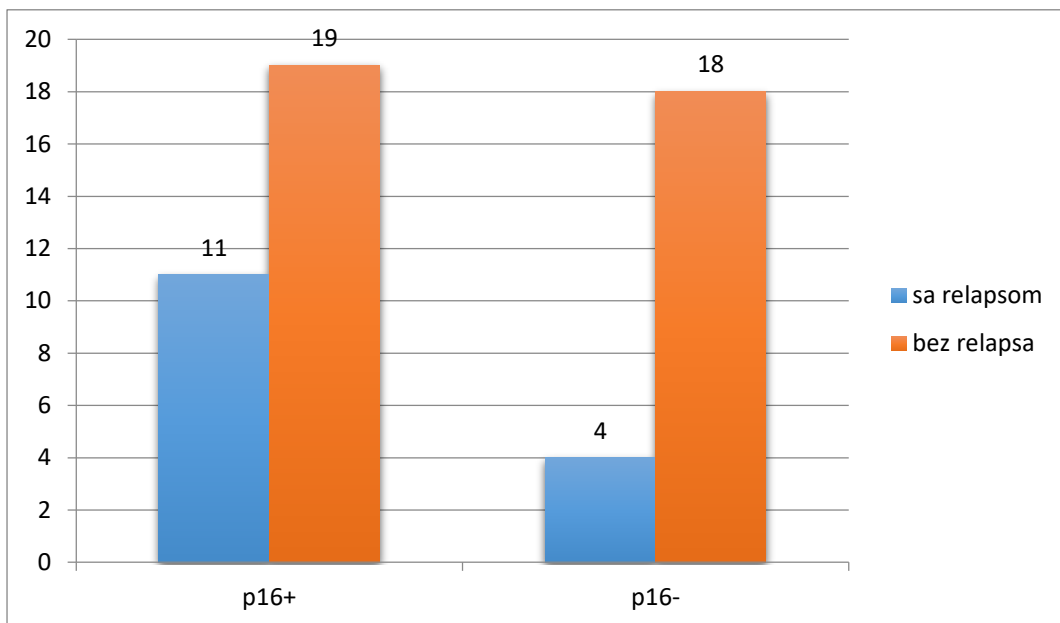
Takođe, ne uočava se statistički značajna razlika u DFS-u i OS-u između bolesnica sa hipermetilovanim ili nemetilovanim *p16*, *BRCA1* i *RASSF1A*, genima pojedinačno ili u

kombinaciji kako u okviru grupe trostruko negativnog karcinoma dojke, tako i u okviru ER+PR+HER2- grupe bolesnica.

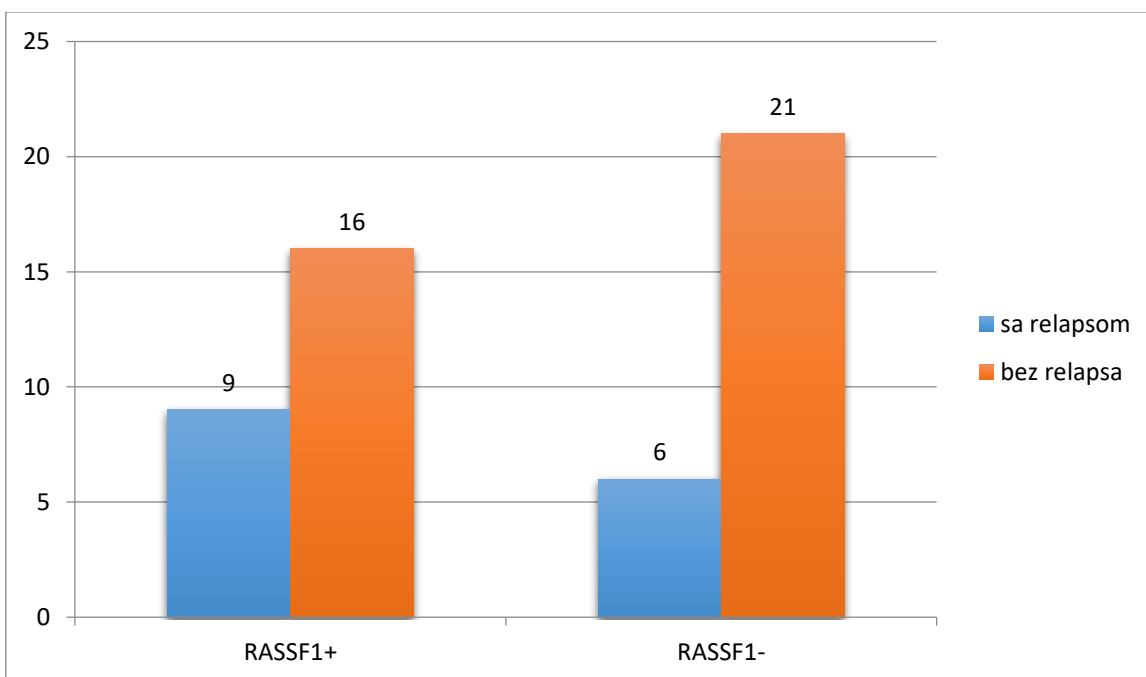
U okviru bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke, ispitivali smo i povezanost metilacionog statusa promotora gena sa odgovorom na adjuvantnu hemioterapiju da bismo utvrdili da li u postojećoj grupi metilacioni status ispitivanih gena može da posluži kao eventualni pokazatelj odgovora na terapiju. U ovim analizama ispitivali smo pojavu ponovnog javljanja bolesti (relapsa) nakon adjuvantne hemioterapije u odnosu na metilacioni status *p16*, *RASSF1A* i *O⁶MGMT* gena.

U okviru grupe trostruko negativnog karcinoma dojke koja je bila na dodatnoj hemioterapiji koja uključuje CMF i FAC/FEC protokole (n=52) uporedili smo učestalost relapsa bolesti u zavisnosti od metilacionog statusa *p16* gena. Statistički značajna razlika nije potvrđena, χ^2 test, p=0.146, Grafikon 21.

U istoj grupi bolesnica poređena je učestalost relapsa bolesti u zavisnosti od metilacionog statusa *RASSF1A* gena. Statistički značajna razlika nije pronađena, χ^2 test, p=0.273, Grafikon 22.

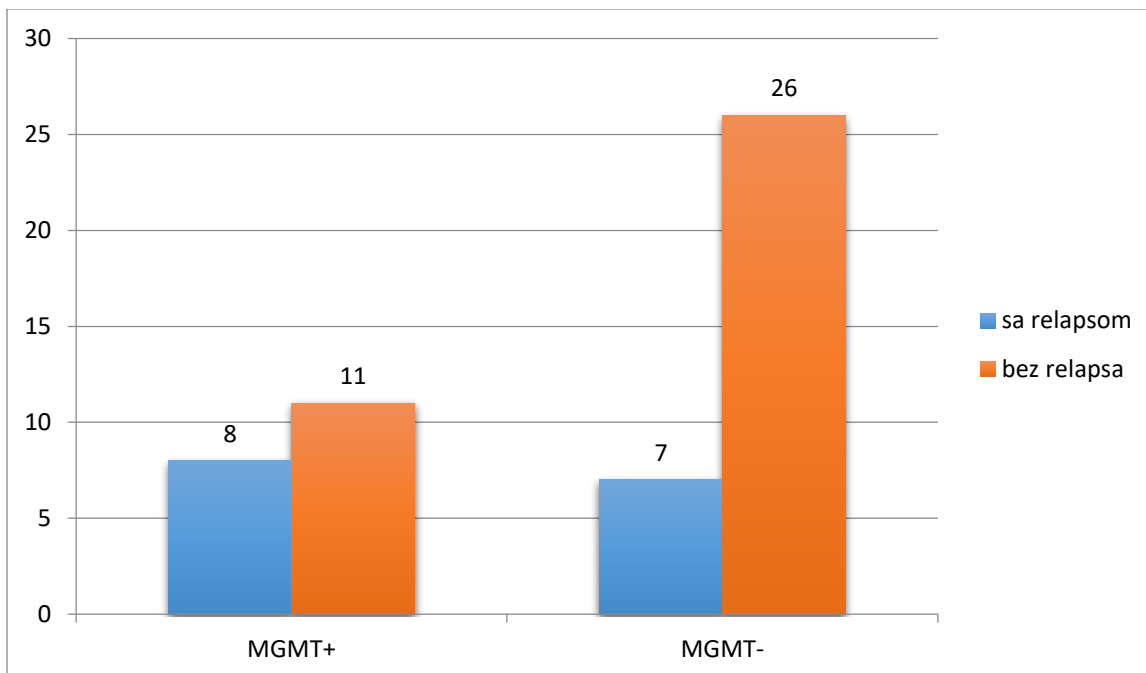


Grafikon 21. Poređenje pojave relapsa bolesti u zavisnosti od statusa hipermetilacije *p16* gena u okviru grupe bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke koje su primale hemioterapiju χ^2 test, $p=0.146$



Grafikon 22. Poređenje pojave relapsa bolesti u zavisnosti od statusa hipermetilacije *RASSF1A* gena u okviru grupe bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke koje su primale hemioterapiju χ^2 test, $p=0.273$

Poređenje pojave relapsa bolesati u grupi bolesnica sa trostruko negativnog karcinoma dojke koje su primale adjuvantnu sistemsku terapiju u koju su bili uključeni alkilirajući agensi u zavisnosti od metilacionog statusa promotora *O⁶MGMT* gena nije pokazalo postojanje statistički značajne razlike, χ^2 test, $p=0.109$, Grafikon 23.



Grafikon 23. Poređenje pojave relapsa bolesti u zavisnosti od statusa hipermetilacije *O⁶MGMT* gena u okviru grupe bolesnica sa trostruko negativnog karcinoma dojke koje su primale hemioterapiju χ^2 test, $p=0.109$

5. DISKUSIJA

Karcinom dojke je najčešće dijagnostikovani rak kod žena, sa incidencijom (43,3 na 100 000) (133) i učestaliji je od drugih karcinoma kod žena u mlađem uzrastu (133). Otkrivanje karcinoma dojke u ranoj fazi ključ je za uspješno lečenje bolesti. Tokom protekle decenije, nova saznanja iz oblasti molekularne onkologije i genetike karcinom dojke opisuju kao heterogenu, sistemsku bolest (134, 135, 136, 137) i klasifikuju je u podtipove sa različitim kliničkim i patološkim osobinama, različitim terapijskim odgovorom i različitim ishodom bolesti (138, 139).

Mamografija ima osetljivost i specifičnost veću od 70% i 85% kod većih tumora (140), ali ako je tumor manji od 1 cm, osetljivost je smanjena, tako da otkrivanje novih biomarkera, uključujući i epigenetičke, omogućili bi bržu dijagnozu u ovoj podgrupi (140). Nakon početka lečenja, za praćenje bolesnika, najčešće korišćeni markeri tumora u serumu su karcinoembrionalni antigen (CEA) i CA15-3. Oni služe da bi se pratio terapijski odgovor i predvidela prognoza (141). Iako su visoke koncentracije CEA i CA15-3 povezane s lošijom prognozom i lošijim odgovorom na terapiju, ograničene su mogućnosti upotrebe ovih markera seruma za rutinsko praćenje kod bolesnika sa karcinomom dojke (141, 142). Tumor marker CA15-3 je marker za karcinom dojke i za rak debelog creva, a slično CEA je serumski tumorski marker za karcinom dojke, debelog creva, pluća i mokraćne bešike (143). CA15-3 se povećava samo u oko 10% bolesnika sa karcinomom dojke prvog stadijuma. Tako da rano otkrivanje karcinoma dojke nije moguće sa ovim konvencionalnim serumskim tumorskim markerom (141, 143), tako da su neophodne invazivne preventivne dijagnostičke metode u ovom trenutku, posebno za asimptomatske bolesnike.

