

P1 20877

Ms 3738/31  
43.N

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**BIOLOŠKI FAKULTET**

**Zaki Abu Rabi**

**ZNAČAJ BIOLOŠKE HETEROGENOSTI  
KARCINOMA DOJKE ZA ODGOVOR NA  
TERAPIJU ANTIESTROGENIMA**

**Doktorska teza**



**Beograd  
2010.**

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Задатак Рад 1

ЗНАЧАЈ КИМОЛСКЕ ХЕТЕРОГЕНОСТИ  
КАРЦИНОМА БОЈКЕ ЗА ОДГОВОР НА  
ТЕРАПИЈУ АНТИЕСТРОГЕНИМА



Београд  
2019

## **Mentori:**

**dr Gordana Matić**  
redovni profesor Biološkog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

**dr Dragica Nikolić-Vukosavljević, naučni savetnik**  
Institut za Onkologiju i Radiologiju Srbije

## **Članovi komisije:**

**dr Gordana Matić**  
redovni profesor Biološkog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

**dr Dragica Nikolić-Vukosavljević, naučni savetnik**  
Institut za Onkologiju i Radiologiju Srbije

**dr Aleksandra Korać**  
vanredni profesor Biološkog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

## Abstract

Analysis of biological heterogeneity of estrogen-dependant primary operable breast cancer in postmenopausal patients treated with tamoxifen, had, as a goal, analysis of its significance in determining clinical course of disease. Biological heterogeneity of cancers in this group of patients has been determined based on molecular biomarkers of tumor growth: ER, PR, Her-2, Ki-67, apoptotic index, and markers of invasiveness and metastatic potential of malignant tumor cells uPA, PAI-1 and VEGF. Determination of new high risk phenotypes was conducted in three time periods of clinical course of disease follow-up: in first 2.5 years of treatment to determine early (*de novo*) resistance, period between 2.5 and 5 years, in order to define acquired resistance, and 12 years of follow-up in order to determine biomarker prognostic value.

In this study, analysis was conducted on 127 patients diagnosed with primary operable breast cancer. After surgical treatment, all the patients were treated with tamoxifen during five years. Steroid receptors were determined by classical biochemical method, Her2 amplification was determined using chromogen *in situ* hybridization (CISH), levels of Ki-67 antigen were determined using immnohistochemistry, apoptotic index by using TUNEL method, while ELISA test were used to determine protein levels of uPA, PAI-1 and VEGF.

Follow-up on clinical course of disease in patients treated with tamoxifen in first 2.5 years had shown that, out of clinical-pathological parameters it is the size of tumor, and in biomarkers it is ER, PR, uPA and PAI-1 that have predictive role. Tumors that are larger than 2 cm, negative status of ER ( $<5$  fmol/mg), PR ( $<5$  fmol/mg) and PAI-1 ( $<4.5$  ng/mg), define the worse response to tamoxifen in patients. Positive status of uPA ( $0.26$  ng/mg $\geq$ ) defines a subgroup of patients with poor response to therapy. Unitizing of unfavorable characteristics reveals phenotypes with even worse course of disease, indicating *de novo* resistance. In 2.5 to 5 years period of treatment, amplification of Her2 in tumors equal or larger than 2cm is indicator of acquired resistance in tamoxifen therapy. The subgroups that were proven to be high-risk for the period of first 2.5 years, do not show the same risk in period of 2.5 to 5 years. Prognostic value of parameters, observed in period of 12 years, reveals that the patients older then 66 years have significantly worse prognosis, regardless of status of clinical-pathological parameters and molecular biomarkers. Positive status of ER ( $5$  fmol/mg $\geq$ ), PAI-1 ( $2.11$  ng/mg $\geq$ ) and VEGF ( $571.8$  pg/mg $\geq$ ) are indicators of low risk patients groups. These results have show to us that reactions between biomarkers, signal pathways in the time of making diagnosis, can signify the time of resistance appearing as well as distant metastasis.

## Izvod

Analiza biološke heterogenosti estrogen zavisnog primarnog operabilnog karcinoma dojke, pacijentkinja u postmenopauzi lečenih tamoksifenom, imala je za cilj ispitivanje njenog značaja za klinički tok bolesti. Biološka heterogenost tumora ove grupe pacijentkinja je određivana na osnovu molekularnih biomarkera rasta tumora: ER, PR, Her2, Ki-67, apoptotski indeks, invazivnosti i metastatičnosti malignih ćelija tumora: uPA, PAI-1 i VEGF. Određivanje visokorizičnih fenotipova odnosilo se na tri vremenska perioda kliničkog praćenja toka bolesti: prvih 2.5 godine terapije kako bi se utvrdila rana (*de novo*) rezistencija, perioda između 2.5 i 5 godina terapije radi definisanja stečene rezistencije i praćenje od 12 godina koje ima za cilj da ukaže na prognostički značaj određivanih biomarkera.

Analizama u okviru ove studije obuhvaćeno je 127 pacijentkinja kod kojih je potvrđen primarni operabilni karcinom dojke. Nakon hiruške terapije sve pacijentkinje su primale terapiju tamoksifenom u trajanju od pet godina. Steroidni receptori su određivani klasičnom biohemijskom metodom, amplifikacija Her2 gena hromogenom *in situ* hibridizacijom (CISH), nivo Ki-67 je utvrđen imunohistohemijskom metodom, apoptotski indeks TUNEL metodom, dok je za određivanje nivoa proteina uPA, PAI-1 i VEGF korišćen ELISA test.

Praćenje kliničkog toka bolesti pacijentkinja lečenih tamoksifenom u prvih 2.5 godina ukazalo je da od kliničko-patoloških parametara veličina tumora, a od biomarkera ER, PR, uPA i PAI-1 imaju značajnu prediktivnu ulogu. Tumori jednaki ili veći od 2 cm, negativan status ER ( $<5$  fmol/mg), PR ( $<5$  fmol/mg) i PAI-1 ( $<4.5$  ng/mg) definišu pacijentkinje sa lošijim odgovorom na terapiju tamoksifenom. Pozitivan status uPA ( $0.26$  ng/mg $\geq$ ) definiše podgrupu sa značajno slabijim odgovorom na terapiju. Združivanje nepovoljnih karakteristika otkriva fenotipove sa visokim rizikom za pojavu udaljenih metastaza, ukazujući na *de novo* rezistenciju. U periodu od 2.5 do 5 godina terapije amplifikacija Her2 gena u okviru tumora jednakih ili većih od 2cm tumora je pokazatelj stečene rezistencije na terapiju tamoksifenom. Visokorizične podgrupe dobijene za period prvih 2.5 godina ne pokazuju isti rizik i u periodu od 2.5 do 5 godina terapije. Prognostički značaj biomarkera, posmatran u periodu od 12 godina, otkriva da pacijentkinje starije od 66 godina imaju znatno lošiju prognozu bez obzira na status kliničko-patoloških parametara i molekularnih biomarkera. Pozitivni statusi ER ( $5$  fmol/mg $\geq$ ), PAI-1 ( $2.11$  ng/mg $\geq$ ) i VEGF ( $571.8$  pg/mg $\geq$ ) ukazuju na niskorizične podgrupe pacijentkinja. Ovi rezultati su nam pokazali da odnosi biomarkera u okviru signalnih puteva, u trenutku dijagnoze, mogu ukazati na vreme pojave rezistencije i udaljenih metastaza.

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za receptore i biologiju malignih tumora na Institutu za Onkologiju i Radiologiju Srbije pod rukovodstvom dr Dragice Nikolić-Vukosavljević kojoj se zahvaljujem na velikoj pomoći u ekperimentalnom radu, kao i pri pisanju teze.

Jedan deo eksperimenata urađen je u Laboratoriji za biohemiju, prof. dr Gordane Matic, kojoj se zahvaljujem na stručnoj pomoći i sugestijama tokom izrade teze.

Takođe se zahvaljujem prof. dr Aleksandri Korać na korisnim savetima.

Zahvalnost na superviziji kliničkog toka bolesti pacijentkinja dugujem dr Ljiljani Stamatović.

Zahvalnost dugujem kolegama i laboratorijskim tehničarima Laboratorije za receptore i biologiju malignih tumora na velikoj pomoći tokom ekperimentalnog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem Milijani Pribić, profesorki biologije XV beogradske gimnazije, na tome što me je usmerila ka nauci.

Na kraju zahvalnost dugujem svojoj porodici i devojci Tamari na podršci i strpljenju tokom izrade ove doktorske teze.

## SADRŽAJ

I. UVOD.....	1
I.1.1. Inicijacija .....	1
I.1.2. Promocija.....	1
I.1.3. Progresija.....	2
I.2. KLINIČKO-PATOLOŠKI PARAMETRI PROGNOZE/PREDIKCIJE.....	2
I.2.1. Prognoza i predikcija karcinoma dojke.....	2
I.2.2. Zahvaćenost limfnih čvorova malignim ćelijama.....	3
I.2.3. Veličina tumora.....	3
I.2.4. Histopatološki gradus tumora .....	3
I.2.5. Histopatološki tip tumora .....	4
I.2.6. Godine i status menopauze pacijenta .....	4
I.3. ESTROGENA ZAVISNOST KARCINOMA DOJKE .....	4
I.3.1. Steroidni hormoni .....	4
I.3.2. ER i PR - značaj u prognozi i predikciji.....	5
I.4. STRUKTURA STEROIDNIH RECEPTORA.....	6
I.4.1. Estrogeni receptor-struktura .....	6
I.4.2. Progesteronski receptor-struktura .....	7
I.5. MEHANIZAM DEJSTVA ER.....	7
I.5.1. Klasičan način delovanja estrogenog receptora.....	7
I.5.2. Neklasičan način delovanja estrogenog receptora.....	7
I.5.3. Ligand-nezavisno delovanje estrogenog receptora.....	8
I.5.4. Negenomski put delovanja ER .....	8
I.6. TAMOKSIFEN .....	9
I.6.1. Rezistencija na primenu tamoksifena .....	10
I.7. BIOMARKERI OD ZNAČAJA ZA PROCESSE PROLIFERACIJE, INVAZIJE I ANGIOGENEZE.....	13
I.7.1. Her2.....	13
I.7.2. Proliferativni i apoptotski indeks .....	14
I.7.3. Angiogeneza .....	15
I.7.4. Urokinazni plazminogen aktivator (uPA) i plazminogen aktivator inhibitor tipa 1 (PAI-1).....	16
II. CILJ.....	18
III. MATERIJAL I METODE.....	19
III.1. KLINIČKO-PATOLOŠKE KARAKTERISTIKE PACIJENTKINJA I TUMORA .....	19
III.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ER I PR IZ TKIVA TUMORA.....	20
III.3. ELISA.....	22
III.3.1. VEGF .....	22
III.3.2. uPA i PAI-1.....	23
III.4. HROMOGENA <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJA .....	23
III.5. IMUNOHISTOHEMIJSKA METODA ZA ODREĐIVANJE Ki-67 .....	24
III.6. TUNEL METODA.....	26
III.7. STATISTIČKE METODE KORIŠĆENE U RADU .....	27
IV. REZULTATI.....	28
IV.1. TOK BOLESTI U PRVIH 2.5 GODINE TERAPIJE TAMOKSIFENOM.....	28
IV.1.1. Molekularni biomarkeri i njihova ekspresija.....	28
IV.1.2. Korelacije ekspresije molekularnih biomarkera .....	29

---

IV.1.3. Distribucija molekularnih biomarkera prema klasičnim patohistološkim parametrima prognoze.....	30
IV.1.4. Prediktivni značaj patohistoloških parametara .....	35
IV.1.5. Prediktivni značaj fenotipova dobijenih kombinacijom klasičnih patohistoloških parametara.....	36
IV.1.6. Prediktivni značaj ispitivanih molekularnih biomarkera.....	38
IV.1.7. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu molekularnih biomarkera .....	41
IV.1.8. Distribucija biomarkera u podgrupama definisanim po združenom statusu biomarkera.....	44
IV.1.9. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu ER, PR i Her2.....	46
IV.1.10. Prediktivni značaj združenog statusa ER i klasičnih patohistoloških parametara prognoze .....	47
IV.1.11. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu PR i klasičnih patohistoloških parametara prognoze.....	49
IV.1.12. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu Her2 i klasičnih parametara prognoze .....	52
IV.1.13. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu uPA i klasičnih patohistoloških parametara prognoze.....	53
IV.1.14. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu PAI-1 i klasičnih patohistoloških parametara prognoze.....	54
IV.2. TOK BOLESTI U PERIODU IZMEĐU 2.5 i 5 GODINA TERAPIJE TAMOKSIFENOM .....	55
IV.2.1. Prediktivni značaj patohistoloških parametara .....	56
IV.2.2. Prediktivni značaj fenotipova dobijenih kombinacijom klasičnih patohistoloških parametara.....	57
IV.2.3. Prediktivni značaj molekularnih biomarkera u periodu od 2.5 godine do 5 godina terapije tamoksifenom .....	57
IV.2.4. Prediktivni značaj združenog statusa Her2 i klasičnih patohistoloških parametara prognoze .....	58
IV.3. TOK BOLESTI U PERIODU PRAĆENJA OD 12 GODINA .....	60
IV.3.1. Korelacije ekspresije molekularnih biomarkera .....	60
IV.3.2. Prognostički značaj kliničko-patoloških parametara.....	61
IV.3.3. Prognostički značaj fenotipova dobijenih kombinacijom klasičnih kliničko-patoloških parametara .....	62
IV.3.4. Prognostički značaj ispitivanih molekularnih biomarkera .....	64
IV.3.5. Prognostički značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu molekularnih biomarkera .....	67
IV.3.6. Prognostički značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu ER i kliničko-patoloških parametara .....	69
IV.3.7. Prognostički značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu Her2 i kliničko-patoloških parametara .....	71
IV.3.8. Prognostički značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu VEGF i kliničko-patoloških parametara .....	72
IV.3.9. Prognostički značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu PAI-1 i kliničko-patoloških parametara .....	73
V. DISKUSIJA.....	74
V.1. TOK BOLESTI U PRVIH 2.5 GODINE TERAPIJE TAMOKSIFENOM .....	75

---



---

V.1.1. Značaj patohistoloških parametara.....	75
V.1.2. Značaj ispitivanih molekularnih biomarkera: ER, PR i Her2.....	75
V.1.3. Združeni status ER, PR i Her2.....	77
V.1.4. Prediktivni značaj ER i patohistoloških parametara prognoze.....	80
V.1.5. Prediktivni značaj PR i patohistoloških parametara prognoze.....	80
V.1.6. Prediktivni značaj Her2 i patohistoloških parametara prognoze.....	81
V.1.7. Prediktivni značaj uPA i PAI-1.....	82
V.1.8. Prediktivni značaj združenog statusa uPA, PAI-1 i ostalih ispitivanih molekularnih biomarkera.....	84
V.1.9. Prediktivni značaj združenog statusa uPA, PAI-1 i patohistoloških parametara prognoze.....	85
V.2. TOK BOLESTI U PERIODU OD 2.5 DO 5 GODINA TERAPIJE TAMOKSIFENOM.....	86
V.2.1. Prediktivni značaj patohistoloških parametara.....	86
V.2.2. Prediktivni značaj ispitivanih biomarkera.....	86
V.2.3. Prediktivni značaj združenog statusa Her2 i patohistoloških parametara prognoze.....	87
V.3. TOK BOLESTI U PERIODU PRAĆENJA OD 12 GODINA.....	88
V.3.1. Prognostički značaj kliničko-patoloških parametara.....	88
V.3.2. Prognostički značaj fenotipova dobijenih kombinacijom klasičnih kliničko-patoloških parametara.....	89
V.3.3. Prognostički značaj molekularnih biomarkera: ER, PR, Her2.....	89
V.3.4. Prognostički značaj združenog statusa ER i kliničko-patoloških parametara.....	90
V.3.5. Prognostički značaj združenog statusa Her2 i kliničko-patoloških parametara.....	91
V.3.6. Prognostički značaj uPA i PAI-1.....	91
V.3.7. Prognostički značaj PAI-1 i kliničko-patoloških parametara.....	92
V.3.8. Prognostički značaj VEGF.....	92
V.3.9. Prognostički značaj združenog statusa VEGF i kliničko-patoloških parametara.....	93
VI. ZAKLJUČAK.....	95
VI.1. PRAĆENJE BOLESTI PACIJENTKINJA TOKOM PRVIH 2.5 GODINA OD POČETKA PRIMANJA TERAPIJE TAMOKSIFENOM.....	95
VI.2. TOK BOLESTI U PERIODU PRAĆENJA IZMEĐU 2.5 i 5 GODINA TERAPIJE TAMOKSIFENOM.....	95
VI.3. TOK BOLESTI U PERIODU PRAĆENJA PACIJENTKINJA OD 12 GODINA.....	96
VII. LITERATURA.....	97

---

## I. UVOD

Karcinom dojke predstavlja biološki i klinički heterogeno oboljenje koje nastaje malignom transformacijom stem/progenitorne ćelije dojke (Heather i sar, 2008). Veliki pomak u lečenju postignut je zahvaljujući ciljanoj terapiji hormon-zavisnih, estrogen receptor pozitivnih (ER+) tumora, koji spadaju u najčešći oblik karcinoma dojke (EBCTCG, 2005; Peto i sar, 2000). Kod estrogen receptor negativnih (ER-) i pacijentkinja kod kojih se javlja rezistencija na terapiju, mogućnost prognoze i predikcije znatno opada zajedno sa njihovim preživljavanjem (Heather i sar, 2008).

### I.1. NASTANAK MALIGNOG TUMORA

Kancerogeneza i klinička manifestacija tumora obuhvata vremenski period različite dužine (D'Amato G, 1998). Mogu se izdvojiti tri sukcesivna nivoa neoplastičnog procesa: inicijacija, promocija, koji dovode do transformacije normalne u malignu ćeliju, a zatim i treći nivo progresije koji vodi u stvaranje malignog tumora (Shubik P, 1984).

#### I.1.1. Inicijacija

Stadijum inicijacije maligne ćelije obuhvata period u kojem dolazi do ireverzibilnih promena normalne ćelije. Inicirana ćelija poseduje nove unutrašnje karakteristike koje joj daju mogućnost za autonoman rast. Ovakva ćelija može morfološki izgledati vrlo slično normalnoj, čak neprepoznatljivo *in vivo*, ali sa značajnim genetskim i biohemijskim promenama koje se manifestuju različitom ekspresijom proteina (D'Amato G, 1998). Osnova ovih procesa leži u mutagenezi kao neophodnom, ali ne i jedinom uslovu za nastanak tumora. Sve navedene karakteristike inicirane ćelije na kraju pomeraju ravnotežu proliferacije i diferencijacije, koja postoji u normalnoj ćeliji, u smeru bržeg umnožavanja ćelija (Yuspa i sar, 1981). Transformisana ćelija može podleći prirodnom procesu nestanka, može ostati u uspavanom (dormantnom) stanju mirovanja duži vremenski period, ili nastaviti sa promenama (D'Amato G, 1998).

#### I.1.2. Promocija

Ćelija u kojoj je već došlo do ireverzibilnih oštećenja intenzivno prolifериše u fazi promocije. Faktori koji favorizuju proliferaciju transformisanih ćelija nazivaju se promotori ili ko-karcinogeni. Promotori nisu direktno uključeni u proces neoplastične transformacije, ali mogu povećati rast neoplastično transformisanih ćelija (D'Amato G, 1998). Dejstvo promotora na proliferaciju i rast transformisane ćelije odvija se kroz epigenetske i regulatorne mehanizme koji dovode do promene genske ekspresije. Regulacija ćelije preko egzogenih faktora vrši se mitogenima, hormonima, faktorima rasta i kancerogenima (Klaunung i sar, 1990). Celokupni proces dovodi do smanjenog uticaja normalnih ćelija na transformisane ćelije. Kao posledica dolazi do nagomilavanja transformisanih ćelija. Za razliku od inicijacije, promocija predstavlja reverzibilan proces tako da po prestanku delovanja promotora, i nakon ponovnog uspostavljanja komunikacije među ćelijama proces se može zaustaviti (D'Amato G, 1998).



### I.1.3. Progresija

Progresija tumora predstavlja proces u kome transformisane ćelije formiraju maligni tumor sa sposobnošću metastaziranja (Herlyn i sar, 1987). Dalji razvoj malignog tumora povezan je procesima koji kontrolišu kako proliferaciju tako i programiranu smrt ćelija. Kompleksni mehanizmi i faktori, transformisanih ćelija i organizma, utiču na rast samog tumora. Nestabilnost tumorskih ćelija, koja se dešava na genetskom i molekularnom nivou, igra značajnu ulogu u progresiji (Kendal i Frost, 1986). Data nestabilnost dovodi do promena na protoonkogenima, tumor supresorima, kao i na genima koji kodiraju adhezione molekule kao što su integrini, zatim proteinaze, citoskeletne komponente i proteine usko povezane sa migracijom (Weterman i sar, 1994). Tumor u fazi progresije postaje sve više nezavisan od okolne mikrosredine. Faktori rasta se u ovoj fazi u velikoj meri proizvode u samim tumorima. Smanjeni ili povećani nivo hormona, kod hormon-zavisnih tumora, zajedno sa kvalitativnim ili kvantitativnim promenama receptora može bitno uticati na brzinu rasta samih tumora (D'Amato G, 1998). Bitno je istaći da tokom progresije dolazi do gubitka kontrole osnovnih bioloških procesa i ostvarivanja malignih osobina: visoka proliferativnost, invazivnost, metastatičnost i autonomnost (Nowell, 1976; Nicholson, 1987).

Takođe kao jedna od najbitnijih karakteristika progresije tumora jeste formiranje veoma heterogene populacije neoplastičnih ćelija. Ova diverzifikacija javlja se veoma rano u razvoju tumora i kasnije u velikoj meri doprinosi preživljavanju neoplastičnih ćelija pod različitim uticajima (Dexter i sar, 1981; Heppner, 1984). Heterogenost nije ograničena samo na primarni tumor već i na metastaze (Fidler, 1987). Ta heterogenost tumora izražena je kroz mnoge fenotipske osobine, kao što su ćelije sa većim metastatskim potencijalom, povećana ili smanjena osetljivost na radioterapiju ili lekove. Samim tim uspeh lečenja i ishod bolesti zavisi od interneoplastične raznovrsnosti (Schnipper, 1986).

## I.2. KLINIČKO-PATOLOŠKI PARAMETRI PROGNOZE/PREDIKCIJE

### I.2.1. Prognoza i predikcija karcinoma dojke

Kako dolazi do povećanja opcija vezanih za terapije karcinoma dojke, istovremeno su potrebne tačne prognostičke informacije na osnovu kojih bi se donosile odluke o tretiranju svakog pacijenta (Elston i Ellis, 1991). Adjuvantna sistemska terapija koristi se kako bi došlo do uklanjanja mogućih udaljenih mikrometastaza, nakon operacije primarnog tumora. Ovakva vrsta terapije sa sobom nosi i izvesne rizike, tako da je neophodno utvrditi koji su pacijenti sa najvećom koristi od njene primene. Prognostički faktori mogu izdvojiti pacijente kod kojih može doći do pojave udaljenih metastaza, tako da bi imali najviše koristi od terapije (Cianfrocca i Goldstein, 2004). Drugim rečima, prognostički faktori daju informaciju o toku bolesti, ukazuju na rizik od ponovnog javljanja bolesti ili fatalnog ishoda u odsustvu adjuvantne sistemske terapije (Duffy, 2005). Prognostički faktor daje informaciju o prirodnom toku bolesti i povezan je brzinom rasta tumora i metastatskim potencijalom (Hayes i sar, 1998). Može se izdvojiti više razloga zašto je neophodno imati dobar prognostički faktor. Prvi bi bio identifikacija pacijenta sa dobrom prognozom kod kojeg adjuvantna sistemska terapija ne donosi dovoljno koristi u odnosu na štetnost nje same. Drugi bi bio pronalaženje pacijenata sa lošom prognozom kod kojih je potrebno pristupiti agresivnijom terapijom, i na kraju treći gde bi trebalo pronaći novi oblik terapije (Cianfrocca i Goldstein, 2004).

Prediktivni markeri se mogu definisati kao faktori koji ukazuju na senzitivnost, kao i na rezistenciju na određenu terapiju. Usled postojanja različitih terapija i heterogenosti tumora izvestan broj pacijenata neće reagovati na terapiju, tj. dolazi do pojave udaljenih metastaza (Hortobaggi, 1998; Duffy, 2005).

Klasične kliničko-patološke parametre možemo podeliti na parametre nosioca tumora: godine i status menopauze i parametre tumora: zahvaćenost limfnih čvorova malignim ćelijama, veličina tumora, histološki tip i gradus.

### **I.2.2. Zahvaćenost limfnih čvorova malignim ćelijama**

Najznačajniji nezavisni prognostički faktor kod karcinoma dojke je zahvaćenost limfnih čvorova malignim ćelijama. Postoji direktna veza između broja zahvaćenih limfnih čvorova i rizika od pojave udaljenih metastaza (Saez isar, 1989; Nemoto i sar, 1978). Kod 20-25% pacijenata bez zahvaćenih limfnih čvorova dolazi do pojave udaljenih metastaza tokom perioda od 10 godina od primarnog tretmana. Za razliku od toga, kod pacijenata sa metastazama u limfnim čvorovima dolazi do pojave udaljenih metastaza u 75% slučajeva u istom periodu (Fisher i sar, 1976; Fisher i sar, 1984). Zahvaćenost limfnih čvorova ukazuje na metastatski potencijal tumora i neophodnost adjuvantne terapije (Russo i sar, 1988).

### **I.2.3. Veličina tumora**

Veličina tumora predstavlja funkciju brzine i vremena rasta tumora, što je neposredno povezano sa kapacitetom metastaziranja. Direktna veza se može pronaći između veličine tumora i verovatnoće da limfni čvorovi sadrže metastaze (Donegan, 1992). Svoju značajnost kao prognostički parametar veličina tumora pokazuje i nezavisno, u grupi bez metastaza u limfnim čvorovima (McGuire, 1986; Ciatto, 1990). Ta nezavisnost veličine tumora sugeriše da postoje alternativni limfatični i nelimfatični putevi diseminacija, kao što je vaskularni sistem (Donegan, 1992). Ono što treba svakako naglasiti jeste da tumori iste veličine ne moraju imati istu agresivnost, brzinu rasta i proliferativne karakteristike malignih ćelija (Stoll, 1986; Harris i Henderson, 1987). Veličina tumora samostalno ili u kombinaciji sa drugim prognostičkim parametrima utiče na izbor adjuvantne sistemske terapije.

### **I.2.4. Histopatološki gradus tumora**

Morfološka procena histoloških karakteristika tumora koji čine gradus daje informacije koje poboljšavaju prognozu pacijenta (Roberti, 1997). Najčešći način određivanja gradusa je Scarff-Bloom-Richardson-ovim sistemom klasifikacije (Bloom i Richardson, 1957). Histološki gradus čine dve različite, međusobno nezavisne osobine maligne ćelije, proliferativnost i diferentovanost (Stenkvis, 1986). Proliferativnost je izražena brojem ćelija u mitozima i hiperhromatizmom jedara, dok diferentovanost karakteriše sposobnost formiranja tubularnih struktura. Zajedno pokazuju invazivna svojstva tumora, ali i nezavisni ovi pokazatelji mogu imati prognostičku vrednost pri čemu odsustvo tubularnih struktura predstavlja izrazito nepovoljnu karakteristiku. (Stoll, 1986; Parl i Dupont, 1982). Prema ovim osobinama tumora razlikujemo tri histološka gradusa:

- Gradus I - tumori sa malignim ćelijama niske proliferativnosti i visoke diferentovanosti

- Gradus II – tumori sa malignim ćelijama niske proliferativnosti i niske diferentovanosti, i tumori sa ćelijama visoke proliferativnosti i visoke diferentovanosti
- Gradus III – tumori sa malignim ćelijama visoke proliferativnosti i niske diferentovanosti

### **I.2.5. Histopatološki tip tumora**

Najčešći način klasifikacije histološkog tipa invazivnih tumora je na duktalni i lobularni tip. Danas se zna da invazivni duktalni i invazivni lobularni karcinom potiču od terminalne duktalno-lobularne jedinice (Sainsbury i sar, 1994). Najzastupljeniji tipovi su upravo invazivni duktalni (50-80%) i invazivni lobularni, dok ostali predstavljaju retke oblike koji se ređe javljaju.