Biopsija tankom iglom i patohistološka dijagnoza uključujući i imunohistohemijsko određivanje bioloških markera je "zlatni standard" je za određivanje podtipova karcinoma dojke; služi za procenu prognoze i određivanje sistemske terapije (144, 145). Svaki novi podatak koji bi mogao da doprinese razumevanju biologije karcinoma dojke i koji direktno dovodi do bolje dijagnoze i lečenja vrlo je značajan (146). Određene studije utvrdile su molekularnu klasifikaciju karcinoma dojke uz pomoć različitih profila genske ekspresije

(137). Ta klasifikacija sa profilom ekspresije gena je najbolji način da se vizualizuje heterogenost karcinoma dojke, ali u kliničkoj upotrebi je zbog troškova i praktične primene načinjena druga klasifikacija (147).

Tako su molekularni podtipovi karcinoma dojke podeljeni na osnovu prisustva biološkog markera za hormonske receptore (HR), HER2 statusa, indeksa ćelijske proliferacije i histološkog gradusa (148). Klasifikacija je zasnovana na imunohistohemijskim analizama (IHH) koje je preporučio St. Gallen Ekpert Consensus (77, 149). Tada je prihvaćen standard rutinske kliničke pretrage i karcinom dojke je klasifikovan u pet molekularnih subtipova (Luminal A, Luminal B / HER2 negativni, Luminal B / HER2 pozitivni, HER2-tip i trostruko negativan karcinom dojke).

Najveća razlika je primećena u ekspresiji gena između HR pozitivnih i HR negativnih tumora. Hormon receptor (HR) pozitivni tumori su podijeljeni na dve podgrupe: luminal A (ER +, PR +, HER2-) i luminalni B (ER +, PR +, HER2 +). I jedni i drugi imaju receptore za estrogen i progesteron, ali razlikuju se u ekspresiji HER2 proteina . Estrogen-zavisni kanceri čine oko 60% karcinoma dojke i imaju dobru prognozu (136).

HR negativni tumori su podeljeni na tri različite podgrupe: HER2 (ER-, PR-, HER2 +), normal-like (ER ±, PR ±, HER2-) i basal-like (ER-, PR-, HER2-; trostruko negativni karcinom dojke). Oni obuhvataju 40% svih slučajeva raka dojke (136). Imaju različite prognoze i opcije lečenja. U tom smislu, najlošija prognoza i opcija lečenja je kod trostruko negativnog karcinoma dojke koji nemaju estrogen, progesteron i HER2 receptor i ova studija je istraživala hipermetilaciju grupe gena kod trostruko negativnog karcinoma dojke.

Klasifikacija u kliničkom radu pomaže razvrstavanju bolesnika u grupe sa sličnim prognozama i odgovorom na primenjenu terapiju. Tako pomaže optimizaciju terapije za svakog pojedinačnog bolesnika.

Oko pola miliona žena umre svake godine od karcinoma dojke u svetu, od čega se 150 000 procenjuje da su bolesnice sa trostruko negativnim karcinomom dojke (150) i tako one predstavljaju oko 30% umrlih žena od karcinoma dojke.

Češće se javlja kod afričkih žena u mlađim godinama, naročito onima sa višim indeksom telesne mase (151); tumori trostruko negativnog karcinoma dojke su višeg gradusa, visok je mitotski indeks; često je pri dijagnostikovanju uznapredovali stadijum sa zapaljenskim karcinomom dojke.

I naša studija je pokazala da je histološki gradus 3 bio izrazito češće zastupljen u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke nego u ER+PR+Her2- grupi bolesnica: 31 (50.8%) prema 1 (1.4%). Takođe nije bilo bolesnice sa histološkim gradusom 1 kao u grupi bolesnica ER+PR+HER2- karcinom dojke (8,6%). Analiza nuklearnog gradusa između ispitivanih grupa bolesnica pokazala je slične rezultate.

Trostruko negativni karcinom dojke je jedini klinički podtip karcinoma dojke za koji nije otkrivena adekvatna ciljana terapija, što je posledica nedostatka adekvatnih bioloških markera za ovaj tip karcinoma dojke. Zapravo, u prethodnom periodu anti-HER2 terapije, HER2 + karcinom dojke je imao još lošije preživljavanje od trostruko negativnog karcinoma dojke (152, 153), a trenutno HER2 + karcinom dojke ima preživljavanje petogodišnje slično hormonsko-pozitivnom bolešću zahvaljujući ciljanoj terapiji trastuzumabom.

Kada se suočavaju sa trostruko negativnim karcinomom dojke lekari su ograničeni na upotrebu hirurške intervencije, radioterapije i hemoterapije. Međutim, kliničko iskustvo pokazuje da sve bolesnice sa trostruko negativnim karcinomom dojke ne reaguju na hemioterapiju (154, 155, 156), tako da možemo reći da je to više od jedne bolesti.

Uzimajući u obzir starost pri dijagnozi, uočava se da trostruko negativni karcinom dojke može imati bimodalnu distribuciju sa prvim češćim oboljevanjem kod premenopauzних žena i drugim češćim oboljevanjem nakon 70-e godine života (81, 157, 158, 159). Prognoza

trostruko negativnog karcinoma dojke u premenopauzi je lošija nego kod starijih žena sa trostruko negativnim karcinomom dojke.

Agresivna biologija se odražava na lošu prognozu (160). Velika većina trostruko negativnog karcinoma dojke su invazivni duktalni karcinomi. Karakteristično je da trostruko negativni karcinom dojke ima ređe pozitivne limfne čvorove nego drugi karcinomi dojke (161), ali to u našoj studiji nije bilo statistički značajno; ali je primećen trend veće zastupljenosti bolesnica sa zahvaćenim limfnim čvorovima u grupi ER+PR+HER2- nego u grupi bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke (55,7% prema 49,2%).

Navodi se da je najčešći histološki tip trostruko negativnog karcinoma dojke duktalni karcinom, a prisutan je i medularni karcinom, metaplastični karcinom, adenoidni cistični karcinom i apokrini / histiocitoidni karcinom (162, 163, 164, 165). Statistički značajnu razliku u zastupljenosti histoloških tipova invazivnog karcinoma dojke pronašli smo u naše dve ispitivane grupe gde je invazivni duktalni karcinom bio najučestaliji histološki tip tumora (38 - 62.3% u grupi trostruko negativnog karcinoma; 31 – 44.3% u ER+PR+Her2-). Invazivni lobularni karcinom je bio izrazito češće zastupljen u grupi ER+PR+Her2- (34 – 48.6%) nego u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke (8 – 13.1%). Prisustvo medularnog histološkog tipa detektovano je samo u grupi sa trostruko negativnim karcinomom dojke sa učestalošću od 13.1% (n=8). Medularni histološki tip karcinoma dojke se povezuje sa prisustvom histološkog gradusa 3 i sledstveno tome, označava agresivni fenotip karcinoma dojke (166).

Trostruko negativni karcinom dojke ima agresivno ponašanje sa prezentacijom često kao već metastatski u trenutku otkrivanja; ili velike lokalno uznapredovale tumorske lezije u dojci ili metastatske bolesti koje se razvija neposredno nakon adjuvantne hemoterapije (167, 168, 169). Karakteristika trostruko negativnog karcinoma dojke je da često metastaziraju u unutrašnje organe (jetra i pluća) ili mozak (167, 168, 169).

U našoj studiji nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti ponovnog javljanja bolesti (relapsa) između ispitivanih grupa, a kao mogući razlog najverovatnije je medijana

praćenja bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke koja je u našoj studiji 43 meseca, i to je kritično vreme za javljanje relapsa kako navodi više studija (157). Ipak je u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke registrovan nešto veći broj relapsa (29.5%) u odnosu na učestalost relapsa u ER+PR+Her2- grupi (17.1%) .

Međutim, kada se posmatra prisustvo udaljenih metastaza, pokazano je da postoji statistički značajna razlika u učestalost metastaza u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke u odnosu na ER+PR+Her2- karcinom dojke: u mekim tkivima (14.8%) prema (1.4%), u visceri (16.4%) prema 0, u mozgu (6.6%) prema 0. Razlika u zastupljenosti metastaza u kostima između ispitivanih grupa nije nađena. U grupi trostruko negativnog karcinoma dojke je detektovano (9.8%) bolesnica koje su razvile metastaze u kostima, dok je u ER+PR+Her2- grupi taj broj iznosio 4 (5.7%).

Agresivan tok trostruko negativnog karcinoma dojke nije uvek slučaj, jer može imati i klinički tok bliži ER + karcinomu dojke, sa samo zahvaćenim metastazama u limfnim čvorovima i kostima (170). Međutim, granica koja se koristi za definisanje ER i PR negativnosti vremenom se promenila, što je rezultiralo neskladom u upotrebljenim definicijama u literaturi (<10% nasuprot <1% prisutnih ćelija koje pokazuju pozitivnost na prisustvo receptora za ER i PR. Sadašnja definicija (koju su ustanovili Američki koledž patologije, Američko udruženje za kliničku onkologiju i smernice St. Gallen), je da manje od 1% definiše negativnost karcinoma dojke za estrogen i progesteron; dok je HER2 negativnost definisana kao ekspresija imunohistohemije (IHH) od 0-1 + ili nedostatak amplifikacije gena (Fluorescencija, In Situ Hibridization (FISH), kod nalaza 2+ (171, 172, 173).

Shodno tome, endokrina terapija je trenutno propisana za bolesnice sa ekspresijom ER od najmanje 1% u svim stadijumima karcinoma dojke. Ovo je dovelo do formiranja podgrupe bolesnica (vrednost ER od 1-10%) koji su ranije smatrani ER negativnim, ali koji će prema trenutnim preporukama dobiti endokrinu terapiju.

Najveći rizik od recidiva kod bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke je treća godina i tada se klinički ishod pogoršava. Takođe, preživljavanje nakon relapsa je smanjeno u poređenju sa drugim podtipovima karcinoma dojke (157).

U studiji Hennigs-a i saradnika je ustanovljeno da trostruko negativni karcinom dojke ima lokalnu kontrolu i ukupnu stopu preživljavanja od 89,6% i 78,5%, respektivno, u poređenju sa 99,1% i 95,1% kod bolesnica sa luminalnim tumorima tipa A (174). Tako da su luminal A i trostruko negativni karcinom dojke ekstremi u pogledu prognoze.

I naša studija je pokazala statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa u odnosu na DFS. DFS je bio značajno kraći u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke; 29.5% ponovnih javljanja bolesti prema 17.1% nađenih u grupi ER+PR+Her2- karcinom dojke. Upoređivanje OS između grupa takođe je ukazalo na značajno kraće preživljavanje bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke u odnosu na obolele od ER+PR+Her2- karcinom dojke tako da je u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke je zabeleženo 22.9% smrtnih ishoda prema 7.1% u ER+PR+Her2- grupi.