### **I.2.6. Godine i status menopauze pacijenta**

U parametre prognoze kancera dojke koje su karakteristike samog pacijenta spadaju godine i status menopauze. Postoje mnoge studije koje procenjuju uticaj godina na ishod bolesti i rezultati su uglavnom kontradiktorni (Pierce i sar, 1992; Fowble i sar, 1994). Određeni rezultati govore o lošijoj prognozi pacijentkinja mlađih od 35 godina (Albain i sar, 1994). Potrebno je uraditi nove studije o povezanosti godina i menstrualnog statusa, zajedno sa ostalim parametrima kako bi se došlo do daljih preciznijih informacija (Rutqvist, 1983; Stoll, 1986).

## **I.3. ESTROGENA ZAVISNOST KARCINOMA DOJKE**

Normalni razvoj dojke, kao i patološke promene usko su povezane sa nivoom i izloženošću steroidnim hormonima (Holland i Frei, 2000). Fiziološki gledano estrogeni imaju primarnu kontrolu u razvoju i patogenezi dojke. Estrogen je neophodan za razvoj duktalnog sistema, dok je progesteron značajan u razvoju lobula. Istraživanja ukazuju da preko 85% karcinoma dojke vodi poreklo od luminalnih epitelijalnih ćelija dojke (Clark i sar, 1994). Smatra se da je krajnji negativni efekat izlaganja luminalnih epitelijalnih ćelija estrogenima povećana ćelijska proliferacija (Bittner, 1947; Henderson i sar, 1988). Simultano prisustvo PR može samo ubrzati i povećati nivo proliferacije (Ferguson, 1981).

### **I.3.1. Steroidni hormoni**

Nivo steroidnih hormona kod žena dramatično varira tokom različitih perioda života. Etiologija karcinoma dojke ima jaku osnovu u menjanju nivoa hormona, pri čemu treba izdvojiti estrogene kao najpotentnije (Holland i Frei, 2000). Svi steroidni hormoni formiraju se od holesterola preko pregnenolona serijom reakcija koje se odvijaju u ovarijumu ili adrenalnom korteksu (Medappa i sar, 2003). Estrogeni hormoni obuhvataju estradiol, estron i estron-sulfat koji se bitno razlikuju po uticaju na odgovarajuća tkiva. Estradiol predstavlja najznačajniji endogeni estrogen, a glavni izvor ovoga hormona kod premenopauzalnih žena je ovarijum. Konverzija holesterola u pregnenolon vrši se pod uticajem luteinizirajućeg hormona (Medappa i sar, 2003). Kada su u pitanju postmenopauzalne žene, ili pacijentkinje kod kojih je došlo do kastracije, veći deo cirkulišućeg estradiola potiče od konverzije androstenediona (prekursora testosterona) u estron. Kod postmenopauzalnih žena androgeni (testosteron,

androstenedion, dehidroepiandrosteron i njegov sulfat) potiču od adrenalnog kompleksa (Miller, 1990). Veći deo enzimatske konverzije prekursora androstenediona u estron vrši se u perifernim tkivima kao što su masno tkivo, jetra, mišići i to preko enzima aromataze (Judd i sar, 1974). Enzim 17-hidroksi steroid dehidrogenaza dalje konvertuje estron u estradiol. Estron se takođe može konvertovati u estron-sulfat. Na taj način pravi se zaliha koja se može ponovo pretvoriti u estron pa u estradiol preko enzima sulfataze (Kirschner, 1982). Oko 40% estrona i 42% estradiola pretvara se u estron-sulfat koji je prisutan u najvećoj količini kod žena u postmenopauzi. Istraživanja karcinoma dojke pokazuju da je moguća sinteza estrogena i u samom tumorskom tkivu (Santen, 1986). Tome doprinose i tvrdnje da se estrogen produkuje putem intratumorske aromataze (Suzuki, 2002). Enzim sulfataza takođe je pronađen u tumorima dojke, čak i u većim količinama nego aromataza. (Santen, 1986).

### **I.3.2. ER i PR - značaj u prognozi i predikciji**

Kliničke studije su do danas nesumnjivo pokazale da u 50-85% kancera dojke postoji ER (McGuire i sar, 1975). PR se retko može pronaći u odsustvu ER (5% pacijenata) i obično je prisutan kada je i ER u višim koncentracijama (Donegan, 1992). Prvi nalazi gde je objavljena veza između ER i boljeg kliničkog toka bolesti objavljeni su 1977. godine. Pokazano je da je ponovno javljanje bolesti nakon mastektomije znatno odloženo kod ER bogatih tumora. Ovo smanjenje broja relapsa nezavisno je od statusa limfnih čvorova, godina i veličine tumora. Tokom prvih 18 meseci broj pojave metastaza kod ER-negativne podgrupe bio je dvostruko veći u odnosu na ER-pozitivnu podgrupu pacijenata.

Nakon toga studije koje su usledili davale su dosta kontradiktorne rezultate kada je u pitanju prognostička moć ER. Različite studije su ukazale da je prognostička moć ER ograničena vremenom, tj. da ER gubi prognostički značaj sa dužim periodom praćenjem pacijenata (Hahnell i sar, 1979; Daxenbicher i sar, 1988). Svojom studijom Halsenbeck i saradnici utvrdili su bolju prognozu kod ER-pozitivnih tumora tokom prvih 3 godine praćenja, ali ne i nakon toga (Hilsenbeck i sar, 1998). Jedno od objašnjenja je da prisustvo ER i PR ukazuje na tumor sa sporijim rastom i manjim metastatskim potencijalom. Veći broj studija govori o nepostojanju prognostičkog značaja ER i PR, pojedinačno (McGuire i sar, 1986; Kohail i sar, 1985), ili u združenom statusu (Saez i sar, 1983), dok je studija Stewart-a i saradnika dala suprotan rezultat (Stewart i sar, 1983).

Postoji čitav niz razloga zbog kojih studije daju ovakve rezultate. Prvi bi bili nedostatak interlaboratorijske standardizacije metoda koji se koriste za određivanje receptora, različito vreme praćenja, različite karakteristike pacijentkinja koje su uključene u studiju, kao i terapije koje su one dobijale. U analize koje se vrše sada, treba uzeti u obzir sve navedeno kao i uvid u ostale parametre prognoze. Takve analize pokazale bi koliki je stvarno potencijal prognostičkog faktora, tj. da li je on stvarno nezavisan i utiče na prognozu ili ostali parametri doprinose tome u većoj meri.

Kod molekularnih biomarkera, granična vrednost koja grupe deli na „pozitivne” i „negativne” u odnosu na ispitivani biomarker bitno utiče na prognozu. Kada su u pitanju receptori za estrogen i progesteron granična vrednost je arbitrarna i obuhvata širok opseg od 3 do 20 fmol/mg što u daljim analizama može dati različite rezultate (Mercer i sar, 1984). Iz svega možemo zaključiti da ER i PR imaju ograničen značaj kao prognostički faktori.

Nasuprot tome, ER i PR predstavljaju izrazito stabilne prediktivne biomarkere koji govore o uspehu endokrine terapije tamoksifenom. Kod pacijentkinja koje imaju ER-pozitivne tumore uspeh endokrine terapije zabeležen je u 60% slučajeva, a ako postoji pozitivna

vrednost za oba receptora 70-75% pacijentkinja dobro odgovara na terapiju. Samo 10% pacijentkinja sa ER-negativnim tumorima odgovara na antiestrogenu terapiju ( Brooks i sar, 1980). Verovatnoća uspeha ove terapije, kao i pozitivni status PR povećava se sa uvećanjem koncentracije ER (Gapinsky i sar, 1980). U velikoj studiji koja je obuhvatila 37000 žena pokazano je da adjuvantna terapija tamoksifenom od 5 godina dovodi do smanjenja rizika od ponovnog javljanja bolesti i smrti od 47% i 26%, respektivno, kod ER-pozitivnih pacijentkinja. Redukcija u mortalitetu bila je vrlo slična kod pacijentkinja sa zahvaćenim (N+) i bez zahvaćenih limfnih (N0) čvorova (EBCTCG, 1998). Bardou i saradnici, koristeći dve velike baze podataka, pokazali su da je kombinovano merenje ER i PR superiornije za predikciju odgovora na endokrinu terapiju nego korišćenje samo ER (Bardou i sar, 2003). Zbog svega izloženog receptori za estrogen i progesteron danas predstavljaju nezamenljive molekularne biomarkere u procesu odlučivanja o terapiji svakog pacijenta sa karcinomom dojke.

## I.4. STRUKTURA STEROIDNIH RECEPTORA

### I.4.1. Estrogeni receptor-struktura

Receptor za estrogen pripada superfamiliji nuklearnih receptora koji funkcionišu kao hormon-regulisani transkripcioni faktori (Smith, 1998). Posmatrajući strukturu ER mogu se izdvojiti šest funkcionalnih domena, označenih od A do F (Kumar i sar, 1988):

- Aminoterminalni, A/B domen, ima hormon nezavisnu aktivacionu funkciju (AF-1) i pokazuje najveću varijabilnost među steroidnim receptorima (Ribeiro i sar, 1995).
- Središnji C domen sastavljen je iz više delova sa različitim funkcijama. Tu se izdvaja DNK vezujući domen (DBD) koga čine dve strukture sa cinkom i koji u kombinaciji sa P-box-om ima glavnu ulogu u vezivanju ER za ERE (engl. estrogen response elements). On je takođe u kombinaciji sa D-box-om zadužen za dimerizaciju ER na ERE (Klein-Hitpass i sar, 1988).
- D-domen ili šarka region (engl. hinge), umešan je u vezivanje ko-regulatornih proteina.
- Karboksi-terminalni E i F domeni sadrže ligand-vezujući domen (LBD) i region koji učestvuje u moduliranju agonističke aktivnosti nesteroidnih antiestrogena, kao i mesta za vezivanje ko-regulatora (Montano i sar, 1995). Sam LBD sadrži ligand-zavisnu transkripcionu aktivacionu funkciju AF-2, hsp 90 vezujući region, nuklearni signal za lokalizaciju kao i drugi dimerizacionu region (Norris i sar, 1997; Chambraud i sar, 1990; Picard i Yamamoto, 1987; Peters i Khan, 1999).

Estrogen vrši svoju funkciju u ćelijama preko dve izoforme receptora za estrogen, ER $\alpha$  i ER $\beta$  (Matthews i Gustafsson, 2003). Kao dominantan u ćeliji javlja se ER $\alpha$  koji se i koristi kao molekularni biomarker. ER $\alpha$  i ER $\beta$  predstavljaju produkte različitih gena na hromozomima 6 i 14, respektivno (Emnark i sar, 1997). Iako postoji veliki stepen homologije među ovim receptorima, postoje izvesne razlike u afinitetu ka estrogenu i novim ligandima, zatim različite ekspresije u tkivima (Kuiper i sar, 1998; Matthews i Gustafsson, 2003).

#### **I.4.2. Progesteronski receptor-struktura**

PR spada u grupu steroidnih receptora koji deluju kao transkripcioni faktori, pri čemu je njegova ekspresija regulisana od strane ER (Conneely i sar, 2003). Može se pronaći u obliku PR-A i PR-B koji predstavljaju izoforme nastale od istog gena (Kraus i sar, 1993). Slično kao i ER, PR sadrži DBD, LBD i mnogobrojne aktivacione funkcije (Li i sar, 2004). PR je neophodan za lobuloalveolarni razvoj, dok je odnos njegovih izoformi od značaja za celokupni razvoj mlečne žlezde (Lydon i sar, 1996; Shyamala i sar, 2000). Izoforma B specifična je jer sadrži dodatni fragment na aminoterminalnom regionu koji je veličine 164 aminokiselina (Carson-Jurica i sar, 1990). Takođe se može reći da odnos ovih izoformi u specifičnim ćelijskim tipovima definiše fiziološki i farmakološki odgovor na progesteron (Wen i sar, 1994).

### **I.5. MEHANIZAM DEJSTVA ER**

ER predstavlja ligand-zavisni nuklearni transkripcioni faktor koji može indukovati ekspresiju više različitih gena. Mehanizam njegovog dejstva je veoma kompleksan, tako da danas možemo razlikovati više puteva njegovog delovanja. Izdvajamo genomski put ili NISS (skraćeno od engl. nuclear-initiated steroid signaling) u okviru koga razlikujemo klasičan i neklasičan način delovanja, dok je drugi negenomski put ili MISS (skraćeno od engl. membrane-initiated steroid signaling) (Nemere i sar, 2003). Pored toga kao jedan od genomskih načina delovanja ER je i preko njegove ligand-nezavisne aktivacije (Schiff i sar, 2004).

#### **I.5.1. Klasičan način delovanja estrogenog receptora**

Prema klasičnom modelu delovanja nuklearni ER se aktivira estrogenom pri čemu dolazi do niza promena. Vezivanjem estrogena dolazi do konformacionih promena samog receptora koje dovode do njegove dimerizacije, zatim disocijacije šaperona kao što su hsp70 i 90, povezivanja ko-regulatornih proteina i povećanja fosforilacije receptora. (Pike i sar, 1999; Chambraud i sar, 1990). Date asocijacije zavise od konformacije receptora i relativne dostupnosti kofaktora, koje mogu varirati u zavisnosti od ćelijskog tipa. Nakon toga dolazi do vezivanja za ERE (eng. estrogen response element). Posle vezivanja, određene komponente kompleksa receptor-ligand-kofaktor interaguju sa bazalnom transkripcionom mašinerijom, stimulišući ili inhibirajući transkripciju (McKenna i sar, 1999; Klein-Hitpass i sar, 1988). Neki od gena stimulisanih ovakvim dejstvom ER su PR, IGFR, ciklin D1 i vaskularno endotelijalni faktor rasta (VEGF) (Klinge, 2001; Osborne i Schiff, 2005).

#### **I.5.2. Neklasičan način delovanja estrogenog receptora**

Neklasičan model delovanja ER takođe zavisi od estrogena, pri čemu nakon vezivanja dolazi do istih konformacionih promena kao kod klasičnog modela. Ali za razliku od klasičnog delovanja vezivanje estrogena za receptor ne dovodi do direktnog vezivanja za ERE već do interakcije sa drugim transkripcionim faktorima kao što su AP-1. Sp-1 i NF- $\kappa$ B (Cerillo i sar, 1998; Porter i sar, 1997). Na ovaj način sam ER može funkcionisati kao koaktivator stabilizujući vezivanje drugih kompleksa transkripcionih





faktora za DNK, ujedno aktivirajući i druge koaktivatore. ER kroz ovaj proces utiče na transkripcionu aktivnost gena koji ne sadrže ERE (Sommer i Fuqua, 2001).

### **I.5.3. Ligand-nezavisno delovanje estrogenog receptora**

Pored estrogena postoje nekoliko drugih stimulusa koji mogu povećati nuklearno delovanje ER. Jedan od načina aktivacije jeste fosforilacija ER i njegovih koregulatora na specifičnim mestima putem faktora rasta i različitih kinaza (Schiff i sar, 2004). Neke od kinaza koje fosforilišu ER su ERK  $\frac{1}{2}$  (engl. extracellular regulated kinase), p38 MAPKs (engl. mitogen-activated protein kinase), CDK-2,7 (engl. cyclin-dependent kinase), c-SRC, protein kinase A i AKT (Kato i sar, 1995; Le Goff, 1994; Xiaojiang i sar, 2005). Fosforilacija ER na poziciji Ser 104, 106, 118 i 167 povećava transaktivacionu i transkripcionu aktivnost koja potiče od ligand-nezavisnog AF-1 domena (Le Goff i sar, 1994). Dimerizacija i DNK vezivanje regulisano je fosforilacijom na mestu serina 236 u DBD (Chen i sar, 1999). Pored toga možemo izdvojiti i fosforilaciju na mestu treonina 311 preko MAPK, što dalje dovodi do nuklearne lokalizacije ER i interakcije sa koaktivatorima (Lee i sar, 2002).

### **I.5.4. Negenomski put delovanja ER**

Praćenjem mehanizma dejstva ER utvrđeno je da pored nuklearnog delovanja postoji i veoma brzo delovanje estrogena koje se dešava u okviru nekoliko minuta, mnogo pre efekta na transkripciju gena (Levin, 1999). To je ukazivalo na drugi mehanizam delovanja ER, koji se danas zove negenomski ili membranski način delovanja (MISS). U više nezavisnih eksperimenata utvrđeno je postojanje manje količine ER lokalizovane blizu plazma membrane i u citoplazmi (Li i sar, 2003). Predpostavke su da je ovo forma nastala alternativnom obradom ER i kao takva je kraća forma samog receptora. Ne-nuklearna lokalizacija ER dokazana je i biohemijskim frakcionisanjem membrane i imunocitohemijom (Razandi i sar, 1999; Pappas i sar, 1995).

Mehanizmi delovanja membranskog ER se polako razjašnjavaju. Utvrđeno je postojanje direktnih veza između membranskog ER i molekula kao što su IGFR, fosfoinozitol-3-kinaza PI3K, Src i Shc-protein koji može uspostaviti povezivanje sa receptorima faktora rasta koji imaju tirozin kinaznu aktivnost (Kahlert i sar, 2000; Simoncini i sar, 2000; Castoria i sar, 2001). Aktivacija ovih puteva šalje jak signal za ćelijsko preživljavanje i proliferaciju preko Akt i MAPK. Ove kinaze mogu ujedno i fosforilisati nuklearni ER i njegove koregulatora i tako povećati njegovo genomsko delovanje. Pored toga, fosforilacija ER i koregulatora može dovesti do povećanja agonističkog delovanja tamoksifena i na taj način rezistencije (Shou i sar, 2004).

Još jedan način delovanja membranskog ER je putem interakcije sa receptorima faktora rasta. Membranski ER se može vezati za kaveolin 1 u ćelijskoj membrani i kao odgovor na vezivanje estrogena ili tamoksifena, direktno ili indirektno, aktivirati G proteine. Zatim bi delovanjem c-Src bile aktivirane matriksne metaloproteinaze koje seku heparin-vezani epidermalni faktor rasta (EGF). Na taj način bi se EGF vezao za svoj receptor iz familije Her, što bi ga aktiviralo i time bi se pokrenuo nishodni put kinaza koji uključuje ERK  $\frac{1}{2}$ , MAPK i Akt. Kinaze zatim mogu ponovo fosforilisati nuklearni ER, koji onda utiče na transkripciju različitih gena, između ostalog i receptora faktora rasta čime se zatvara ceo krug delovanja ER (Osborne i Schiff, 2005; Schiff i sar, 2005; Shou i sar, 2004; Levin i sar, 2001).

## I.6. TAMOKSIFEN

Endokrine terapije, prvi put korišćene pre više od 100 godina, predstavljaju najefektivniji način lečenja karcinoma dojke sa pozitivnim statusom estrogenog receptora (Osborne i Schiff, 2005). Još 1896. godine Beatson je pokazao da pacijenti sa neoperabilnim tumorom dojke često povoljno odgovaraju na bilateralno uklanjanje ovarijuma. To je ukazalo na značaj povezanosti estrogena i karcinoma dojke i obeležilo početak puta ka formiranju modernih strategija u lečenju ove bolesti, gde endokrina terapija zauzima centralnu poziciju (Schiff i sar, 2005). Mnogobrojna bazična, eksperimentalna i klinička istraživanja koja su vršena proteklih 50 godina bazirala su se na terapijskom potencijalu i aktivnosti ER kao ligand-zavisnog transkripcionog faktora (Schiff i sar, 2005). Upravo zbog toga antiestrogena terapija je išla u pravcu dobijanja supstanci koje mogu blokirati funkcionisanje ER.

Antiestrogeni se mogu podeliti na dve klase prema njihovoj hemijskoj strukturi i različitom funkcionisanju u tkivima, tako da izdvajamo steroidne i nesteroidne antiestrogene. Steroidni antiestrogeni, kao što je fulvestrant, deluju kao čisti antiestrogeni, bez bilo kakve agonističke aktivnosti. Za razliku od njih tamoksifen i raloksifen predstavljaju nesteroidne antiestrogene koji su parcijalni antiestrogeni, tj. imaju funkciju estrogena u jednim tkivima, dok u drugim deluju kao antiestrogeni. Ovakva selektivna aktivnost najčešće se ispoljava tako što postoji funkcija estrogena u kostima i kardiovaskularnom sistemu, a antiestrogena aktivnost je zadržana u dojci u uterusu. Takve supstance zovu se još i selektivni ER modulatori (SERM) (Sommer i Fuqua, 2001).

Tamoksifen je trenutno najšire korišćeni antiestrogen u lečenju karcinoma dojke (Jaiyesimi i sar, 1995). Hemijski gledano tamoksifen je *trans*-izomer derivata trifeniletilena (Dhingra, 1999). *Trans*-izomer se koristi iz razloga što poseduje mnogo veći afinitet ka ER nego *cis*-izomer (Langan i sar, 1994). Glavni metaboliti tamoksifena kod čoveka su N-dezmetiltamoksifen i *trans*-4-hidroksitamoksifen, pri čemu poslednji ima isti afinitet ka ER kao estradiol (Buckley i Goa, 1989). Dnevna doza tamoksifena je 20mg i u serumu se može detektovati nekoliko nedelja nakon uzimanja, dok se izvesne koncentracije mogu pronaći u tumorima i posle par meseci (Lien i sar, 1991; Sunderland i Osborne, 1991). Završna obrada metabolita tamoksifena vrši se u jetri. Antitumorski efekat tamoksifena zasniva se na kompetitivnoj inhibiciji vezivanja estrogena za ER (Osborne i sar, 1996). Posledica toga je inhibiranje ekspresije estrogen regulisanih gena. Njih čine angiogenezni faktori i faktori rasta koji doprinose rastu tumora na autokrin ili parakrin način (Arteaga i Osborne, 1991). Krajnji rezultat je zaustavljanje ćelije u G1 fazi ćelijskog ciklusa i usporavanje proliferacije. Time se postiže regresija tumora usled izmenjene ravnoteže između procesa ćelijske proliferacije i apoptoze. Takođe je dokumentovano da tamoksifen dovodi i do indukcije apoptoze (Ellis i sar, 1997). Pozitivni efekti delovanja tamoksifena dokazani su u mnogim studijama, ali može se izdvojiti EBCTCG (engl. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) sa sledećim zaključcima (EBCTCG, 1998):

- Adjuvantna terapija tamoksifenom u trajanju od 5 godina smanjuje rizik od pojave metastaza preko 42%.
- Tretman tamoksifenom od 5 godina superiorniji je od skraćenog tretmana od 2 godine.
- Tretman je efikasan kod postmenopausalnih pacijentkinja.
- Neefikasan je kod pacijentkinja sa odsustvom ER u tumorima.

Međutim, pored pozitivnog delovanja, tamoksifen ispoljava i neželjena dejstva. Tamoksifen, kao selektivni antiestrogen, ostvaruje svoje antiestrogeno dejstvo u dojci, dok estrogeni efekat ima u uterusu, kardio-vasularnom sistemu i kostima (Fuqua, 2000). Postoje više mehanizama koji objašnjavaju njegovo selektivno dejstvo. Prvi mehanizam zasnovan je na selektivnoj inhibiciji AF-2 regiona ER. Tako u ćelijama u kojima je AF-2 neophodna za aktivnost ER tamoksifen deluje kao antagonist, dok u tkivima gde je AF-1 region dovoljan za funkcionalnu aktivnost ER, on će delovati kao agonist. U drugi mehanizam spadaju konformacione promene LBD ER, koje se dešavaju nakon vezivanja liganda, kao i dostupnost koregulatornih proteina u različitim tkivima (Sommer i Fuqua, 2001). Tako povećana ekspresija koaktivatora SRC-1 dovodi do agonističke aktivnosti tamoksifena (Smith i sar, 1997), dok povećana ekspresija korepresora NCoR i SMRT smanjuje agonističku aktivnost (Jackson i sar, 1997).

Pozitivno dejstvo tamoksifena ne ogleda se samo u lečenju karcinoma dojke. Preko svog estrogenog dejstva, tamoksifen snižava nivo totalnog holesterola i lipoproteina niske gustine (LDL) (Williams i sar, 1997), dok kod postmenopausalnih pacijentkinja povećava gustinu kostiju (Love i sar, 1992). Kao nepovoljne pojave primene tamoksifena, tj. njegovog dejstva kao estrogena, javljaju se tromboembolije (Nevassari i sar, 1978), 60% veća incidenca pojave katarakte koja zahteva operaciju (Fisher i sar, 1998) i povećan broj slučajeva kancera endometrijuma, posebno kod žena u postmenopauzi (Terashima i sar, 1999). I pored toga smanjenje incidence kontralateralnog kancera dojke dva puta je veće od uvećanja incidence endometrijalnog kancera (EBCTCG, 1998).

Danas dolazi do stvaranja novih strategija u endokrinom lečenju karcinoma dojke upotrebom supstanci kao što su fulvestrant (Faslodex) koji vezuje i vrši degradaciju ER. Fulvestrant je primer čistog antiestrogena koji nema agonističkog delovanja u tkivima (Morris C i Wakeling, 2002). Inhibitori aromataze nove generacije, koji smanjuju nivo estrogena inhibirajući aromatazu u različitim tkivima, se već uspešno upotrebljavaju i osporavaju upotrebu tamoksifena kao primarne endokrine terapije kod postmenopausalnih pacijentkinja (Winer i sar, 2002).

### **1.6.1. Rezistencija na primenu tamoksifena**

Efikasnost endokrine terapije kod pacijentkinja sa ER-pozitivnim tumorima danas je dobro poznata, tako da se ova vrsta terapije koristi kao adjuvantna terapija i terapija kod metastatske bolesti (Kurebayashi, 2005). Pored velikih dostignuća endokrine terapije u lečenju karcinoma dojke, njena primena je dosta umanjena ranom (*de novo*) i kasnom (stečenom) rezistencijom (Schiff i sar, 2004). Samo 50% ER-pozitivnih tumora odgovaraju na prvu prezentaciju tamoksifena, što bi značilo da kod polovine pacijentkinja dolazi do *de novo* rezistencije po primanju terapije. Kod značajnog broja pacijentkinja koje prvobitno odgovaraju na terapiju, u kasnijem praćenju dolazi do progresije bolesti, tj. pojave udaljenih metastaza što bi odgovaralo stečenoj rezistenciji (Massarweh i Schiff, 2006; Schiff i sar, 2004). Kada govorimo o *de novo* i stečenoj rezistenciji, pre svega ostalog ima se u vidu vremenska dimenzija njihove pojave. Mehanizmi koji dovode do ponovnog javljanja bolesti u velikoj meri mogu biti odgovorni za pojavu oba tipa rezistencije.

Date mehanizme pojave rezistencije možemo podeliti na tri kategorije: 1) redukcija ili gubitak ekspresije ER, 2) disfunkcija signalnih puteva ER i 3) ligand-nezavisna aktivacija ER (Kurebayashi, 2005).