Poznato je da trostruko negativni karcinom dojke dobro reaguje na neoadjuvantnu hemioterapiju, a stope patološkog potpunog odgovora (pCR) imaju tendenciju da budu veće nego kod drugih podtipova (71), iako je potrebno napomenuti da HER2+ karcinom dojke takođe ima visoku stopu pCR. U metaanalizi, Vu sa saradnicima je ustanovio je da je pCR stopa u trostruko negativnom karcinomu dojke bila 28,9% u odnosu na 12,5% za druge karcinome dojke (175). Jasno je utvrđeno da je pCR generalno povezan sa boljim preživljavanjem, ali je kod trostruko negativnog karcinoma dojke to izraženije (71, 176).

Do danas nema prediktivnih faktora koji identifikuju podgrupe bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke koji će na kraju ostvariti pCR. Iako bolesnice koji postignu pCR imaju bolju prognozu, većina bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke ima rezidualnu bolest nakon preoperativne hemioterapije i obično je prisutno brzo napredovanje bolesti u narednih 3-5 godina (84, 161, 177, 178, 179).

Heterogenost trostruko negativnog karcinoma dojke prisutna je i u vremenu pojavljivanja relapsa. Za razliku od ER + karcinom dojke, čija je kriva relapsa linearna, trostruko negativni karcinom dojke ima višu stopu recidiva u prvih 5 godina, a nižu stopu nakon toga. Čak se navode da postoje dva različita vremenska pika pojave relapsa (159). Kasni relaps bolesti je generalno povezan sa manje agresivnom bolešću, često sa metastazama kostiju. (170, 177). Grupa bolesnica koji imaju kasni relaps i dobru prognozu, mogu predstavljati 10% tumora koji su lažno negativni za ER+ (180).

Mnogi su koristili termine trostruko negativni karcinom dojke i "basal-like" kao sinonim (139). Bazalni tumori (sastoji se ćelija koje potiču iz ćelija bazalnih kanala) čine najveći deo grupe trostruko negativnog karcinoma dojke (70%-90%), dok ostali nisu bazalni (sastoji se od ćelija koje ne potiču iz bazalnih ćelija). Bazalni podtip predstavlja homogenu grupu tumora sa zajedničkim genskim profilom, odgovorom na tretman i predviđanjem toka bolesti (181, 182, 183, 184).

Iako je učinjen značajan napredak u razumevanju biologije karcinoma dojke, etiologija ove bolesti i dalje nije potpuno jasna. Slično kao i u drugim tipovima karcinoma, aktivacija proto onkogeni i inaktivacija tumor supresornih gena doprinosi progresiji bolesti. Genetičke promene kao što su tačkaste mutacije i hromozomske translokacije su najčešće odgovorne za inaktivaciju tumor supresornih gena. Pored toga, alternativni ali ne manje važni mehanizmi za inaktivaciju tumor supresornih gena uključuju epigenetičke promene kao što su metilacija DNK i modifikacija histona koji u kooperaciji utiču na strukturu hromatina i stabilnost genoma. Nakon otkrića hipermetilacije promotora *Rb* gena (tumor supresorni gen povezan sa retinoblastomom), pokazano je da i brojni drugi tumor supresorni geni uključujući *p16*, *MLH1* i *BRCA1* gene takođe podležu tumor-specifičnom utišavanju procesom hipermetilacije promotora (185, 186). Ovi geni su uključeni u popravku oštećenja DNK, ćelijski ciklus, ćelijsku adheziju, apoptozu i angiogenezu. Pored toga što direktno aktivira tumor supresorne gene, DNK hipermetilacija može i indirektno utišati druge gene inhibirajući njihove transkripcione faktore.

Hipermetilacija velikog broja tumor supresorskih gena dovedena je u vezu sa lošom prognozom kod više tipova karcinoma, između ostalih i sa lošom prognozom kod karcinoma dojke (187, 188, 189, 190). U karcinoma dojke aberantna metilacija može biti povezana sa odsustvom ekspresije različitih gena, uključujući gene inhibitore ćelijskog ciklusa (*p16*, *RASSF1A*) i gena za popravak DNK (DNK reparacionih gena) (*BRCA1*) (191).

Epigenetičke promene, definisane kao nasledne, reverzibilne promene u genskoj ekspresiji na nivou ćelije, koje se javljaju bez promena u DNK sekvenci gena, predstavljaju jedan od najznačajnijih mehanizama utišavanja gena tokom maligne transformacije. Epigenetičke promene su čak češće od genetičkih promena - mutacija koje podrazumevaju promenu u strukturi gena. Najvažniji epigenetički mehanizmi podrazumevaju DNK metilaciju, modifikaciju histona i modifikaciju ne-kodirajuće DNK. U normalnim ćelijama, geni uključeni u važne ćelijske procese su ne-metilovani što omogućava njihovo adekvatno funkcionisanje. Pokazano je da metilacioni status u genomu malignih ćelija odstupa od onog u normalnim ćelijama – odlikuje se hipermetilacijom DNK koja se odvija u CpG ostrvcima, najčešće na mestima početka transkripcije tzv promotorskim regionima različitih gena. Hipermetilacija je jedan od osnovnih vidova inaktivacije DNK reparacionih gena (*hMLH1*, *MGMT*, *VHL*, *WRN*, *BRCA1*), gena regulatora ćelijskog ciklusa (*p16INK4a*, *p15INK4b*, *p14ARF*, *Rb*), gena odgovornih za adheziju ćelija (*CDH1* (E-kadherin), *CDH13*, *APC*), apoptozu (*DAPK*), detoksikaciju (*GSTP1*) (192). Epigenetičke promene predstavljaju rani događaj tokom maligne transformacije, ali je pokazano i da maligna progresija dovodi do akumulacije epigenetičkih promena. Hipermetilacija gena sa sledstvenom inaktivacijom funkcije tih gena javlja se i u karcinoma dojke. Geni koji se utišavaju na ovaj način u tkivu karcinoma dojke mogu se klasifikovati kao proapoptotski, geni inhibitori ćelijskog ciklusa i DNK reparacioni geni (191).

Hipermetilacioni status promotorskog regiona *BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena u ovom radu je određivan u tumorskom tkivu karcinoma dojke, obzirom da je metilacija tkivno i tumor specifična. Ovi geni su prepoznati kao geni važni za karcinogenezu i biloško ponašanje karcinoma dojke. Poređenje hipermetilacije promotora *BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena između grupe trostruko negativnog karcinoma dojke i grupe

ER+PR+, Her2- karcinoma dojke, pokazalo je da se ove dve grupe statistički značajno razlikuju samo u odnosu na učestalost hipermetilacije promotora *p16* gena – statistički značajno veći broj hipermetilacija promotora gena pronađen je u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke kao prognostički najlošijeg tipa karcinoma dojke u odnosu na ER+PR+Her2- tip karcinom dojke koji odlikuje najbolja prognoza. Pokazano je da tumor supresorni gen *p16* je hipermetilovan u kako u ćelijskim linijama tako i u karcinomu dojke (193).

Poređenje hipermetilacije promotora *BRCA1*, *p16*, *O⁶MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1* gena između grupe trostruko negativnog karcinoma dojke i grupe ER+PR+, Her2- karcinoma dojke, pokazalo je da se ove dve grupe statistički značajno razlikuju samo u odnosu na učestalost hipermetilacije promotora *p16* gena – statistički značajno veći broj hipermetilacija promotora gena pronađen je u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke kao prognostički najlošijeg tipa karcinoma dojke u odnosu na ER+PR+Her2- tip karcinom dojke koji odlikuje najbolja prognoza. Pokazano je da tumor supresorni gen *p16* je hipermetilovan u kako u ćelijskim linijama tako i u karcinomu dojke

Pošto su somatske mutacije *p16* retke kod sporadičnih karcinoma dojke (194), pretpostavlja se da je metilacija DNK glavni mehanizam za inaktivaciju *p16*. Visoka učestalost hipermetilacije *p16* promotora u intraduktalnom karcinom dojke ukazuje na to da *p16* metilacija igra značajnu ulogu u ranim fazama karcinogeneze karcinoma dojke (195). Veća učestalost *p16* hipermetilacije detektovana je kod uznapredovalih tumora, u poređenju sa ranim stadijumom karcinoma dojke i duktalnim karcinomom in situ (196). Meta-analiza je pokazala da je hipermetilacija promotora *p16* povezana sa povećanim rizikom od karcinoma dojke (197). Međutim, nedavna meta-analiza otkrila je nedostatak povezanosti između hipermetilacije promotora *p16* gena i preživljavanja (198).

Yamamoto je objavio metilaciju promotora *GSTP1*, *RASSF1A* i *RARB2* kao osetljiviji marker u ranom stadiju primarnog tumora karcinoma dojke u poređenju sa konvencionalnim markerima CEA i / ili CA15-3. Kombinacija konvencionalnih markera s panelom od tri epigenetička markera ima bolju osetljivost za otkrivanje metastatskog karcinoma dojke

(199). Shan je testirao metilaciju sa 6 gena (*SFN*, *hMLH1*, *HOXD13*, *PCDHGB7*, ***RASSF1*** i ***p16***) i oni su metilovani u serumu bolesnica sa karcinomom dojke (140). Liu je potvrdio da ***BRCA1*** gen nije značajno metilovan u serumu uzoraka karcinoma dojke; međutim, hipermetilacija *FHIT* bila je znatno viša u bolesnica sa karcinomom dojke u poređenju sa zdravim bolesnicama i onima sa benignim tumorima dojke (200). Metilovana DNK može se detektovati sa vrlo visokim stepenom specifičnosti čak i u prisustvu viška neimetilovane DNK. Otkrivena je metilacija aberantnog promotora *CDH1*, *GSTP1* i ***BRCA1*** sa visokim stepenom usklađenosti sa biopsijom tankom iglom (eng FNAB) primarnog tumora, ali nije uvek pokazivala bolju osetljivost i specifičnost u poređenju sa citološkim pregledom (201, 202). Atipične i maligne ćelije raka takođe se mogu naći u iscedku iz bradavice. Međutim, metilacija promotora takođe je otkrivena i kod zdravih žena i bilo je nemoguće razlikovati pre-invazivne i invazivne lezije (203, 204). Nekoliko studija kombinuje profil DNK metilacije sa analizom ekspresije gena kako bi se identifikovao molekularni kod koji bi bolje objasnio patološku i kliničku heterogenost karcinom dojke.

Nastanak karcinoma dojke i njegova progresija je višestruki korak koji je rezultat epigenetičkih i genetičkih promena (205). Među ključnim epigenetičkim mehanizmima je izmenjena ekspresija višestrukih gena usled metilacije CpG ostrvaca njihovih promotora i često kodirajućim regionima (194, 206, 207, 208). Pošto je poremećaj metilacije gena jedna od najranijih molekularnih promena koje se javljaju tokom kancirogeneze, tako rano otkrivanje poremećaja metilacije može biti strategija za rano otkrivanje raka. Nedavne studije sugerišu da je metilacioni profil kancera specifičan za vrstu tumora i etničku pripadnost (209, 210). Kod karcinoma dojke hipermetilacija promotora je zabeležena u više od 100 gena (211).

Dobijeni rezultati naše studije ukazuju da nema statističke značajnosti u učestalosti ***BRCA1*** hipermetilacije između ispitivanih grupa bolesnica, ali je uočen trend ka većem broju hipermetilacija promotora ***BRCA1*** gena u grupi bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke u poređenju sa ER + PR + Her2- gupom. I druge studije navode da se ***BRCA1*** hipermetilacija češće javlja kod trostruko negativnog karcinoma dojke, u poređenju

sa drugim sporadičnim karcinoma dojke (212). Meta-analiza otkrila je da je hipermetilacija **BRCA1** povezana sa lošim preživljavanjem kod bolesnica sa karcinomom dojke (213).

DNK metilacija promotora **BRCA1** gena se povezuje i sa osetljivošću trostruko negativnog karcinoma dojke na hemioterapiju (214). Oko 13-40% sporadičnih karcinoma dojke nosi hipermetilovani promotor **BRCA1** gena (214, 215, 216, 217). U podgrupi od 167 bolesnika sa trostruko negativnim karcinomom dojke koji su primali adjuvantnu hemioterapiju, **BRCA1** metilacija je bila nezavistan povoljan prediktor toka bolesti u odnosu na 10-to godišnje preživljavanje. Nasuprot tome, kod 675 bolesnika sa ne-trostruko negativnim karcinomom dojke koji su primali adjuvantnu hemioterapiju, metilacija **BRCA1** je bila prediktor lošeg preživljavanja u univarijantnoj analizi (217).

Tako metilacija **BRCA1** može predstavljati korisni biomarker osetljivosti na hemioterapiju kod trostruko negativnog karcinoma dojke. Predkliničke studije i klinička ispitivanja karcinoma dojke i jajnika pokazali su da je poli (adenozin difosfat) -riboze polimeraza (PARP) efikasna kod bolesnica sa **BRCA1**- i **BRCA2** mutacijama (218, 219).

Budući da **BRCA1** hipermetilovani tumori pokazuju isti molekularni fenotip kao **BRCA** mutirani kanceri (**BRCAness**) (220) predloženo je da bi hipermetilacija **BRCA1** mogla predvideti odgovor na PARP inhibitore. U in vitro studiji, **BRCA1** hipermetilacija pokazala je isti stepen osetljivosti na tri PARP inhibitora kao i **BRCA1** mutacija (221). Međutim, još nema kliničkih podataka koji trenutno podržavaju ulogu metilaciju promotora u odgovoru na PARP1 inhibitore u **wtBRCA1** grupi bolesnica sa karcinomom dojke.

Pokazano je da je kod karcinoma dojke veliki broj tumor supresornih gena utišan mehanizmom hipermetilacije promotora gena što ukazuje da je aberantna metilacija značajan faktor u patogenezi karcinoma dojke. Takođe, poznato je da karcinomom dojke najčešće progredira od manje agresivnog, hormon zavisnog do visoko invazivnog hormon nezavisnog fenotipa što ukazuje na utišavanje hormon zavisnih tumor supresornih gena tokom progresije karcinoma dojke (222). Bolesnice kod kojih je verifikovan karcinom dojke sa trostruko-negativnim receptorskim statusom imaju formu koja je veoma agresivna i po pravilu slabo

reaguje na različite terapije. Kako je ER gen često metilovan kod karcinoma dojke (223), određivanje metilacije ovog gena moglo bi da ukaže na epigenetičko utišavanje ovog gena i na potencijalno loš odgovor na hormonsku terapiju. Pored toga, efikasnost terapije Tamoksifenom kod bolesnika sa karcinomom dojke može se pratiti određivanjem metilacije **RASSF1A** u cirkulaciji, a povišeni nivo metilacije ovog gena ukazuje da bolesnica ne reaguje na terapiju (224). Hipermetilacija promotora gena **RASSF1A** kao rani epigenetički događaj u karcinoma dojke predstavlja pokazatelj zloćudnog potencijala (225).

U ovom radu nije postojala statistički značajna razlika između učestalosti hipermetilacije promotora **RASSF1A** gena između grupe bolesnica trostruko negativnog karcinoma dojke i ER + PR + Her2- grupe. Hipermetilacija **RASSF1A** gena je jedna od najranijih epigenetičkih promena u karcinomu dojke i otkrivena je kod više od 60% primarnih karcinoma dojke (226). **RASSF1A** aberantna metilacija potencijalno može biti vredan marker za razdvajanje malignih i nemalignih lezija tkiva dojke. Metilacija promotora **RASSF1A** gena je potencijalno koristan biomarker za predviđanje prognoze kod karcinoma dojke (227). Nivo metilacije **RASSF1A** gena je viši u uznapredovaloj fazi u poređenju sa ranim stadijumom karcinoma dojke (196).

Poređenje parametara tumora sa učestalošću metilacija ispitivanih gena kako u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke, tako i u ER+PR+Her2- grupi, pokazalo je da se u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke statistički značajno veća učestalost hipermetilacije **CDH-1** gena vezuje za bolesnice sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima. Ćelijski adhezivni molekul E-kadherin (**E-cad**), kodiran od strane **CDH-1** gena se označava i kao supresor metastaza. Glavni vid inaktivacije **CDH-1** gena je upravo hipermetilacija. Demetilacija i reekspresija E-kadherina neophodna je za epitelijalno-mezenhimsku tranziciju i za umetanje metastatskih ćelija u novo ćelijsko okruženje (129).

Aberantna **CDH-1** metilacija se javlja sa visokom učestalošću kod karcinoma dojke. Iako nije statistički značajan, u podgrupi slučajeva ovaj nalaz je povezan sa niskim nivoima ekspresije drugih gena (ER i PR) verovatno zbog poremećaja mehanizma održavanja DNK metilacije u tumorskim ćelijama. Korelacija između **CDH-1** hipermetilacije i smanjene

ekspresije estrogenskog receptora je indirektni dokaz koji povezuje funkciju receptora estrogena, transkripcionu represiju i ekspresiju E-kadherina kod karcinoma dojke. Dinamička priroda epigenetičke regulacije, uključujući promene u obrascima metilacije DNK, u ekspresiji i / ili funkciji trans-delujućih faktora i efekata posredovanih hromatinom, mogla bi objasniti nedostatak uniformnosti u hipermetilaciji *CDH-1* i gubitku ekspresije E-kadherina koji je primećen na imunohistohemijskom nivou (228).

Dobijeni rezultati našeg ispitivanja su takođe pokazali da je u grupi bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke značajno veća učestalost hipermetilovanog promotora *O⁶MGMT* gena nađena u podgrupi bolesnica bez lokalnog recidiva u odnosu na bolesnice sa lokalnim recidivom. Gen za O⁶-metilguanin-DNK-metiltransferazu *O⁶MGMT*, koji uklanja alkilirajuća oštećenja guanozina i čijim utišavanjem hipermetilacijom se akumuliraju G→A mutacije (123). Takođe je metilovan kod primarnih karcinoma dojke. Meta-analiza iz 2017. godine je ukazala na to da metilacija promotora *MGMT* gena može biti rani biomarker za uspostavljanje dijagnoze karcinoma dojke. Hipermetilacija *MGMT* može biti i faktor predviđanja dobrog odgovora na alkilirajuće agense (229, 230, 231), pa se u tom smislu možda mogu tumačiti i dobijeni rezultati, obzirom da je većina bolesnica u našoj grupi trostruko negativnog karcinoma dojke (52/61) primala adjuvantnu hemioterapiju u koju su bili uključeni i alkilirajući agensi (ciklofosamid i 5-fluorouracil).

U istoj grupi bolesnica pokazano je da je manja učestalost hipermetilovanog *O⁶MGMT* gena nađena kod bolesnica sa metastazama na kostima u odnosu na bolesnice bez metastatske bolesti na kostima. Značaj ovakvog nalaza možda leži u činjenici što se metastaze na kostima povezuju sa estrogen zavisnim karcinomom dojke, dok se ovde radi o eventualnoj posebnoj podgrupi bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke. Isto tako, učestalija hipermetilacija *O⁶MGMT* se povezuje sa boljim odgovorom na hemioterapiju alkilirajućim agensima što može biti od značaja, kao što je već rečeno, za ispitivanu grupu bolesnica koja je primala adjuvantnu hemioterapiju. Dalja istraživanja su neophodna da bi se utvrdilo da li hipermetilacija *MGMT* gena utiče na biološko ponašanje trostruko negativnog karcinoma dojke u odnosu na preferencijale ka metastaziranju.

Analiza metilacije u velikoj studiji sa trostruko negativnim karcinomom dojke bila je u stanju da razdvoji populaciju u grupe visokog, srednjeg i niskog rizika i da identifikuje 17 različito metilovanih regiona značajno povezanih sa preživljavanjem bolesnica (232). Takođe, metilacija *PITKS2* promotora gena takođe je bila povezana sa lošom prognozom bolesnica sa pozitivnim limfnim nodusima, ER pozitivnim, HER2- bolesnicama karcinoma dojke tretiranih adjuvantnom hemioterapijom na bazi antraciklina (233).

Zatim su u našem radu analizirane ko-metilacije različitih gena sa ciljem da se utvrdi da li je moguće definisati kombinacije aberantno metilovanih gena, koji mogu da se povežu sa prognozom bolesti u ispitivanim grupama. Poređenje učestalosti ko-metilovanih/nemetilovanih *p16* i *BRCA1*, kao i *p16*, *BRCA1* i *RASSF1A* promotora gena među bolesnicama sa trostruko negativnim karcinomom dojke i ER+PR+Her2- karakteristikama, pokazalo je da postoji statistički značajno veća učestalost hipermetilovanih gena u grupi trostruko negativnim karcinomom dojke u odnosu na ER+PR+Her2- grupu. Dobijeni rezultati ukazuju na to da aberantna metilacija gena inhibitora ćelijskog ciklusa (*p16*, *RASSF1A*) i gena za popravku DNK (*BRCA1*) može uticati na biološko ponašanje trostruko negativnog karcinoma dojke. Ko-metilacija tri gena ukazuje na moguće prisustvo BRCAness fenotipa kod bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke (234).

Zatim smo se fokusirali na mogući uticaj metilacionog statusa ispitivanih gena na klinički tok bolesti bolesnica u ispitivanim grupama, sa ciljem da utvrdimo da li hipermetilacija analiziranih gena doprinosi lošijoj prognozi bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke. Upoređivali smo DFS i OS između trostruko negativnog karcinoma dojke i ER+PR+Her2- grupe sa ko-metilacijom *p16* i *RASSF1A* gena (*p16*+ *RASSF1A*+). Potvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u DFS-u između trostruko negativnog karcinoma dojke i ER+PR+Her2- grupe bolesnica; kraći DFS je uočen u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke. Ispitali smo da li se u okviru same grupe trostruko negativnog karcinoma dojke može uspostaviti značajna razlika u DFS-u između *p16*+ *RASSF1A*+ i *p16*-*RASSF1A*- podgrupe bolesnica. Razlika koja je uočena, nije statistički značajna. Međutim,

dobijeni rezultati ukazuju da bi ko-metilacija *p16* i *RASSF1A* mogla biti dodatni faktor koji može poslužiti za subgrupisanje trostruko negativnog karcinoma dojke.

U okviru ovog rada ispitivali smo i eventualnu povezanost odgovora na adjuvantnu hemioterapiju i metilacionog statusa ispitivanih gena u grupi bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke da bismo utvrdili da li u postojećoj grupi metilacioni status ispitivanih gena može da posluži kao eventualni pokazatelj odgovora na terapiju. U ovim analizama ispitivali smo pojavu ponovnog javljanja bolesti (relapsa) nakon adjuvantne hemioterapije u odnosu na metilacioni status *p16*, *RASSF1A* i *O⁶MGMT* gena. Fokusirali smo se na metilacioni status datih gena zbog toga što je ko-metilacioni status *p16* i *RASSF1A* gena pokazao povezanost sa kliničkim tokom bolesti između trostruko negativnog karcinoma dojke i ER+PR+Her2- grupe bolesnica, dok smo metilaciju *O⁶MGMT* gena analizirali u svetlu mogućeg odgovora na adjuvantnu hemioterapiju u koju su bili uključeni alkilirajući agensi. Rezultati su pokazali da nije moguće uspostaviti statistički značajnu povezanost između relapsa bolesti nakon adjuvantne hemioterapije i hipermetilacije promotora ispitivanih gena.