## **1. Redukcija ili gubitak ekspresije ER**

Endokrina terapija tamoksifenom odgovarajuća je samo za pacijente sa ER-pozitivnim tumorima, dok je verovatnoća odgovora na terapiju kod pacijenata sa ER-negativnim tumorima veoma mala. Ukoliko dođe do gubitka ekspresije ER u toku terapije, takvi tumori brzo postaju rezistentni (Kurebayashi, 2005). Potencijalni mehanizmi gubitka ER još uvek nisu u potpunosti poznati, ali se smatra da bi povećanje ekspresije receptora faktora rasta moglo biti jedan od uzroka (Massarweh i Schiff, 2006). Pored toga, neke od studija pokazuju da se povećani nivo receptora faktora rasta može javiti za vreme progresije karcinoma dojke i izazvati gubitak ekspresije ER i stečenu rezistenciju (Stoica i sar, 1997; Stoica i sar, 2000; Stoica i sar, 2000.). Na taj način signalni putevi preko molekula kao p42/44 MAPK, NF $\kappa$ B snižavaju nivo ER (Holloway i sar, 2004). Dakle, slični mehanizmi mogu delovati u ranoj i kasnoj rezistenciji na terapiju tamoksifenom.

### **a) Klonalna selekcija**

Veruje se da je estrogen zavisan karcinom dojke mozaične strukture, tj. da je sastavljen od estrogen senzitivnih i nesenzitivnih ćelijskih klonova. Ovakva struktura karcinoma dovodi do odgovora na terapiju tamoksifenom samo u slučaju estrogen senzitivnih ćelija, koje nestaju pod tretmanom. Pri tome nesenzitivni klonovi zaostaju, postaju dominantni i dovode do rezistencije (Sonoo i sar, 1999; Kurebayashi, 2005).

### **b) Smanjenje produkcije ER**

Hipermetilacija promotornog regiona gena ER dovodi do smanjene transkripcije što ima za posledicu redukciju ili potpuno odsustvo ER (Lapidus i sar, 1998).

### **c) Degradacija ER u hipoksičnim uslovima**

Primećeno je da kod karcinoma dojke postoji obrnuta proporcija između nivoa ekspresije ER i hipoksija-indukovanog faktora (HIF)-1 $\alpha$ , kao i da hipoksični uslovi dovode do negativne regulacije ER i njegove funkcije (Kurebayashi i sar, 2001). Istraživanja su pokazala da u hipoksičnim uslovima dolazi do smanjenja ekspresije ER usled toga što HIF-1 $\alpha$  indukuje proteozomalno zavisnu degradaciju ER (Stoner i sar, 2002). Jedno od mogućih objašnjenja je da hipoksična mikrosredina, koja je uzrokovana povećanjem veličine tumora ili hormonima, omogućava selektivni pritisak za rast agresivnijih klonova sa malim sadržajem ER čime bi na kraju došlo do potpunog gubitka ER iz populacije kancerskih ćelija (Kurebayashi, 2005). Iako je gubitak ER u ER-pozitivnim tumorima razlog za nastanak rezistencije, neke studije ukazuju da većina antiestrogen-rezistentnih karcinoma dojke zadržava ekspresiju ER (Johnston i sar, 1995). Ova otkrića pokazuju da redukcija ili gubitak ekspresije ER nije i dominantni razlog rezistencije.

## **2. Disfunkcija signalnih puteva ER**

Skorašnje studije potvrđuju da kvalitativne i kvantitativne promene kofaktora, koji su proteini neophodni za aktivnost ER ili njegovu inhibiciju, imaju bitan uticaj na razvoj endokrine rezistencije (Shibata i sar, 1997).

### **a) Kvantitativne promene kofaktora**

Kofaktori imaju sposobnost aktivacije ER ili njegove inhibicije. Nedavnim studijama utvrđeno je da povišeni nivoi koaktivatora SRC-1 i SRC-3 (A1B1) povećavaju agonističku aktivnost tamoksifena i mogu dovesti do rezistencije (Osborne i sar, 2003; Smith i sar, 1997). Pored toga oba koaktivatora pozitivno korelišu sa Her2 (Fleming i sar, 2004). Na

mišijem modelu je dokazano da je nivo jednog od najvažnijih korepresora NCoR-1 značajno smanjen u tamoksifen rezistentnim tumorima (Lavinsky i sar, 1998).

### **3. Ligand-nezavisna aktivacija ER**

Kao što je poznato, za delovanje ER potrebno je da dodje do vezivanja liganda, tj. estrogena. Pored ovog, klasičnog delovanja, ER se može aktivirati i bez liganda putem fosforilacije različitih mesta na proteinu (Osborne i sar, 2001).

#### **a) Povišena ekspresija EGFR ili Her2 - interakcija signalnih puteva**

Međusobni odnosi receptora za steroidne hormone i receptora faktora rasta mnogo su kompleksniji nego što se u početku mislilo i upravo promene u interakcijama ovih molekula čine osnovu za progresiju malignog fenotipa i nastanak rezistencije. Intenzivna dešavanja između ovih proteina su bidirekciona tako da putevi ER utiču na puteve faktora rasta i obrnuto (Nicholson i sar, 1999). EGFR i Her2 predstavljaju članove familije receptora epidermalnog faktora rasta. Za aktivnost EGFR neophodno je da dođe do vezivanja epidermalnog faktora rasta (EGF), a nakon toga i do homo- ili heterodimerizacije sa drugim receptorom iz iste familije kako bi se aktivirala tirozin kinazna aktivnost receptora (Dankort i Land Muller, 2000). Her2 ne zahteva vezivanje liganda već direktno dimerizuje sa drugim receptorom. Aktivacija EGFR/Her2 započinje signalnu kaskadu koja ima raznovrstan efekat na ćelije tumora, uključujući stimulaciju proliferacije, povećanu invazivnost i ćelijsku pokretljivost, kao i indukciju angiogeneze. Na preživljavanje ćelija i proliferaciju najviše utiču fosfatidilinozitol-3-kinazni (PI3K/Akt) i ERK1/2 MAPK put (Osborne i sar, 2005). PI3K/Akt fosforiliše ER na mestu serina 167 i dovodi do ligand nezavisne aktivacije (Campbell i sar, 2001).

Kao još jedan put koji započinje preko EGFR/Her2 je Ras/Raf/Mek/ERK1/2, pri čemu se završava fosforilacijom ER na mestu serina 118 i tako dovodi ponovo do ligand-nezavisne aktivacije (Bunone i sar, 1996).

Pored toga već opisani negenomski put delovanja ER može dovesti do aktiviranja EGFR/Her2 i njihovih signalnih puteva koji se završavaju na identičan način, između ostalog fosforilacijom ER.

#### **b) Mutacije gena za ER**

Jedna od mutacija koja je dokazana odnosi se na zamenu tirozina 537 u ligand vezujućem regionu. Ova substitucija zajedno sa koaktivatorima može dovesti do ligand-nezavisne aktivacije ER (White i sar, 1997). Uprkos tome, većina studija danas pokazuje da samo 1% primarnih karcinoma dojke nosi mutaciju u kodirajućem regionu ER, pri čemu većina njih ne rezultuje promenama na proteinskom nivou (Roodi i sar, 1995). Uticaj mutacija na rezistenciju je zbog toga veoma mali.

Pored ovih, javlja se jedan tip rezistencije koji se može izdvojiti po specifičnosti. To je metabolička rezistencija. Aktivacija tamoksifena odvija se preko demetilacije u N-dezmetiltamoksifen, i na kraju u metabolit endoksifen (Jin i sar, 2005). Metabolička aktivacija je od velike važnosti za tamoksifen, kako bi on stekao antiestrogenu i antitumorsku aktivnost (Jordan i O'Malley, 2007). Samu konverziju tamoksifena vrši citohrom P450 enzim 2D6 (CYP2D6). Međutim pokazano je da postoje varijacije CYP2D6 enzima u populaciji koje mogu uticati na metabolizam i konverziju leka. Pretpostavlja se da oko 10% populacije ima varijaciju enzima koja onemogućava konverziju tamoksifena, što se zatim ispoljava neuspehom terapije (Jordan i O'Malley, 2007). Po nekim podacima kod pacijentkinja dolazi samo do smanjene aktivnosti CYP2D6 i umanjenog efekta tamoksifena (Smith isar, 2005).

---

Kao najznačajniji mehanizam rezistencije javlja se međusobna interakcija signalnih puteva koja dovodi do *de novo* i stečene rezistencije (Knowlden i sar, 2003). Stečena rezistencija se može definisati kao adaptivni odgovor ćelija karcinoma dojke na terapiju tamoksifenom (Kurebayashi, 2005). I pored toga mehanizmi kao što su klonalna selekcija, ligand-nezavisna aktivacija, negenomski put i promene u kofaktorima imaju podjednako važnu ulogu u uspostavljanju stečene kao i *de novo* rezistencije. Zbog heterogenosti tumora razumevanje signalnih puteva maligne ćelije je od vitalnog značaja za otkrivanje novih prediktivnih markera koji bi mogli ukazati na rezistenciju. Neke od novih terapija koje pokazuju uspeh su inhibitori aromataza (Boccardo i sar, 2001), trastuzumab za inhibiciju Her2 (Argiris i sar, 2004) i gefitinib koji inhibira EGFR (Osborne i sar, 2005).

## **I.7. BIOMARKERI OD ZNAČAJA ZA PROCESSE PROLIFERACIJE, INVAZIJE I ANGIOGENEZE**

### **I.7.1. Her2**

Gen za humani epidermalni receptor faktora rasta 2 (Her2) lokalizovan je na hromozomu 17. On kodira transmembranski receptor sa tirozin kinaznom aktivnošću koji pripada familiji receptora epidermalnih faktora rasta (EGFR ili Her), kojoj pripadaju i EGFR (Her1), Her3 i Her4 (Stern i sar, 1986). Ova familija receptora uključena je u procese interćelijske i ćelija-stroma komunikacije, primarno preko procesa signalne transdukcije. U datom procesu faktori rasta, tj. ligandi, dovode do transkripcije gena preko procesa fosforilacije i defosforilacije serije transmembranskih proteina i intraćelijskih signalnih intermedijera od kojih mnogi poseduju enzimatsku aktivnost (Karunagaran i sar, 1996). Glavni putevi uključeni u signalnu transdukciju su Ras/MAPK i PI3K/Akt put. Svojim delovanjem oni bitno utiču na ćelijsku proliferaciju, preživljavanje, pokretljivost i adheziju (Ross i sar, 2003).

Aktivacija receptora zahteva prisustvo liganda, ali takođe i dimerizacionog partnera (Yarden i Sliwkowski, 2001). Nakon vezivanja liganda neophodno je da receptor interaguje sa drugim receptorom iste ili slične strukture da bi došlo do dimerizacije, zatim međusobne fosforilacije receptora i aktiviranja signalne kaskade. Sam proces dimerizacije se može odvijati sa istim (homodimerizacija) ili drugim članom familije receptora (heterodimerizacija). Veliki broj liganda i intraćelijska povezanost omogućava izrazitu raznovrsnost signalnih puteva. U slučaju Her2 proteina još nije poznat ligand, ali on predstavlja glavni dimerizacioni partner ostalim receptorima faktora rasta. Kao jedan od mogućih liganda Her2 identifikovan je heregulin, što se bazira na njegovoj sposobnosti da izazove fosforilaciju tirozina nakon vezivanja za receptor (Holmes i sar, 1992; Peles i sar, 1992). Ali proučavanjem se ipak došlo do zaključka da se heregulin vezuje ne za Her2 već za neki od drugih receptora iz Her familije, tj. Her3 ili Her4. Posle toga dolazi do heterodimerizacije sa Her2 nakon čega on ispoljava svoju funkciju (Carraway i sar, 1994; Plowman i sar, 1993). Heterodimeri sa Her2 proteinom su mnogo stabilniji nego bez njega (Karunagaran i sar, 1996).

Amplifikacija gena Her2 prisutna je u 10-34% karcinoma dojke (Stern i sar, 1986). Dokazano je prisustvo značajne korelacije između amplifikacije gena, povećanja transkripcije i nivoa proteina (Tubbs i sar, 2001). Takođe je usvojeno da je amplifikacija gena najčešći uzrok povišene ekspresije proteina (Dowsett i sar, 2000). Pored toga kao jedan od bitnih događaja vezan za Her2 jeste i aneuploidija hromozoma 17, koja se javlja u 4-25% slučajeva karcinoma dojke, ali njen značaj nije jasno definisan (Dressler i Thor,

2000). Downs-Kelly i saradnici objavljuju 2005. godine da aneuploidija hromozoma 17 bez amplifikacije odgovarajućeg gena nema značajniji biološki efekat za ekspresiju gena (Down-Kelly i sar, 2005).

Kada su u pitanju genetičke promene karcinoma dojke, status amplifikacije Her2 gena značajan je i sa kliničkog stanovišta, ali i posle godina istraživanja rezultati su dosta kontradiktorni. Her2 je obično definisan kao slab prognostički i prediktivni marker (Hayes i Thor, 2002). Ipak brojne studije govore da pozitivan status amplifikacije ukazuje na agresivniji fenotip karcinoma dojke, loš klinički tok bolesti i rezistenciju na terapiju tamoksifenom (Clark i McGuire, 1991). Godine 1987. amplifikacija Her2 gena je prvi put povezana sa kraćim vremenom preživljavanja kod pacijentkinja sa regionalnim metastazama (Slamon i sar, 1987). I druge studije govore o statusu Her2 kao nezavisnom prognostičkom faktoru kod pacijentkinja sa zahvaćenim limfnim čvorovima malignim ćelijama (Seshadri i sar, 1993).

Pored značajnog interesa u proučavanju Her2 kao prognostičkog parametra, danas je utvrđeno da Her2 može predstavljati i bitan prediktivan faktor za određene tipove terapije. Zbog povezanosti signalnih puteva ER i Her2, postoji veliki broj studija koji dovodi u vezu amplifikaciju Her2 sa pojavom rezistencije na tamoksifen (Newby i sar, 1997; Carlomagno i sar, 1996). Trastuzumab (Herceptin) je monoklonalno antitelo koje je razvijeno da specifično vezuje ekstraćelijski deo Her2 proteina (Ross i sar, 2003). Upotreba ovog antitela danas je ograničena na pacijentkinje kod kojih je došlo do pojave udaljenih metastaza, ali se takođe proučava njegovo dejstvo u adjuvantnom i neoadjuvantnom tretmanu (Hortobagyi, 2001). Prisustvo Her2 amplifikacije, tj. povišene ekspresije proteina je stoga dobar pokazatelj, prediktor za primenu terapije trastuzumabom.

### **1.7.2. Proliferativni i apoptotski indeks**

Normalan razvoj dojke kontrolisan je postojanjem balansa između proliferacije i apoptoze, a postoje i jaki dokazi da je rast tumora indukovano nekontrolisanom, povećanom proliferacijom i redukovanom apoptozom. Odnos ova dva procesa je od presudnog značaja u određivanju rasta i regresije tumora kao odgovor na različite tipove terapije (Reed, 1999; Tamm i sar, 2001). Razdvajanjem biologije tumora na molekularnom nivou kroz procese proliferacije i apoptoze i razumevanjem njihovih međusobnih odnosa može se odrediti oblik terapije koji bi bio najuspešniji (Parton i sar, 2001).

Nivo proliferacije pruža informacije o prognozi i agresivnosti individualnih karcinoma i predstavlja koristan pokazatelj u kliničkoj praksi. Imunohistohemija je jedna od metoda koja se koristi za određivanje nivoa proliferacije, detektovanjem antigena koji ukazuju na proliferaciju (Beresford i sar, 2006). Danas je u najvećoj upotrebi merenje nivoa Ki-67 proteina koji je eksprimiran u nukleusu za vreme ćelijskog ciklusa (Gerdes i sar, 1991). Ćelije eksprimiraju ovaj protein samo za vreme G1, S, G2 i M faze, ali ne i za vreme G0. Ćelije koje pokazuju specifično obojenje označavaju se kao pozitivne, a sam Ki-67 se prikazuje kao procenat pozitivnih ćelija u ukupnom uzorku (Beresford i sar, 2006). Različite studije pokazuju vezu između nivoa Ki-67 i ukupnog preživljavanja, pri čemu viši nivoi Ki-67 nose sa sobom povećani rizik od relapsa (Brown i Gatter, 2002).

Tamoksifen, kao agens koji zaustavlja ćelije u G0/G1 fazi ciklusa samim tim deluje i na nivo proliferacije. Clark i saradnici su ukazali na sposobnost tamoksifena da smanji nivo Ki-67 (Clarke i sar, 1993), dok izvesne studije ukazuju da izrazito visoki i niski nivoi Ki-67 daju predikciju za uspešnost terapije tamoksifenom (Jirstrom i sar, 2005).

Kao najčešća metoda koja se danas koristi za određivanje nivoa apoptoze (apoptotski indeks) je TUNEL (engl. terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling assay). Ovom metodom moguće je obeležiti krajeve velikog broja DNK fragmenata koji se stvaraju u kasnim fazama apoptoze (Parton i sar, 2001). U brojnim studijama je pokazano da nivo apoptoze prati nivo proliferacije (Liu i sar, 2001), kao i da tamoksifen dovodi do povećanja nivoa apoptoze (Ellis i sar, 1997).

Više o agresivnosti tumora se može saznati spajanjem proliferativnog i apoptotskog indeksa. Njihov odnos nam daje još jedan značajan parametar - indeks rasta tumora (IR) (Harper-Wynne i sar, 2002).

### **I.7.3. Angiogeneza**

Angiogeneza predstavlja formiranje novih krvnih sudova od postojeće vaskulature (Fox i sar, 2007). Ovaj proces je od velike važnosti za normalno funkcionisanje ženskog reproduktivnog sistema i uslov za rast i metastazu solidnih tumora kada dostignu određenu veličinu (Dabrosin, 2005). Sastavljen je od većeg broja koordinisanih i međusobno zavisnih koraka koji uključuju: degradaciju bazalne membrane, migraciju endotelijalnih ćelija i invaziju ekstraćelijskog matriksa, intenzivnu proliferaciju endotelijalnih ćelija i formiranje kapilarnog lumena pre sazrevanja i stabilizacije nove vaskulature. Nakon toga vrši se inhibicija dalje proliferacije endotelijalnih ćelija, rekonstitucija bazalne membrane kao i formiranje međusobnih veza i organizacija endotelijalnih ćelija u novi luminalni prostor (Fox i sar, 2007).

Angiogeneza je rezultat balansiranja između faktora koji indukuju i inhibiraju sam proces (Dabrosin, 2005). Pored toga, može se reći da postoje izvesne razlike između patološke i normalne angiogeneze. Na prvom mestu, u patološkom tkivu regulatorni mehanizmi koji isključuju proces angiogeneze više ne funkcionišu. Balans koji postoji između pozitivnih i negativnih regulatora pomećen je prema pozitivnim molekulima. (Terman i Stoletov, 2001). Druga razlika je da patološki formirani krvni sudovi nisu u potpunosti organizovani, njihovi zidovi imaju puno otvora. Razlog tome je što krvni sudovi tumora ne sazrevaju u potpunosti kroz regrutovanje glatkih mišićnih ćelija i pericita, što dalje vodi formiranju ovih otvora (Senger i sar, 1983).

Vaskularno endotelijalni faktor rasta (VEGF) je jedan od najvažnijih stimulatornih i mitogenih faktora koji učestvuju u angiogenezi (Ferrara i Davis-Smyth, 1997). Kod karcinoma dojke dokazana je povišena ekspresija mRNA u poređenju sa normalnim tkivom dojke (Yoshiji i sar, 1996). Visok nivo VEGF pokazatelj je loše prognoze i smanjenog ukupnog preživljavanja kod pacijentkinja sa i bez metastaza u limfnim čvorovima (Linderholm i sar, 2000). Postoje nekoliko izoformi VEGF-a koje potiču od istog gena, a nastaju alternativnom obradom. One obuhvataju forme od 121, 165, 189 i 206 aminokiselina (Tischer i sar, 1991). Izoforme VEGF-a se razlikuju u afinitetu ka vezivanju heparina i sličnih molekula, što utiče na njihovu bio-pristupačnost (Houck i sar, 1992). VEGF121 i VEGF165 su sekretovani kao slobodni solubilni proteini, dok su veće izoforme vezane za heparin i razgrađuju se u ekstraćelijskom matriksu (Ferrara i Davis-Smyth, 1997). Bitno je ukazati da je VEGF biološki aktivan kao slobodan protein u ekstraćelijskom prostoru gde je dostupan endotelijalnim ćelijama, na koje deluje kao mitogen preko receptora VEGFR-1 i VEGFR-2 (Dabrosin, 2005; Ferrara i Davis-Smyth, 1997).

U genu za VEGF pronađen je ERE (engl. estrogen response element) (Hyder i sar, 2000), a u više studija je i dokazan uticaj estrogena na povećanje angiogeneze i nivoa ekstraćelijskog VEGF u karcinomu dojke. Kada je u pitanju antiestrogena terapija, studije



pokazuju da tamoksifen povećava nivo mRNA VEGF-a u ćelijama kancera, ali da ujedno smanjuje nivo biološki aktivnog ekstraćelijskog VEGF-a (Garvin i Dabrosin, 2003). Pored toga što se proučava kao prognostički parametar, studije govore i o prediktivnoj moći VEGF. U tom pogledu rezultati su kontradiktorni, gde veći broj studija povezuje povišenu ekspresiju VEGF sa lošijim odgovorom na terapiju tamoksifenom (Manders i sar, 2003). Ipak izdvajaju se i studije gde je situacija obrnuta i visok nivo VEGF je povezan sa dobrim odgovorom na terapiju tamoksifenom (Coradini i sar, 2003).

#### **I.7.4. Urokinazni plazminogen aktivator (uPA) i plazminogen aktivator inhibitor tipa 1 (PAI-1)**

Kada ćelije kancera metastaziraju prema okolnim ili udaljenim tkivima i organima, one moraju proći i savladati tkivne barijere koje postoje između njih (Price i sar, 1997). Metastaza kancera uključuje nekoliko međusobno zavisnih procesa (Andreasen i sar, 1997):

- Odvajanje malignih ćelija sa njihove originalne lokalizacije.
- Migracija malignih ćelija.
- Invazija malignih ćelija u okolno tkivo, što zahteva adheziju, a zatim i degradaciju ekstraćelijskog matriksa (ECM).
- Omogućen pristup malignih ćelija ka krvi i limfnim sudovima.
- Adhezija i invazija kroz endotelijum, što dalje omogućava kolonizaciju na udaljena mesta u organizmu.

Već nekoliko decenija se smatra da veoma važnu ulogu u invaziji i metastazi tumora ima urokinazni plazminogen aktivator sistem (Andreasen i sar, 2000). Glavne komponente ovog sistema su urokinazni plazminogen aktivator (uPA), dva člana serpin (inhibitori serin proteaza) familije inhibitora proteaza, plazminogen aktivator inhibitor tipa 1 (PAI-1) i plazminogen aktivator inhibitor tipa 2 (PAI-2), i na kraju jedan membranski vezan receptor uPA, uPAR (Andreasen i sar, 1997).

uPA spada u grupu serin proteaza. Kao i većina proteaza, uPA se sintetiše u obliku katalitički neaktivnog jednolančanog polipeptida (pro-uPA). Iako se ne zna definitivno, u *in vitro* uslovima njegovi fiziološki aktivatori su plazmin, katepsin B i L (Andreasen i sar, 1997). Strukturno, kod uPA razlikujemo tri domena, terminalni domen faktora rasta, središnji domen nepoznate funkcije i karboksiterminalnu sekvencu koja sadrži katalitičko mesto. Aktivan uPA je dvolančani protein povezan jednom disulfidnom vezom (Duffy i Duggan, 2004). uPA poseduje ograničenu specifičnost prema substratima. Njegova proteolitička delovanja najviše se odnose na konverziju neaktivnog plazminogena u aktivni plazmin. Plazmin takođe spada u serin proteaze, ali sa mnogo širim spektrom delovanja. Pored kolagena, plazmin može razgraditi većinu proteina prisutnih u ekstraćelijskom matriksu (Duffy i Duggan, 2004). On takođe aktivira i prekursorske forme više matriksnih metaloproteinaza (MMPs) kao što su MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13 (Carmeliet i sar, 1997). Njihova aktivacija vodi daljoj degradaciji i remodeliranju ECM. Uz to, plazmin dalje aktivira i otpušta određene faktore rasta kao faktor rasta hepatocita, IGF 1 FGF2 (Rifkin, 1997). Osim toga ovi peptidi imaju potencijal da pojačaju progresiju tumora stimulišući proliferaciju, povećavajući migraciju i promovišući angiogenezu.

Ono što je bitno izdvojiti je da do aktivacije uPA od pro-uPA dolazi samo kada je vezan za svoj receptor uPAR. Ovako formiran kompleks ima i druge funkcije, pre svega započinjanje signalne transdukcije (Andreasen i sar, 1997). Takođe se pretpostavlja da uPAR vrši aktivaciju i fosforilaciju MAPK (Resnati i sar, 1996), signalizaciju preko G-proteina i protein kinaze C (Busso i sar, 1994).

PAI-1 spada u grupu inhibitora serin proteaza i sastoji se od jednolančanog glikoproteina koji je primarni fiziološki inhibitor uPA (Duffy i Duggan, 2004). Bitna karakteristika je da PAI-1 vezuje i indukuje internalizaciju i degradaciju uPA vezanog za uPAR. Dok se uPA-PAI-1 kompleks degradira, uPAR podleže endocitozi, reciklira se i vraća na ćelijsku površinu (Nykjaer i sar, 1992). PAI-1 takođe ima sposobnost vezivanja za ekstraćelijski matriks i vitronektin i time modulira ćelijsku adheziju i migraciju (Andreasen i sar, 1997). Predpostavlja se da više molekula deluje na povišenje ekspresije uPA. Na promotoru gena za uPA pronađena su vezivna mesta za AP-1, NF- $\kappa$ B, koji imaju uticaj na povišenje njihove ekspresije (Nerlov i sar, 1991). Izuzev ova dva transkripciona faktora izdvajamo PI3-kinazu koja aktivira NF- $\kappa$ B i povećava migratorni potencijal (Sizemore i sar, 1999). Visok nivo protein kinaze C alfa (PKC $\alpha$ ) povezan je sa povećanom sekrecijom uPA (Morse-Gaudio i sar, 1998), MAPK stimuliše ekspresiju uPA (Witowski i sar, 2003), a članovi Her familije povećavaju ćelijsku pokretljivost, nivo uPA i njegovog receptora (Mazumdar i sar, 2001).

uPA i PAI-1 su danas jedni od najviše proučavanih prognostičkih faktora karcinoma dojke. Pokazano je da daju informacije nezavisno od statusa limfnih čvorova, veličine tumora i gradusa. Pored toga, mnogi smatraju da su ovi parametri značajniji i od ER, Her2, katepsina D, kao i da najveću prognostičku moć prikazuju u grupi bez zahvaćenih limfnih čvorova (Duffy, 2002; Duffy i sar, 1999). Studije su pokazale da pacijentkinje sa niskim nivoom uPA i PAI-1 imaju značajno duži DFI u poređenju sa onim koje imaju visok nivo datih proteina (Janicke i sar, 2001). Kada je u pitanju prediktivna moć ovih biomarkera u odnosu na endokrinu terapiju tamoksifenom, Foekens i saradnici su utvrdili da pacijentkinje sa smanjenim nivoom uPA i PAI-1 imaju mnogo bolji odgovor na terapiju (Foekens i sar, 1995), što je potvrđeno i drugim studijama (Meijer-van Gelder i sar, 2003).

## II. CILJ

Analiza biološke heterogenosti estrogen zavisnog primarnog operabilnog karcinoma dojke, pacijentkinja u postmenopauzi lečenih tamoksifenom, imala je za cilj ispitivanje njenog značaja za klinički tok bolesti. Biološka heterogenost tumora ove grupe pacijentkinja je određivana na osnovu molekularnih biomarkera rasta tumora: ER, PR, Her2, Ki-67 i apoptotski indeks, kao i biomarkera invazivnosti i metastatičnosti malignih ćelija: uPA, PAI-1 i VEGF.