Može se reći da dobijeni rezultati ukazuju na to da obrasci DNK metilacije različitih tumor-asociranih gena mogu u budućnosti predstavljati neinvazivni marker za pojavu i razvoj maligne bolesti. Ko-metilacija *p16* i *RASSF1A* gena inhibitora ćelijskog ciklusa, mogla bi se razmatrati kao marker loše prognoze kod bolesnica sa karcinomom dojke. Hipermetilacija ovih gena mogla bi uticati na klinički tok bolesti izdvojivši iz grupe trostruko negativnog karcinoma dojke podgrupu bolesnica sa još agresivnijim fenotipom.

Sa druge strane, metilacija DNK može da otvori nove terapijske mogućnosti u ovoj veoma agresivnoj formi karcinoma dojke.

6. ZAKLJUČCI

- Određivanje hipermetilacionog statusa ispitivanih gena (*BRCA1*, *p16*, *O6MGMT*, *RASSF1* i *CDH-1*) u grupi trostruko negativnih bolesnica i kontrolnoj grupi bolesnica (ER+PR+Her2-) pokazalo je da se ispitivane grupe statistički značajno razlikuju samo u odnosu na veću učestalost hipermetilacije p16 gena.
- Ispitivanje klasičnih faktora prognoze obolelih od trostruko negativnog karcinoma dojke sa učestalošću hipermetilacije ispitivanih gena pokazalo je statistički značajno veću učestalost hipermetilacije *CDH-1* gena kod bolesnica sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima. Druge korelacije nije bilo moguće uspostaviti.
- Upoređivanje dobijenih rezulta metilacionog statusa sa parametrima kliničkog toka bolesti (učestalost relapsa, DFS i OS) pokazalo je da postoji veća učestalost kometilovanih p16 i RASSF1A (p16+ RASSF1A+) gena u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke u odnosu na Er+Pr+Her2- grupu.
- Potvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u DFS-u između trostruko negativnog karcinoma dojke i ER+PR+Her2- grupe bolesnica sa p16+ RASSF1A+, kraći DFS je uočen u grupi trostruko negativnog karcinoma dojke.
- Nije pokazana značajna povezanost hipermetilacije ispitivanih gena (*p16*, *O6MGMT*, *RASSF1*) sa odgovorom na adjuvantnu hemioterapiju merenu učestalošću relapsa bolesti u grupi bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke.
- Rezultati ovog rada ukazuju na to da hipermetilacija promotora *p16* i *RASSF1A* gena može biti marker loše prognoze u karcinomu dojke. Hipermetilacija ovih gena možda može uticati na klinički tok bolesti izdvajajući posebnu podgrupu bolesnica sa trostruko-negativnim karcinomom dojke sa još agresivnijim fenotipom.
- Dobijeni rezultati ukazuju na to da obrasci DNK metilacije različitih tumor-asociranih gena mogu u budućnosti predstavljati neinvazivni marker za pojavu i razvoj maligne bolesti.

7. LITERATURA

1. Ferlay J, Bray F, Pisane P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. *J Clin Oncol*, 2006; 24:2137–50.
2. Sasieni PD, Shelton J, Ormiston-Smith N, Thomson CS, Silcocks PB. What is the lifetime risk of developing cancer?: the effect of adjusting for multiple primaries. *Br J Cancer* 2011; 105: 460-5.
3. Siegal R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10-29.
4. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:69–90.
5. Pekmezović T. Epidemiologija raka dojke. U: Milašinović G, urednik. Vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2013.s.5-7.
6. Broeders M, Moss S, Nystrom L, Njor S, Jonsson H, Paap E, et al. The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies. *J Med Screen* 2012; 19 (Suppl. 1): 14-25.
7. Official Gazette of Republic of Serbia, “Regulation on the National program for early detection of breast cancer,” 073/2013 (in Serbian)
8. Incidenca i mortalitet raka dojke u centralnoj Srbiji 2011. Registar za rak u centralnoj Srbiji. Dostupno na veb adresi: http://batut.org.rs/download/publikacije/rakUCentralnoj_Srbiji.2011.pdf. Ažurirano 24.1.2014
9. Gillibert-Duplantier J, Duthey B, Sisirak V, Salaün D, Gargi T, Trédan O, Finetti P, Bertucci F, Birnbaum D, Bendriss-Vermare N, Badache A. Gene expression profiling identifies sST2 as an effector of ErbB2-driven breast carcinoma cell motility, associated with metastasis. *Oncogene*. 2012; 31(30): p. 3516-24.
10. Jovićević-Bekić A. Epidemiologija i prevencija raka dojke. In: Nešković-Konstantinović Z, Borojević N, Vučković-Dekić Lj editors. *Novine u dijagnostici i terapiji karcinoma dojke*. Beograd: Akademija medicinskih nauka SLD i Institut za onkologiju i radiologiju Srbije; 2008; Serija B, vol 2(1):p 11-24. ISBN 978-86-85313-84-4.
11. Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9: 321-45.
12. Li CI, Malone KE, Porter PL, Daling JR. Epidemiologic and molecular risk factors for contralateral breast cancer among young women. *Br J Cancer* 2003; 89: 513’8.
13. Worsham MJ, Raju U, Lu M, Kapke A, Bottrell A, Cheng J, Shah V, Savera A, Wolman SR. Risk factors for breast cancer from benign breast disease in a diverse population. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 118: 1-7.
14. Cuneo KC, Dash RC, Wilke LG, Horton JK, Koontz BF. Risk of invasive breast cancer and ductal carcinoma in situ in women with atypical papillary lesions of the breast. *Breast J* 2012; 18: 475-8.

15. Oran B, Celik I, Erman M, Baltali E, Zengin N, Demirkazik F, Tezcan S. Analysis of menstrual, reproductive and life-style factors for breast cancer risk in Turkish women: a case-control study. *Med Oncol* 2004; 21: 31-40.
16. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol* 2012; 13: 1141-51.
17. Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M, Lane DS, Aragaki AK, Kuller LH, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA* 2010; 304: 1684-92.
18. Anderson GL, Neuhouser ML. Obesity and the risk for premenopausal and postmenopausal breast cancer. *Cancer Prev Res(Phila)* 2012; 5: 515-21.
19. Carmichael A, Sami AS, Dixon JM. Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionizing radiation. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 475-9.
20. Woolcott CG, Koga K, Conroy SM, Byrne C, Nagata C, Ursin G, Vachon CM, Yaffe MJ, Pagano I, Maskarinec G. Mammographic density, parity and age at first birth, and risk of breast cancer: an analysis of four case-control studies. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: 1163-71.
21. Baan R, Straif K, Grosse y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol* 2007; 8: 292-3.
22. Coronado GD, Beasley J, Livaudais J. Alcohol consumption and risk of breast cancer. *Salud Publica Mex* 2011; 53: 440-7.
23. Lof M, Weiderpass E. Impact of diet on breast cancer risk. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21: 80-5.
24. Kruk J. Lifetime physical activity and the risk of breast cancer: a case-control study. *Cancer Detect Prev* 2007; 31: 18-28.
25. Džodić R. Rak dojke (učestalost, faktori rizika, prevencija). U: Džodić R. Hirurgija raka dojke. 29-35, Beograd: Dosije 2005; ISBN-7738-020-5.
26. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju Vodiča dobre kliničke prakse. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke, Beograd 2012, ISBN 978-86-6235-016-9.
27. Džodić R. dijagnostika raka dojke. U: Džodić R. Hirurgija raka dojke. 61-77, Beograd: Dosije 2005; ISBN-7738-020-5.
28. Marković I. TNM klinička klasifikacija. U: Milašinović G, urednik. Vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2013.s.58-65.
29. Ly A, Lester SC, Dillon D. Prognostic Factors for Patients with Breast Cancer: Traditional and New. *Surg Pathol Clin.* 2012; 5(3): p. 775-85.
30. Cardoso F, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Senkus E, Thompson A, et al. Primary Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol.* 2013;24(Suppl 6): vi7-vi23.
31. Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *Br J Cancer* 1996;74(11):1796-800.

32. Schnitt S. Traditional and newer pathologic factors. *J Natl Cancer Inst.* 2001;30:22-26.
33. J.L. Mansi, U. Berger, D. Easton, T. McDonnell, W.H. Redding, J.C. Gazet, A. McKinna, T.J. Powles and R.C. Coombes, Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases, *Br Med J (Clin Res Ed)* 295 (1987), 1093– 1096.
34. Tot T, Tabar L, Dean P. *Practical Breast Pathology*. 1st ed. Thieme: Medical Publishers; 2002.
35. Šamija M, Vrdoljak E, Krajina Z. Rak dojke. U: Šamija M, urednik. *Klinička onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.s.291-304.
36. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles & Practice of Oncology [CD-ROM]*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
37. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989;63(1):181–7.
38. Andea A, Bouwman D, Wallis T, Visscher W. Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer*. 2004;100:20-7.
39. Karak SG, Quatrano N, Buckley J, Ricci A Jr. Prevalence and significance of perineural invasion in invasive breast carcinoma. *Conn Med*. 2010; 74(1): p. 17-21.
40. Shen SD, Zhong SZ, Wang CZ, Huang WH. Correlation of lymphovascular invasion with clinicopathological factors in invasive breast cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(10): p. 17789-95.
41. Tavassoli FA, Devilee P. *World health organisation classification of tumors. Tumors of the breast and female genital organs*. France: IARC Press; 2003.
42. Elston CW, Ellis IO, Goulding H. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. In: Elston CW, Ellis IO, editors. *The Breast*. London:Churchill Livingstone; 1998.p.385-433.
43. Čović D, Milas I, Vukas D, Čakalo I. Tumori dojke. U: Šamija M, urednik. *Klinička onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.s.316-326.
44. Stenkvist B, Bengtsson E, Eriksson O, Jarkrans T, Nordin B, Westman-Naeser S. Histopathological systems of breast cancer classification: reproducibility and clinical significance. *J Clin Pathol* 1983;36(4):392-8.
45. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* 1975;55(2):231-73.
46. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19(5):403-1.
47. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Richardson AL, Schnitt SJ, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Badve S, Ellis IO. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(4): p. 207.
48. D'Eredita G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients

- with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer* 2001; 37:591-6.
49. Radan Džodić, Zora Nešković Konstantinović, Branimir Gudurić. *Rak dojke*. Izdavač: Zavod za udžbenike, Beograd.2014.142
 50. Zhang ZQ, Han YZ, Nian Q, Chen G, Cui SQ, Wang XY. Tumor invasiveness, not lymphangiogenesis, is correlated with lymph node metastasis and unfavorable prognosis in young breast cancer patients (≤ 35 Years). *PLoS One*. 2015; 10(12): 1-15.
 51. Goldhirsch A, Glick H, Gelber D, Coates S, Senn J. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19:3817-27.
 52. Rosai J. Ackerman's surgical pathology. In: Rosai J, ed. *Breast*. St.Louis: Mosby-Year Book, Inc; 1996.p.1621-1622.
 53. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Miller KD. Frequency of estrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7,016 breast carcinoma: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value and mammographic screening. *J Clin Pathol* 2000a; 53: 688-696.
 54. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow IG, Miller KD. Reliability of immunohistochemical demonstration of estrogen receptors in routine practice: inter-laboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring system. *J Clin Pathol* 2000b; 53:125-130.
 55. Leake R, Barnes D, Pinder S, Ellis I, Anderson AT, Adamson R, Rhodes T, Miller K, Walker R. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. *J Clin Pathol* 2000; 53:634-635.
 56. Pichon MF, Pallud C, Brunet M, Milgrom E. Relationship of presence of progesterone receptors to prognosis in early breast cancer. *Cancer Res* 1980;40(9):3357-60.
 57. Goldhirsch A. *Breast Cancer*. Cavalli F, Hansen H, Kaye S, editors. Textbook of Medical Oncology. London: Martin Dunitz; 2001.p.53-86.
 58. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;367(19):1783-91.
 59. Ros S, Fletcher A, Linette P, Stec J, Clarc E, Ayers M, et al. The HER-2/neu Gene and 131 Protein in Breast Cancer: Biomarker and Target of Therapy. *The Oncologist*. 2003;8:307-25.
 60. Perez-Soler R. HER1/EGFR targeting: refining the strategy. *The Oncologist*. 2004;9:58-67.
 61. HER2 Testing - the CISH methodology: a comprehensive guide for CISH; F.Hoffman-La Roche Ltd 2005.
 62. Salomon D, Clarc M, Wong G, Levin J, Ullrich A, McGuire L. Human breast cancer: correlation of relaps and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.
 63. Prati R, Apple S K, He J, Gornbei J A, Chanh H R. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. *Breast J*. 2005;11(6):433-9.

64. Winer E, Piccart-Gebhart M, Rugo H, et al. Management of HER2-positive breast cancer. In: ASCO Educational Book 2006; 3-14.
65. Assersohn LA, Salter J, Powles TJ, A'hern R, Makris A, Gregory RK et al. Studies of potential utilization of Ki-67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 82:113-23.
66. Sato K, Miyashita M, Ishida T, et al. Prognostic significance of the progesterone receptor status in Ki-67-high and -low Luminal B-like HER2-negative breast cancers. *Breast Cancer.* 2014.
67. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(2):539-52.
68. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin P, Hayes M, Gelmon K. Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010; 11:174–83.
69. Restogi R, Anderson SJ, Bear HD et al. Preoperative chemotherapy: updates of national surgical adjuvant breast and bowel project protocols B18 and B27. *J Clin Oncol* 2008; 26: 778-85.
70. Mazouni C, Peintinger F, Wan-Kau S et al. Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome. *J Clin Oncol* 2007; 25(19):2650-55.
71. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU et al. Definition and impact of pathological complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy alone, in various intrinsic breast subtypes. *J Clin Oncol* 2012; 30(15):1796-804.
72. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. Published online February 14, 2014. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62422-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62422-8).
73. Sarode VR, Han JS, Morris DH, Peng Y, Rao R. A comparative analysis of biomarker expression and molecular subtypes of pure ductal carcinoma in situ and invasive breast carcinoma by image analysis: relationship of the subtypes with histologic grade, Ki67, p53 overexpression, and DNA ploidy. *Intern J Breast Can* 2011; 2011:1-7.
74. Ohri SS, Vashishta A, Proctor M, Fusek M, Vetvicka V. The propeptide of cathepsin D increases proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells. *Int J Oncol* 2008;32(2):491-8.
75. Witzel I, Milde-Langosch K, Schmidt M, Karn T, Becker S, Wirtz R, et al. Role of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor mRNA expression as prognostic factors in molecular subtypes of breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2014;7:2205–13.
76. Mansour JC et al. Molecular mechanism for individualized cancer care. *J Am Coll Surg* 2008; 207:250.
77. Goldhirsch A, Wood CW, Coates SA, Gelber DR, Thurlimann B, Senn H-J. & Panel members. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer:

- highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Anal of Oncology* 2011; 22:1736-1747.
78. Verma S, Bal A, Joshi K, Arora S, Singh L. Immunohistochemical characterization of molecular subtypes of invasive breast cancer: a study from North India. *APMIS*. 2012;120:1008-1019.
 79. Geyer FC, Rodrigues DN, Weigelt B, Reis-Filho JS. Molecular classification of estrogen receptor-positive/Luminal breast cancers. *Adv Anat Pathol* 2012; 19:39–53.
 80. N. Bentzon, M. Düring, B. B. Rasmussen, H. Mouridsen, and N. Kroman, “Prognostic effect of estrogen receptor status across age in primary breast cancer,” *Int. J. Cancer*, vol. 122, no. 5, pp. 1089–1094, Oct. 2007.
 81. Lund MJ, Trivers KF, Porter PL, Coates RJ, Leyland-Jones B, Brawley OW, Flagg EW, O'Regan RM, Gabram SG, Eley JW. Race and triple negative threats to breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 113:357-70.
 82. Carey L, E. Winer, G. Viale, D. Cameron, and L. Gianni, “Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience?,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 7, no. 12, pp. 683–692, Dec. 2010.
 83. Keam B, Im S-A, Kim H-J, Oh D-Y, Kim JH, Lee S-H et al. Prognostic impact of clinicopathologic parameters in stage II/III breast cancer treated with neoadjuvant 157 docetaxel and doxorubicin chemotherapy: paradoxical features of the triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007; 7:203.
 84. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of the basal-like breast cancer phenotype. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 2329-34.
 85. A. Jitariu, A. M. Cîmpean, and D. Ribatti, “Triple negative breast cancer : the kiss of death,” 2017.
 86. Puztai L. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11:S11.
 87. Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21: 163-167.
 88. Bae YK, Brown A, Garrett E, Bornman D, Fackler MJ, et al. (2004) Hyper methylation in histologically distinct classes of breast cancer. *Clin Cancer Res* 10: 5998-6005.
 89. Behera P. Epigenetics Changes in Breast Cancer: Current Aspects in India. *J Bioengineer & Biomedical Sci* 2017, 7:2 DOI: 10.4172/2155-9538.1000223
 90. Jin B, Li Y, Robertson KD (2001) DNA methylation superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes and Cancer* 2: 607-617.
 91. Polyak K, Haviv I, Campbell IG (2009) Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends in Genetics* 25: 30-38.
 92. Szyf M (2012) DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis. *Genome Medicine* 4: 26.
 93. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002;21:5400-13.
 94. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
 95. Bock C. Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nat Rev Genet* 2012;13:705-19.

96. Šupić G, Magić Z. , Epigenetika kancera: Mehanizmi i klinička primena (2014).
97. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 2011;25:1010-22.
98. Herman J, Baylin S. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Eng J Med.* 349, 2042-2054, 2003.
99. Tollesbol T. (Ed.) *Cancer epigenetics.* CRC Press, 2009.
100. Wai Yin Cheuk I, Yvonne Shin V, Kwong A. Detection of Methylated Circulating DNA as Noninvasive Biomarkers for Breast Cancer Diagnosis. *J Breast Cancer* 2017 March; 20(1): 12-19
101. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-6.
102. Illingworth R. et al. (2008) A novel CpG island set identifies tissuespecific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol.*, 6, e22.
103. Feinberg A.P. et al. (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301, 89–92.
104. Jones P.A. et al. (2007) The epigenomics of cancer. *Cell*, 128, 683–692.
105. Dworkin AM, T. H.-M. Huang, and A. E. Toland, “Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment.,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 19, no. 3, pp. 165–71, Jun. 2009
106. Feinberg AP, Koldobskiy MA, Göndör A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat Rev Genet* 2016;17:284-99.
107. Feinberg, A.P. et al. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat. Rev. Genet.*; 2006: 7, 21–33.
108. Petrucelli N, Daly M, Feldman G. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genetics in Medicine.* 2010;12:245–259
109. Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risk for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of literature. *J Clin Oncol* 2004; 22(4): 735-742.
110. Metcalfe K, Lznch HT, Ghadirian P, et al. Contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol* 2004; 22(12): 2328-2335.
111. Couch FJ, DeShano M, Blackwood A, Calzone Kathleen, Stopfer J, Campeau L, Ganguly A, Rebbeck T, Weber BL. BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1997; 336: 1409-1415.
112. Palcios J, Robles-Frias MJ, Castilla MA, Lopez-Garcia MA, Benitez J. The molecular pathology of hereditary breast cancer. *Pathobiology* 2008;75:85-94.
113. Walker RA, Bartlett MS, Dowsett M, et al. HER2 testing in the UK: further update to recommendations. *J Clin Pathol* 2008; 61: 818-824.
114. Greenblatt MS, Chappuis PO, Bond JP, Hamel N, Foulkes WD. TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA 1 or BRCA 2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. *Cancer Res* 2001; 61:4092-4097.
115. Branković-Magić M, Janković R, Radulović S. Nasledni karcinom dojke: uloga BRCA gena. U: *Novine u dijagnostici i terapiji karcinoma dojke. Monografije naučnih skupova AMN SLD, Serija B, Vol. 2, Broj 1, 53-64, 2008.*

116. Lips E.H. et al., "Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers," *Br. J. Cancer*, vol. 108, no. 10, pp. 2172–2177, May 2013.
117. Chalasani P, Livingston R. Differential Chemotherapeutic sensitivity for breast tumors with »BRCAness«. *Oncologist*. 2013;18(8):909-16
118. Birgisdottir V. et al. Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res* 8, R38 (2006)
119. Stefansson O. A. et al. BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer. *Epigenetics* 7, 1225–9 (2012)
120. Zhu W, Qin W, Hewett JE, Sauter RE. Quantitative evaluation of DNA hypermethylation in malignant and benign breast tissue and fluids. *Int J Cancer* 2010, 126: 474-82.
121. Klajic J, Busato F, Edvardsen H, Touleimat N, Fleischer T, Bukholm IR, Borresen-Dale AL, Lonning PE, Tost J, Kristensen VN. DNA methylation status of key regulators such as CDKN2A/p16 and CCNA1 correlates with treatment response to doxorubicin and 5-fluorouracil in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014, pii: 0297.2014.
122. Munot K, Bell SM, Lane S, Horgan K, Hanby AM, Speirs V. Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer *Hum Pathol* 2006;37:989–99.
123. Herranz M, Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor genes in human cancer: concepts, methodologies and uses, in *DNA Methylation and Cancer Therapy*, edited by Szyf M, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005.
124. Shen D, Liu T, Lin Q, Lu X, Wang Q, Lin F, Mao W. MGMT promoter methylation correlates with an overall survival benefit in Chinese high-grade glioblastoma patients treated with radiotherapy and alkylating agent-based chemotherapy: A single-institution study. *Plos One*. 2014; 9:e107558.
125. Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the Ras association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 2005;65(9):3497-508
126. Xiang T-X, Yuan Y, Li L-L, Wang Z-H, Dan L-Y, Chen Y, Ren G-S, Tao Q. Aberrant CpG methylation and its translational applications in breast cancer. *Chin J Cancer*, 2013;32(1): 13-20.
127. Hagrass HA, Pasha HF, Shaheen MA, Abdel Bary EH, Kassem R (2014) Methylation status and protein expression of RASSF1A in breast cancer patients. *Rev Cancer* 2:210–219
128. Spitzwieser M, E. Holzweber, G. Pfeiler, S. Hacker, and M. Cichna-Markl, "Applicability of HIN-1, MGMT and RASSF1A promoter methylation as biomarkers for detecting field cancerization in breast cancer.," *Breast Cancer Res.*, vol. 17, no. 1, p. 125, Sep. 2015.
129. Dikshit R, Gillio-Tos A, Brennan P, De Marco L, Fiano V, Martinez-Peñuela JM, Boffetta P, Merletti F. Hypermethylation, risk factors, clinical characteristics, and survival in 235 patients with laryngeal and hypopharyngeal cancers *Cancer* 110:1745 – 1751, 2007