Pojedinačni ciljevi ove teze su:

- Ispitivanje fenotipova na osnovu pojedinačnih molekularnih biomarkera i kliničko-patoloških parametara;
- ispitivanje fenotipova nastalih međusobnim kombinacijama molekularnih biomarkera;
- ispitivanje fenotipova nastalih kombinacijom molekularnih biomarkera i kliničko-patoloških parametara, kao i fenotipova nastalih međusobnom kombinacijom kliničko-patoloških parametara;

Dati ciljevi posmatrani su kroz tri vremenska perioda od hiruške terapije do pojave udaljenih metastaza:

- Praćenje u prvih 2.5 godine terapije tamoksifenom imalo je za cilj definisanje *de novo* rezistencije, odnosno definisanje visokorizičnih podgrupa pacijentkinja kod kojih bi mogla biti primenjena druga vrsta endokrine terapije;
- praćenje između 2.5 i 5 godina terapije tamoksifenom imalo je za cilj definisanje stečene rezistencije, tj. određivanje visokorizičnih podgrupa pacijentkinja kod kojih bi mogla biti primenjena druga ciljana terapija;
- praćenje od 12 godina imalo je za cilj da ukaže na prognostički značaj biomarkera.

### III. MATERIJAL I METODE

#### III.1. KLINIČKO-PATOLOŠKE KARAKTERISTIKE PACIJENTKINJA I TUMORA

Analizama u okviru ove doktorske disertacije obuhvaćeno je 127 pacijentkinja operisanih 1993. godine na Institutu za Onkologiju i Radiologiju Srbije. Kod svih pacijentkinja je histološki potvrđen primarni operabilni karcinom dojke, sa i bez metastaza u limfnim čvorovima. Primarni tumori ovih pacijentkinja korišćeni su u daljim analizama. Sve pacijentkinje su u postmenopauzi i podvrgnute su adjuvantnoj endokrinoj terapiji tamoksifenom u trajanju od pet godina, nakon primenjene hiruške terapije. Sve pacijentkinje su praćene 12 godina. Zdravstveno stanje pacijentkinja praćeno je svaka tri meseca tokom prve dve godine, zatim svakih šest meseci u sledeće tri. Nakon perioda od pet godina pregledi su se vršili jednom godišnje. Za kraj perioda praćenja u ovom istraživanju uzeta je pojava udaljenih metastaza.

Svi neophodni podaci o parametrima pacijentkinja (godine i status menopauze) i parametrima tumora (veličina tumora- pT, zahvaćenost limfnih čvorova malignim ćelijama- N, histološki gradus- G, histološki tip tumora- IDC: invazivni duktalni karcinom i ILC: invazivni lobularni karcinom), dobijeni su iz istorija bolesti Instituta za Onkologiju i Radiologiju Srbije uz saradnju i konsultaciju histopatologa. Pacijentkinje su proglašavane postmenopauzalnim ako je menstrualni ciklus izostao 6 meseci. Starost pacijentkinja kreće se od 43 do 81 godine sa medijanom od 62 godine. Analiza i klasifikacija histoloških uzoraka rađena je po kriterijumima AJCC/UICC (engl. American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer) za TNM status (UICC, 1987) i histološki tip (Scarf i Torloni, 1968). Kliničko-patološki parametri pacijentkinja i tumora prikazani su **Tabelom I**.

**Tabela I** Patohistološki parametri pacijentkinja i tumora

<b>Parametar</b>	<b>N=127</b>	<b>%</b>
<b>Veličina tumora</b>		
pT1 (<2 cm)	67	53
pT2,3 (≥2cm)	57	45
nepoznato	3	2
<b>Limfni čvorovi</b>		
N0	15	12
N+	99	78
nepoznato	13	10
<b>Histološki gradus</b>		
G1	18	14
G2	89	70
G3	20	16
<b>Histološki tip</b>		
IDC	55	43
ILC	53	42
ostali	19	15

### III.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ER I PR IZ TKIVA TUMORA

Kvantitativni nivoi ER i PR određivani su u citosolnoj frakciji malignog tkiva klasičnom biohemijskom metodom. Analiza je vršena prema preporuci EORTC (engl. European Organization for Research and Treatment of Cancer) (EORTC, 1980). Sama metoda se bazira na vezivanju radioaktivno obeleženog steroidnog hormona za molekule odgovarajućeg receptora koji se nalaze u citosolu malignog tkiva dojke. Dato vezivanje za receptor se karakteriše konstantom disocijacije/asocijacije koja izražava specifičnost reakcije i predstavlja meru afiniteta vezivanja hormona za receptor. Biohemijska metoda za određivanje receptora podrazumeva više koraka:

- Uzimanje i čuvanje uzoraka karcinoma dojke.
- Homogenizaciju tkiva i izdvajanje frakcije citosola malignih ćelija.
- Vezivanje hormona za receptore prisutne u citosolu malignih ćelija.
- Odvajanje viška nevezanog (slobodnog) hormona.
- Određivanje radioaktiviteta u beta scintilacionom brojaču.
- Određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorku.
- Izračunavanje kvantitativnog sadržaja receptora za steroidne hormone.

Prvi korak u proceduri je pravilno uzimanje uzorka tumorskog tkiva. Odmah po završetku hiruške intervencije, patolog izdvaja reprezentativni uzorak malignog tkiva mase oko 200 mg do 1 g, koje se koristi za analizu sadržaja steroidnih receptora. Ceo postupak traje oko 15 minuta, pri čemu je tkivo na ledenoj ploči (temperatura 0-4 °C), zbog termolabilnosti receptora. Nakon toga, uzorak se čuva u tečnom azotu do trenutka analize.

Homogenizacija uzorka vrši se prvo mehaničkim putem na temperaturi tečnog azota, pri čemu se tkivo pretvara u prah. Nakon toga, homogenizacija se nastavlja u fosfatnom puferu pH vrednosti 7.4-7.7 ( $5 \times 10^{-3}$  fosfatni pufer, 20% glicerol, 1mM monotioglicerol i 1.5 mM EDTA, finalno), u mikrodismembratoru, na temperaturi od 0-4 °C. Ovako dobijena suspenzija prebacuje se u fosfatni pufer istog sastava, na temperaturi vodenog kupatila, da bi zatim usledilo centrifugiranje na 800-1000 g tokom 30 minuta. Supernatant koji je dobijen nalazi se između frakcije masti na površini i jedarnog taloga na dnu, sadrži neprečišćenu frakciju citosola. Zatim sledi ultracentrifugiranje na 100 000 g, u trajanju od 60 minuta, na 4 °C (ultracentrifuga Beckman L5-50), nakon čega dobijamo membransku frakciju u talogu i citosolnu frakciju u supernatantu. Za određivanje steroidnih receptora koristi se citosolna frakcija, koja je korišćena i za određivanje koncentracije Vegf, uPA i PAI-1.

Koncentracija ukupnih proteina u uzorku rađena je metodom po Lowry-ju. Ona se zasniva na dve hemijske reakcije: biuretskoj reakciji proteina sa bakarnim jonom u baznoj sredini i redukciji fosfo-molibdenskog-fosfo-volframovog reagensa triptofanom i tirozinom prisutnim u proteinu. Zatim se apsorbancu meri spektrofotometrijski (spektrofotometar Boeco S-22, Germany) na talasnoj dužini od 660 nm. Određivanjem apsorbancije serije standarda (vodeni rastvor BSA- bovin serum albumin u koncentracijama 25, 50, 75, 100, 125, 125, 200 i 250 µg/ml) pravi se standardna kriva sa koje se zatim očitavaju potrebne vrednosti. Date eksperimentalne vrednosti očitane sa standardne krive podešavaju se za korišćena razblaženja i izražavaju u mg/ml.

U određivanju koncentracija ER korišćen je tricijumom obeleženi 17 β – estradiol (*Amersham*, England), specifične aktivnosti oko 100 Ci/mmol (1,85 TBq/mmol) u koncentraciji  $32 \times 10^{-10}$  M. Kao kompetitivni hormon korišćen je sintetski estrogen dietilstilbestrol (DSB) u 100x većoj koncentraciji,  $32 \times 10^{-8}$ . U slučaju PR korišćen je tricijumom obeleženi sintetski progesteron ORG 2058 (*Amersham*, England), specifične aktivnosti oko 50 Ci/mmol (1,85 TBq/mmol), u koncentraciji  $64 \times 10^{-10}$  M. Kao kompetitivni hormon korišćen je neobeleženi ORG 2058 u 200x većoj koncentraciji ( $32 \times 10^{-8}$ ). Citosol ćelija tumora dojke sadrži proteine sa visokim ( $K_d < 1\text{nM}$ ) i niskim afinitetom ( $K_d > 30\text{nM}$ ) vezivanja za steroidne hormone, drugim rečima sadrži receptore i ne-receptore. Bitno je istaći da se deo hormona vezuje za proteine sa niskim afinitetom (nespecifično vezivanje za proteine koji nisu receptori), a deo za proteine sa visokim afinitetom (specifično vezivanje za receptore). Razlika između ukupnog i nespecifičnog vezivanja je zapravo specifično vezivanje hormona za frakciju sa visokim afinitetom. Određivanje ukupnog i nespecifičnog vezivanja hormona zasniva se na kompetitivnoj inhibiciji, odnosno na međusobno isključivom vezivanju obeleženog ili neobeleženog hormona za molekule receptora. Ukupno vezivanje proteina određivano je u 200 µl citosola, sa poznatom koncentracijom proteina (0.2 – 3.3 mg/ml), u prisustvu 25 µl saturacione koncentracije obeleženog hormona i 25 µl fosfatnog pufera. Nespecifično vezivanje hormona odvija se u identičnim uslovima kada je u pitanju obeležen hormon, sa tim da se umesto 25 µl fosfatnog pufera u reakcionu smešu dodaje 25 µl neobeleženog hormona. Vezivanje hormona za receptore odvija se na temperaturi od 4 °C u trajanju od 18 sati.

Nakon uspostavljanja ravnoteže, potrebno je razdvojiti molekule hormona koji su vezani za proteine (bilo kao ukupno ili kao nespecifično vezivanje) od slobodnih molekula hormona, tj. odvojiti frakciju nevezanog hormona. Zato se koristi aktivni uglj (norit A, *Sigma*, Germany) koji je obložen dekstranom T-70 (*Pharmacia*, Sweden). Razdvajanje se postiže hemijskom reakcijom koja se zasniva na adsorpciji slobodnih molekula hormona na čvrstoj fazi uglja. Aktivni uglj se oblaže dekstranom da bi se sprečio pristup velikih

molekula površini aktivnog uglja i njihova adsorpcija, odnosno da bi se dozvolilo samo malim molekulima da se adsorbuju. Oblaganje uglja vrši se na temperaturi od 4 °C uz mešanje tokom 12 sati. U 250 µl ispitivanog uzorka citosola, kako u okviru ukupnog tako i u okviru nespecifičnog vezivanja za proteine, dodaje se 500 µl ovako pripremljenog reagensa (0.25 % norit A, 0.025% dekstran u 0.01 M tris puferu, pH 8), kako bi se omogućila adsorpcija nevezanog hormona. Reakcija se izvodi na temperaturi od 4 °C u trajanju od 30 minuta, uz mešanje. Taloženje aktivnog uglja, na kome je adsorbovan nevezani hormon, postiže se centrifugiranjem na 2000-3000 g, 30 minuta na 4 °C. Time se dobija talog u kome je aktivni ugalj sa adsorbovanim nevezanim hormonom i supernatant koji sadrži komplekse hormona i receptora koji se dalje koriste za scintilaciono merenje radioaktiviteta.

U daljem postupku potrebno je odrediti radioaktivitet, što se postiže određivanjem broja dezintegracija u minuti (dpm) obeleženog hormona, vezanog u frakciji u kojoj se određuje ukupno ili nespecifično vezivanje. Radioaktivnost se meri pomoću tečnog beta scintilacionog brojača (*BeckmanLS 700*), u scintilacionoj tečnosti (0.4 % PPO i 0.005% POPOP u toluolu) u količini po 6 ml po uzorku. Merenjem radioaktivnosti se kao rezultat dobija relativna aktivnost, izražena u cpm (engl. count per minute ili broj detektovanih raspada u minuti). Da bi smo radioaktivnost iskazali kao apsolutnu aktivnost, izraženu u dpm (engl. desintegration per minute - broj raspada u minuti), potrebno je da vrednosti izražene u cpm podelimo sa efikasnošću brojača. Daljim oduzimanjem vrednosti nespecifično vezanog hormona od vrednosti ukupno vezanog hormona, dobijamo specifično vezivanje hormona (frakcija hormona vezana za sopstvene receptore). Receptori za estrogen i progesteron se na kraju izražavaju u fmol po mg proteina citosola ćelija.

### III.3. ELISA

Kako bi kvantitativno utvrdili nivoe Vegf, uPA i PAI-1 koristili smo se ELISA (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay). U slučaju Vegf korišćen je *Quantikine® Human VEGF Immunoassay (R&D systems)* (Span i sar, 2000). Ovim kitom moguće je detektovati proteinske nivoe izoforme Vegf sa 165 aminokiselina u citosolnoj frakciji malignog tkiva dojke. U određivanju uPA korišćen je *IMUNOBIND uPA ELISA Kit (American Diagnostica Inc.)* (Konecny i sar, 2001), kojim je moguće detektovati jednolančani uPA (pro-uPA), HMW-uPA, zatim uPA vezan za svoj receptor kao i uPA koji je u kompleksu sa PAI-1 i PAI-2. Kada je u pitanju PAI-1 korišćen je *IMUNOBIND PAI-1 ELISA Kit (American Diagnostica Inc.)* (Konecny i sar, 2001), kojim se detektuje inaktivna i aktivna forma PAI-1, kao i PAI-1 koji se nalazi u nekom od kompleksa.

#### III.3.1. VEGF

Postupak za određivanje VEGF radi se tokom jednog dana i sastoji se iz više koraka.