130. Herman JG, Jeremy RG, Myohanen S, Nelkin BD and Baylin BS. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands (DNA methylation/tumor suppressor genes/pl6/p15). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 93, pp. 9821-9826, September 1996. Medical Sciences
131. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG and Belinsky SA. Predicting Lung Cancer by Detecting Aberrant Promoter Methylation in Sputum1 [CANCER RESEARCH 60, 5954–5958, November 1, 2000]
132. Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, Lothe RA, Baylin SB, Aaltonen LA and James G Herman JG. Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene* (2000) 19, 164 ± 168
133. Organization, W.H, World Cancer Report 2014, C. P. Wild and B. W. Stewart, Eds., 2014, <http://publications.iarc.fr/> Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014.
134. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61–70.
135. Ellis MJ, Perou CM. The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap. *Can Discov*. 2013;3(1):27–34.
136. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869–74.
137. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
138. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*. 2010;220(2):263–80.
139. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011;5(1):5–23.
140. Shan M, Yin H, Li J. et al., “Detection of aberrant methylation of a six-gene panel in serum DNA for diagnosis of breast cancer,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 14, pp. 18485–18494, 2016.
141. Duffy MJ. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin Chem* 2006;52:345-51.
142. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287-312.
143. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:210-9.
144. Lieske B, Ravichandran D, Wright D. Role of fine-needle aspiration cytology and core biopsy in the preoperative diagnosis of screen-detected breast carcinoma. *Br J Cancer* 2006;95:62-6.
145. Eccles SA, Aboagye EO, Ali S, Anderson AS, Armes J, Berditchevski F, et al. Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2013;15: R92.

146. Zhang C, Wang S, Israel HP, Yan SX, Horowitz DP, Crockford S, et al. Higher locoregional recurrence rate for triplenegative breast cancer following neoadjuvant chemotherapy, surgery and radiotherapy. *Springerplus*. 2015;30:4:386.
147. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol Off Am Soc Clin Oncol*. 2009;27(8):1160–7.
148. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009;360(8):790–800.
149. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206–23.
150. World Health Organization. *Women and health: today's evidence tomorrow's agenda*. 2009.
151. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol*. 2012;23 (suppl 6:vi7- vi12).
152. Spitale A, Mazzola P, Soldini D, et al. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol* 2009;20:628–35.
153. Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012;486:346–52.
154. Eralp Y, Derin D, Ozluk Y, et al. MAPK overexpression is associated with anthracycline resistance and increased risk for recurrence in patients with triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 2008;19:669–74.
155. Ivanov O, Chen F, Wiley EL, et al. alphaB-crystallin is a novel predictor of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;111:411–7.
156. Wysocki PJ, Korski K, Lamperska K, et al. Primary resistance to docetaxel-based chemotherapy in metastatic breast cancer patients correlates with a high frequency of BRCA1 mutations. *Med Sci Monit* 2008;14:1079–10.
157. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, et al. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the surveillance, epidemiology, and end results database. *Breast Cancer Res Treat* 2002;76:27–36.
158. Muguti GI. Experience with breast cancer in Zimbabwe. *J R Coll Surg Edinb* 1993;38:75–8.
159. Yin WJ, Lu JS, Di GH, et al. Clinicopathological features of the triple-negative tumors in Chinese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115:325–33.
160. Honorio M, Guerra Pereira N. Decreased survival in African patients with triple negative breast cancer. *J Palliat Care Med* 2016;06:2.
161. Irvin WJ Jr and Carey LA. What is triplenegative breast cancer? *Eur J Cancer* 2008; 44:2799–2805.

162. Bae SY, Lee SK, Koo MY, et al. The prognoses of metaplastic breast cancer patients compared to those of triple-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126: 471–478.
163. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology* 2006; 49: 10–21.
164. Honma N, Saji S, Kurabayashi R, et al. Oestrogen receptor-beta1 but not oestrogen receptor-beta2 is of prognostic value in apocrine carcinoma of the breast. *APMIS* 2008; 116: 923–930.
165. Constantinidou A, Jones RL and Reis-Filho JS. Beyond triple-negative breast cancer: the need to define new subtypes. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10: 1197–1213.
166. Jung SY, Kim HY, Nam BH, et al. Worse prognosis of metaplastic breast cancer patients than other patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120: 627–637.
167. Collett K, Stefansson IM, Eide J, et al. A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1108–12.
168. Seewaldt VL, Scott V. Images in clinical medicine. Rapid progression of basal-type breast cancer. *N Engl J Med* 2007;356:e12.
169. Vona-Davis L, Rose DP, Hazard H, et al. Triple-negative breast cancer and obesity in a rural Appalachian population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3319–24.
170. Wei B, Wang J, Bourne P, et al. Bone metastasis is strongly associated with estrogen receptor-positive/progesterone receptor-negative breast carcinomas. *Hum Pathol* 2008;39:1809–15.
171. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2784–2795.
172. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009; 20: 1319–1329.
173. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al.; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3997–4013.
174. Hennigs A, Riedel F, Gondos A, et al. Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: a large prospective cohort study. *BMC Cancer*. 2016;16(1):734. doi: 10.1186/s12885-016-2766-3.
175. Wu K, Yang Q, Liu Y, et al. Meta-analysis on the association between pathologic complete response and triple-negative breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *World J Surg Oncol*. 2014;12:95. doi: 10.1186/1477-7819-12-95.
176. Fisher CS, Ma CX, Gillanders WE, et al. Neoadjuvant chemotherapy is associated with improved survival compared with adjuvant chemotherapy in patients

- with triple-negative breast cancer only after complete pathologic response. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(1):253-258. doi: 10.1245/s10434-011-1877-y.
177. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triplenegative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4429–4434.
 178. Coughlin SS and Ekwueme DU. Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiol* 2009; 33: 315–318.
 179. Cleere DW. Triple-negative breast cancer: a clinical update. *Community Oncol* 2010; 7: 203–211.
 180. Gong Y, Yan K, Lin F, et al. Determination of oestrogen-receptor status and ERBB2 status of breast carcinoma: a gene-expression profiling study. *Lancet Oncol* 2007;8:203–11.
 181. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and non basal subtypes. *Clin Cancer Res*. 2009;15:2302-10, doi: 10.1158/1078-0432- ,CCR-08-2132.
 182. Kumar N, Patni P, Agarwal A, Khan MA, Parashar N. Prevalence of molecular subtypes of invasive breast cancer: a retrospective study. *Med J Armed Forces India*. 2015;7:254-8, doi:10.1016/j.mjafi.2015.04.006.
 183. Sotiriou C, Phil D, Pusztaj J. Gene expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009;360:790-800, doi:10.1056/NEJMra0801289.
 184. Jamdade VS, Sethi N, Mundhe NA, Kumar P, Lahkar M, Sinha N. Therapeutic targets of triple-negative breast cancer: a review. *Br J Pharmacol*. 2015;172:4228-37,doi:10.1111/bph/13211.
 185. Jones P.A. et al. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.*, 3, 415–428.
 186. Baylin S.B. (2005) DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2 (suppl. 1), S4–S11.
 187. Inbal B, Cohen O, Polak-Charson S et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature*. 390, 180-4, 1997
 188. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organoconfined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 93, 1747-52, 2001
 189. Agoston AT, Argani P, Yegnasubramanian S, De Marzo AM, Ali Ansari-Lari M, Hicks JL, Davidson NA and Nelson WG. Increased Protein Stability Causes DNA Methyltransferase 1 Dysregulation in Breast Cancer. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 280, No. 18, Issue of May 6, pp. 18302–18310, 2005.
 190. Supic G, Jovic N, Zeljic K, Kozomara R, Magic Z. Association of VEGF-A genetic polymorphisms with cancer risk and survival in advanced-stage oral squamous cell carcinoma patients, *Oral Oncology* 48 (2012) 1171–1177
 191. Basse C and Arock M, “The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment,” *Int. J. Cancer*, vol. 137, no. 12, pp. 2785–2794, Dec. 2015.

192. Szyf M. (Ed). DNA Methylation and Cancer Therapy. Kluwer, Academic/Plenum Publishers, 2005
193. Yang X, Yan L, and Davidson NE, "DNA methylation in breast cancer.," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 8, no. 2, pp. 115–27, Jun. 2001.
194. Widschwendter M and Jones PA, "DNA methylation and breast carcinogenesis," *Oncogene*, vol. 21, no. 35, pp. 5462–5482, Aug. 2002.
195. Lee JJ. et al., "Methylation and Immunoeexpression of p16^{INK4a} Tumor Suppressor Gene in Primary Breast Cancer Tissue and Their Quantitative p16^{INK4a} Hypermethylation in Plasma by Real-Time PCR," *Korean J. Pathol.*, vol. 46, no. 6, p. 554, Dec. 2012.
196. Klajic J. et al., "Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors," *BMC Cancer*, vol. 13, no. 1, p. 456, 2013.
197. Wang L, Tang L, Xie R, Nie W, Chen L. and Guan X. "p16 promoter hypermethylation is associated with increased breast cancer risk," *Mol. Med. Rep.*, vol. 6, no. 4, pp. 904–908, Oct. 2012.
198. X. Sheng, Y. Guo, and Y. Lu, "Prognostic role of methylated GSTP1, p16, ESR1 and PITX2 in patients with breast cancer," *Medicine (Baltimore)*, vol. 96, no. 28, p. e7476, Jul. 2017.
199. N. Yamamoto, T. Nakayama, M. Kajita et al., "Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RAR β 2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 132, no. 1, pp. 165–173, 2012.
200. L. Liu, L. Sun, C. Li et al., "Quantitative detection of methylation of FHIT and BRCA1 promoters in the serum of ductal breast cancer patients," *Bio-medical Materials and Engineering*, vol. 26, Supplement 1, pp. S2217–S2222, 2015.
201. R.T. Pu, L.E. Laitala, P.M. Alli, M.J. Fackler, S. Sukumar, D.P. Clark, Methylation profiling of benign and malignant breast lesions and its application to cytopathology, *Mod. Pathol.* 16 (11) (2003) 1095–1101.
202. C. Jerónimo, I. Costa, M.C. Martins, P. Monteiro, S. Lisboa, C. Palmeira, R. Henrique, M.R. Teixeira, C. Lopes, Detection of gene promoter hypermethylation in fine needle washings from breast lesions, *Clin. Cancer Res.* 9 (9) (2003)3413–3417.
203. E. Evron, W.C. Dooley, C.B. Umbricht, D. Rosenthal, N. Sacchi, E. Gabrielson, A.B. Soito, D.T. Hung, B. Ljung, N.E. Davidson, S. Sukumar, Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR, *Lancet* 357 (9265) (2001) 1335–1336.
204. R. Krassenstein, E. Sauter, E. Dulaimi, C. Battagli, H. Ehya, A. Klein-Szanto, P. Cairns, Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation, *Clin. Cancer Res.* 10 (1 (Pt. 1)) (2004) 28–32.
205. Vo AT, Millis RM (2001) Epigenetics and breast cancers. *Obstetrics and Gynecology International*.
206. Pike MC, Spicer DV, Dahmouh L, Press MF (1993) Estrogens progestogens normal breast cell proliferation and breast cancer risk. *Epidemiologic Reviews* 15: 17-35.

207. Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA (2004) DNA demethylation and cancer: Therapeutic implications. *Cancer Lett* 211: 133-143.
208. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JPJ (1998) Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72: 141-96.
209. Mehrotra J, Ganpat MM, Kanaan Y, Fackler MJ, McVeigh M, et al. (2004) Estrogen receptor/ progesterone receptor-negative breast cancers of young African-American women have a higher frequency of methylation of multiple genes than those of Caucasian women. *Clin Cancer Res* 10:2052-2057.
210. Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, Ivarsson L, Goebel G, et al.(2003) DNA methylation in serum of breast cancer patients: An independent prognostic marker. *Cancer Res* 63: 7641-7645.
211. J. Jovanovic, J.A. Rønneberg, J. Tost, V. Kristensen, The epigenetics of breast cancer, *Mol. Oncol.* 4 (3) (2010) 242–254.
212. J. D. Roll et al., “Dysregulation of the epigenome in triple-negative breast cancers: Basal-like and claudin-low breast cancers express aberrant DNA hypermethylation,” *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 95, no. 3, pp. 276–287, Dec. 2013.
213. L. Wu et al., “Promoter methylation of BRCA1 in the prognosis of breast cancer: a meta-analysis,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 142, no. 3, pp. 619–627, Dec. 2013.
214. F.F. Cai, S. Chen, M.H. Wang, X.Y. Lin, L. Zhang, J.X. Zhang, L.X. Wang, J. Yang, J.H. Ding, X. Pan, Z.M. Shao, E. Biskup, Pyrosequencing quantified methylation level of BRCA1 promoter as prognostic factor for survival in breast cancer patient, *Oncotarget* 7 (19) (2016) 27499–27510.
215. P. Parrella, M. Poeta, A. Gallo, M. Prencipe, M. Scintu, A. Apicella, R. Rossiello, G. Liguoro, D. Seripa, C. Gravina, C. Rabitti, M. Rinaldi, T. Nicol, S. Tommasi, A. Paradiso, F. Schittulli, V. Altomare, V. Fazio, Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors, *Clin. Cancer Res.* 10 (16) (2004) 5349–5354.
216. M. Esteller, J.M. Silva, G. Dominguez, F. Bonilla, X. Matias-Guiu, E. Lerma, E. Bussaglia, J. Prat, I.C. Harkes, E.A. Repasky, E. Gabrielson, M. Schutte, S.B. Baylin, J.G. Herman, Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors, *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (7) (2000) 564–569.
217. Y. Xu, L. Diao, Y. Chen, Y. Liu, C. Wang, T. Ouyang, J. Li, T. Wang, Z. Fan, T. Fan, B. Lin, D. Deng, S.A. Narod, Y. Xie, Promoter methylation of BRCA1 in triplenegative breast cancer predicts sensitivity to adjuvant chemotherapy, *Ann. Oncol.* 24 (6) (2013) 1498–1505.
218. J.A. Ledermann, P. Harter, C. Gourley, M. Friedlander, I. Vergote, G. Rustin, C. Scott, W. Meier, R. Shapira-Frommer, T. Safra, D. Matei, A. Fielding, S. Spencer, P. Rowe, E. Lowe, D. Hodgson, M.A. Sovak, U. Matulonis, Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial, *Lancet Oncol.* 17 (11) (2016) 1579–1589.
219. M. Robson, S.A. Im, E. Senkus, B. Xu, S.M. Domchek, N. Masuda, S. Delaloge, W. Li, N. Tung, A. Armstrong, W. Wu, C. Goessl, S. Runswick, P. Conte,

- Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation, *N. Engl. J. Med.* (2017).
220. C.J. Lord, A. Ashworth, BRCAness revisited, *Nat. Rev. Cancer* 16 (2) (2016)110–120.
 221. J. Veeck, S. Ropero, F. Setien, E. Gonzalez-Suarez, A. Osorio, J. Benitez, J.G. Herman, M. Esteller, BRCA1 CpG island hypermethylation predicts sensitivity to poly(adenosine diphosphate)-ribose polymerase inhibitors, *J. Clin. Oncol.* 28 (29) (2010) e563–e564 author reply e565-6.
 222. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*, 2007,117:3155-3163.
 223. ¹ Blair LP, Yan Q. Epigenetic mechanisms in commonly occurring cancers. *DNA Cell Biol.* 31, Suppl. 1, S49-61
 224. Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E et al. Circulating tumor –specific DNA: a marker for monitoring efficacy or adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res.* 65(4), 1141-5, 2005.
 225. A.Q. van Hoesel, Y. Sato, D.A. Elashoff, R.R. Turner, A.E. Giuliano, J.M. Shamonki, P.J. Kuppen, C.J. van de Velde, D.S. Hoon, Assessment of DNA methylation status in early stages of breast cancer development, *Br. J. Cancer* 108 (10) (2013)2033–2038.
 226. T. Ballinger, J. Kremer, and K. Miller, “Triple Negative Breast Cancer—Review of Current and Emerging Therapeutic Strategies,” pp. 89–94, 2016.
 227. Yong Jiang, et al. The Prognostic Role of *RASSF1A* Promoter Methylation in Breast Cancer: A Meta-Analysis of Published Data, 2012; 7(5): e36780. doi: 10.1371/journal.pone.0036780
 228. José Roberto F Caldeira et al. *CDHI* promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer, *BMC Cancer*. 2006; 6: 48, doi: 10.1186/1471-2407-6-48
 229. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343:1350-4, 200
 230. Zuo C, Ai L, Ratliff P, Suen JY, Hanna E, Brent TP, Fan CY. O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(6):967-75.
 231. Nairui An Yu Shi Peng Ye Zhongya Pan Xinghua Long. Association Between MGMT Promoter Methylation and Breast Cancer: a Meta-Analysis, *Cell Physiol Biochem* 2017;42:2430-2440
 232. C. Stirzaker, E. Zotenko, J.Z. Song, W. Qu, S.S. Nair, W.J. Locke, A. Stone, N.J. Armstrong, M.D. Robinson, A. Dobrovic, K.A. Avery-Kiejda, K.M. Peters, J.D. French, S. Stein, D.J. Korbie, M. Trau, J.F. Forbes, R.J. Scott, M.A. Brown, G.D. Francis, S.J. Clark, Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value, *Nat. Commun.* 6 (2015) 5899.

233. M.H. Quentien, V. Vieira, M. Menasche, J.L. Dufier, J.P. Herman, A. Enjalbert, M. Abitbol, T. Brue, Truncation of PITX2 differentially affects its activity on physiological targets, *J. Mol. Endocrinol.* 46 (1) (2011) 9–19.
234. X. Zhu et al., “Hypermethylation of BRCA1 gene: implication for prognostic biomarker and therapeutic target in sporadic primary triple-negative breast cancer,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 150, no. 3, pp. 479

Biografija

Zoran Kozomara je rođen u Glamoču, Bosna i Hercegovina, 01. novembra 1969. godine. Osnovnu i srednju školu je završio u Beogradu sa odličnim uspehom. Nakon odsluženja vojnog roka započeo je studije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, 1989. godine.

Medicinski fakultet Univerzizeta u Beogradu je završio 1996. godine sa sa prosečnom ocenom 9.20 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Lekarski staž je obavio na KBC Bežanijska kosa 1997. godine i položio stručni ispit 1998. godine.

Započeo je specijalizaciju iz opšte hirurgije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Prvoj hirurškoj klinici - Centru za hirurgiju jednjaka 1998. godine. Od 1999. godine zaposlen je na Klinici za onkološku hirurgiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Završio je specijalizaciju iz opšte hirurgije 2003. godine ocenom odličan.

Na Medicinskom Fakultetu Univerziteta u Beogradu - odseku Hirurška anatomija odbranio je magistarsku tezu pod nazivom: "*Anatomske varijacije nervus laringeus rekurensa u odnosu na donju tiroidnu arteriju*" 2010. godine pod mentorstvom Prof. Dr Radana Džodića i stekao zvanje Magistra medicinskih nauka.

Posebno interesovanje ima za hirurgiju dojke, hirurgiju štitaste žlezde i hirurgiju kože i mekih tkiva. Autor je i koautor više publikovanih radova na SCI listi. Zaposlen je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS) od 1999. godine gde obavlja funkciju šefa odseka operacionih sala.

Član je Srpskog lekarskog društva, Hirurške sekcije srpskog lekarskog društva, Kancerološke sekcije srpskog lekarskog društva, Udruženja onkoloških hirurga Srbije, Udruženja medikalnih onkologa Srbije, Evropskog udruženja onkoloških hirurga (ESSO), Evropskog udruženja terapijskih radiologa i onkologa.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Mr sci med Dr Zoran Kozomara

broj upisa _____

Izjavljujem

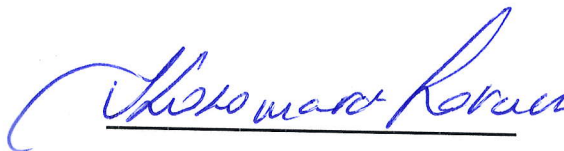
da je doktorska disertacija pod naslovom

**POVEZANOST HIPERMETILACIJE PROMOTORA *BRCA1*, *P16*, *MGMT*,
RASSF1 I *CDH-1* GENA I TOKA BOLESTI BOLESNICA SA ESTROGEN-
RECEPTOR, PROGESTERON-RECEPTOR I HER-2 RECEPTOR
NEGATIVNIM KARCINOMOM DOJKE**

- 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 doktoranda

U Beogradu, 09.07.2018.



Zoran Kozomara

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Mr sci med Dr Zoran Kozomara

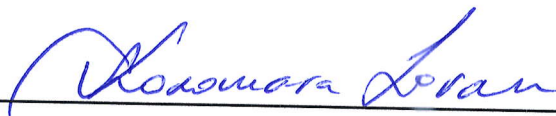
Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada **POVEZANOST HIPERMETILACIJE PROMOTORA *BRCA1, P16, MGMT, RASSF1 I CDH-1* GENA I TOKA BOLESTI BOLESNICA SA ESTROGEN-RECEPTOR, PROGESTERON-RECEPTOR I HER-2 RECEPTOR NEGATIVNIM KARCINOMOM DOJKE**

Mentor: Prof Dr Radan Džodić

Komentor: N.Sav. Dr sci med Mirjana Branković Magić

Potpisani 

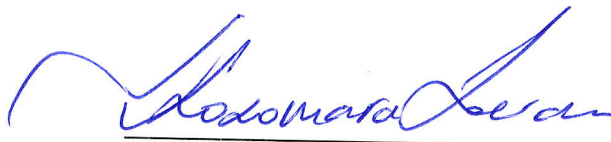
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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 doktoranda

U Beogradu, 09.07.2018.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: **POVEZANOST HIPERMETILACIJE PROMOTORA *BRCA1*, *P16*, *MGMT*, *RASSF1* I *CDH-1* GENA I TOKA BOLESTI BOLESNICA SA ESTROGEN-RECEPTOR, PROGESTERON-RECEPTOR I HER-2 RECEPTOR NEGATIVNIM KARCINOMOM DOJKE**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima 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).

U Beogradu, 09.07.2018.

Potpis doktoranda