- U prvom koraku dodat je rastvor za razblaživanje u svaki bunarić (na čijem dnu se nalazi vezujuće antitelo).
- Nakon toga, dodato je po 50-100 µl standarda i uzoraka u bunariće koje smo odredili, da bi onda ploču prekrili i inkubirali 2 sata na sobnoj temperaturi.
- Ispiranje rastvorom za ispiranje.
- Dodato je 200 µl primarnog antitela konjugovanog sa enzimom HRP (engl. horse-radish peroxidase) i inkubirano 2 sata na sobnoj temperaturi.

- Ispiranje rastvorom za ispiranje.
- Zatim je dodato 200  $\mu$ l substrat enzima HRP tetrametilbenzidina (TMB) i vodonik peroksida i inkubirano 25 minuta na sobnoj temperaturi.
- Radi zaustavljanja reakcije dodato je 50  $\mu$ l stop rastvora (2N sumporna kiselina).
- Apsorbancija bojene reakcije očitavana je spektrofotometrom na 450 nm u roku od 30 minuta. Korekcija je podešavana na 540 ili 570 nm.
- Iz standardne krive i dobijenih podataka dobijene su koncentracije VEGF izražene u pg/mg.

### III.3.2. uPA i PAI-1

Određivanje koncentracije uPA i PAI-1 vrši se na identičan način i da bi se završio ceo postupak neophodno je dva dana.

- Dodato je 100  $\mu$ l uPA/PAI-1 standarda i uzorka u određene bunariće (na čijem dnu se nalazi vezujuće antitelo), zatim su prekriveni i inkubirani preko noći u vlažnoj komori na 4 °C.
- Zatim je dodato 100  $\mu$ l detekcionog biotinizovanog antitela u svaki bunarić, prekriveno i inkubirano 1 sat na sobnoj temperaturi.
- Ispiranje rastvorom za ispiranje.
- U sledećem koraku dodato je 100  $\mu$ l enzim konjugata (streptavidin konjugovana HRP).
- Ispiranje rastvorom za ispiranje.
- Dodato je 100  $\mu$ l substrat rastvora (TMB-perborat/3, 3', 3, 5'-tetrametilbenzidin), i zatim je inkubirano 20 minuta na sobnoj temperaturi.
- Reakcija je stopirana dodavanjem 50  $\mu$ l 0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Apsorbancija bojene reakcije očitavana je spektrofotometrom na 450 nm u roku od 30 minuta.
- Iz standardne krive i dobijenih podataka dobijene su koncentracije uPA i PAI-1 izražene u ng/mg.

### III.4. HROMOGENA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA

Hromogena *in situ* hibridizacija (CISH) je metoda koja omogućava detekciju genske amplifikacije uz korišćenje svetlosnog mikroskopa. Suština metode je u sposobnosti obeleženih genskih proba (dvolančana DNK obeležena digoksigeninom) da hibridizuju, *in situ*, za specifične komplementarne sekvence u uzorku. Proba se može vizualizovati i razlikovati od okolne tkivne morfologije. Vizualizacija signala se vrši u formalinom fiksiranim isečcima tkiva iz parafinskih kalupa, pri čemu su isecci debljine 4-5  $\mu$ m.

Tkivo je fiksirano u formalinu 12-24 sati pre kalupljenja u parafinske blokove. Iz parafinskih blokova seku se tkivni isecci debljine 4-5  $\mu$ m i lepe na superfrost/Plus mikroskopske pločice. Zatim se isecci suše 2-4 sata na 60 °C. Nakon toga počinje sam postupak hromogene *in situ* hibridizacije, koji se kompletira u periodu od dva dana.

U prvom koraku deparafinizacije tkivni isecci su potapani u ksilol (2 puta po pet minuta), zatim su prebacivani u 100% etanol (3 puta po tri minuta), a zatim u dejonizovanu vodu (3 puta po 2 minuta).



Predtretman toplotom je korak u kome su isečci kuvani na 98 °C u reagensu A u trajanju od 15 minuta. Po završetku sledi ispiranje vodom (3 puta po 2 minuta). Pločice su obrisane filter papirom i kratko osušene na vazduhu.

U procesu enzimske digestije pločice su prvo stavljene u posudu za inkubaciju, da bi se zatim na samo tkivo nakapalo 2-3 kapi enzimskog reagensa, dovoljno da prekrije ceo isečak. Posuda se zatvara i inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta. Po završetku isečci su isprani vodom (3 puta po 2 minuta).

Dehidracija je vršena u seriji etanola (70%, 85%, 95%, 100% i 100%) po 2 minuta za svaki rastvor. Pločice se zatim suše vertikalno na vazduhu 20 minuta.

Proba (Zymed spot-Light Probe) za Her2 uronjena je u vodeno kupatilo na temperaturi od 78 °C. Zajedno sa probom u vodeno kupatilo je uronjena ranije i kiveta sa denaturišućim puferom koji sadrži formamid, u koji su stavljene isečci. Probe i isečci tako ostaju u vodenom kupatilu 5 minuta.

Po završenoj denaturaciji ponovo je vršena dehidracija kroz seriju etanola (70%, 85%, 95%, 100% i 100%), svaki po 2 minuta. Nakon toga, isečak tkiva je sušen na vazduhu 10 minuta. U sledećem koraku 15 µl probe je stavljeno na svaki isečak, a pokrovno staklo je stavljeno na način da se proba ravnomerno razlije po tkivnom preseku. Korišćenje Zymed UnderCover Slip pokrovnih stakala omogućava potpuno zatvaranje površine isečka i sprečava isparavanje. Pločice su onda stavljene u posudu za inkubiranje na 37 °C preko noći.

Sledećeg dana, pločice su prebačene u u kivete sa citratnim puferom (SSC), na sobnoj temperaturi 5 minuta kako bi se skinulo pokrovno staklo. Zatim su prebačene u SSC rastvor u vodenom kupatilu na 78 °C, 5 minuta radi ispiranja. Na kraju pločice sa isečcima su isprane u dejonizovanoj vodi (3 puta po 2 minuta). Isečci su zatim potopljeni u 3% rastvor vodonik-peroksida u apsolutnom metanolu u trajanju od 10 minuta. Ispiranje je vršeno u 0.01% rastvoru PBS (fosfatni pufer)/Tween20, 3 puta po 2 minuta. U sledećoj fazi dodavano je 2-3 kapi CAS-Block reagensa na sobnoj temperaturi i inkubirano 10 minuta.

Reagens je po završetku odstranjen filter papirom, a dodato je primarno antitelo na digoksigenin. Isečci su inkubirani na sobnoj temperaturi 30 minuta. Posle toga isečci su isprani ponovo u rastvoru PBS/Tween20, 3 puta po 2 minuta. U sledećem koraku dodato je sekundarno antitelo konjugovano sa HRP, nakon čega je inkubacija trajala 45 minuta.

Posle ispiranja u PBS/Tween-u dodali smo DAB (diaminobenzidin) hromogen substrat, 2-3 kapi po isečku i inkubirali 30 minuta. Isečci su onda dobro isprani pod tekućom vodom. Kontrastno bojenje hematoksilinom trajalo je 15 sekundi, uz ispiranje nakon toga pod tekućom vodom. Dehidracija je ponovo urađena u seriji etanola (70%, 85%, 95%, 100% i 100%), u svakom po 2 minuta, da bi zatim sledilo ispiranje u ksilolu (2 puta po 2 minuta) i lepljenje pokrovne ljušpice (Coverslip).

Interpretacija rezultata rađena je na svetlosnom mikroskopu. Prema cish protokolu 1-5 genskih kopija po jedru ćelije je znak da nema amplifikacije gena, 6-10 ili više od 10 kopija po jedru u 50% ćelija je siguran znak postojanja amplifikacije gena za Her2.

### **III.5. IMUNOHISTOHEMIJSKA METODA ZA ODREĐIVANJE Ki-67**

Imunohistohemijska metoda se zasniva na postepenom procesu vizualizacije reakcije odgovarajućeg antitela sa veznim mestom antigena, tj. ciljnog molekula koji se detektuje. Ceo postupak se izvodi na sobnoj temperaturi. Tkivo je fiksirano u formalinu 12-24 sati pre kalupljenja u parafinske blokove. Sami isečci su debljine 4-5 µm.

Postupak deparafinizacije i rehidratacije rađen je u nekoliko koraka. Prvi korak bio je prebacivanje tkivnih preseka u ksilol dva puta po 10 minuta. Nakon toga isečci su preneti prvo u 100% etanol dva puta po 10 minuta, pa u 95-96% etanol dva puta po 5 minuta i na kraju u 75% etanol jednom u trajanju od 5 minuta. Ispiranje je vršeno u destilovanoj vodi dva puta.

U koraku koji sledi vršeno je blokiranje endogene peroksidaze, 10 minuta u 3% vodonik peroksidu. Postupak demaskiranja veznih mesta odgovarajućeg antigena vršen je zagrevanjem sa 10mM citratnim puferom (ph=6) tokom mikrotalasnog tretmana (400W) 12-15 minuta. Kiveta sa citratnim puferom prethodno je zagrejana. Po završetku tkivni preseci su ostavljeni da se hlade 15-20 minuta u istom rastvoru. Pločice su zatim isprane u destilovanoj vodi 2 minuta.

Tretman avidinom (dobijenog mešanjem belanca sa 100 ml destilovane vode) traje 15 minuta, a zatim je sledio tretman biotinom (dobijen mešanjem 0.02g biotina i 100 ml TBS-a). Tkivni preseci ostali su u biotinu 15 minuta. Ispiranje nakon toga rađeno je u destilovanoj vodi i u radnom puferu (TBS, ph=7.6) dva puta po 5 minuta. Pločice su kratko ocedene, čime je otklonjen sav radni pufer u delu pored preseka. Sam presek obeležen je specijalnim flomasterom (Dako-pen), tj. ograničena je površina na koju se nanosi primarno antitelo. Ovako pripremljene pločice stavljanje su u posude u kojima je obezbeđena vlažna sredina.

Imunološko bojenje odgovarajućih epitopa, odnosno determinanti antigena od značaja za analizu, izvedeno je primenom monoklonskog antitela, pri razblaženju 1:80. Na tkivni presek stavljeno je 100 µl rastvora primarnog antitela (razblažen TBS-om) (clone MIB-1, Dako). Inkubacija je trajala 30 minuta u vlažnoj sredini u trajanju od 30 minuta. Po završetku tkivni preseci su isprani u TBS-u. Za postupak imunohistohemijskog obeležavanja reakcije između primarnog antitela i odgovarajućeg antigena korišćen je visokosenzitivni detekcioni kit „Dako LSAB + System-HRP” (code no. K 0690), pri čemu se za vizualizaciju nastale reakcije, kao hromogen, koristio 3', 3'-diaminobenzidin (DAB+, Liquid, Dako K3468).

Pločice su kratko osušene filter papirom i zatim je stavljeno biotinizovano sekundarno antitelo iz detekcionog kita, 2-3 kapi na sredinu preseka i inkubiralo se 15 minuta u vlažnoj sredini na sobnoj temperaturi. Preseci su ponovo isprani u TBS-u i osušeni na identičan način. Po završetku nanet je streptavidin-HRP (engl. horse-radish peroxidase) sloj, i preseci su inkubirani 15 minuta u vlažnoj sredini na sobnoj temperaturi.

Posle brisanja pločica, nanošen je DAB (diaminobenzidin) u količini od 100 µl. Inkubiranje je vršeno u trajanju od 8-10 minuta u vlažnoj sredini na sobnoj temperaturi. Po završetku isečci su isprani u destilovanoj vodi 2-3 puta po 5 minuta. Jedra su kontrastirana dodavanjem 100 µl hematoksilina, 1-2 minuta. Ispiranje je ponovljeno 2-3 puta po 5 minuta. Zatim je rađena dehidratacija i prosvetljavanje tkivnog preseka prvo kroz seriju alkohola 75%, 95-96% etanol kratko, a zatim 100% etanol 5 minuta. Posle toga pločice su prebačene u ksilol 10 minuta. Nakon toga pločice su obrisane i stavljen je pokrovni medium DPX, 1-2 kapi na središte preseka i brzo je prekriveno pokrovnom ljuspicom. Pri obradi rezultata, kod svakog tkivnog preseka računat je broj Ki-67 pozitivnih ćelija na 1000 izbrojanih.

### III.6. TUNEL METODA

TUNEL (engl. terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling) predstavlja veoma efikasnu metodu za kvantifikaciju apoptoze na nivou tkivnog preseka, pri čemu se apoptoza može identifikovati na nivou svake ćelije posebno. Sam metod se zasniva na činjenici da tokom apoptoze dolazi do formiranja prekida (jednolančanih i dvolančanih) DNK, čime se stvaraju oligonukleozomi. Ti DNK prekidi se zatim mogu detektovati enzimatskim obeležavanjem 3'-OH kraja DNK sa modifikovanim nukleotidima. Kao enzim za inkorporiranje koristi se terminalna deoksinukleotidil transferaza (TdT). Detekcija se vrši kroz seriju koraka čime se na kraju omogućava vizualizacija ćelija u apoptozi, pri čemu je neophodan materijal dobijen u obliku detekcionog kita (Roche).

Tkivo je fiksirano u formalinu 12-24 sata pre kalupljenja u parafinske blokove. Debljina preseka je 4-5  $\mu\text{m}$ . Proces deparafinizacije izvođen je prebacivanjem tkivnih preseka u ksilol 2 puta po 10 minuta. Rehidratacija je vršena prebacivanjem pločica kroz seriju etanola: 100% etanol 2 puta po 10 minuta, 95-96% 2 puta po 5 minuta i na kraju 75% etanol u trajanju od 5 minuta. Pločice su isprane u destilovanoj vodi, više puta kratko, a zatim su ostavljene u vodi 5 minuta.

Blokiranje endogene peroksidaze vršeno je u 3% vodonik peroksidu 10 minuta. Zatim su pločice prebačene u citratni pufer koji je prethodno zagrejan, da bi se tkivni preseci kuvali 5 minuta na 40 W. Proces se prekida naglim hlađenjem dolivanjem citratnog pufera. Nakon toga tkivni preseci su ispirani više puta destilovanom vodom, a zatim jednom u trajanju od 5 minuta.

Pločice su zatim prebačene u avidin u trajanju od 15 minuta. Posle krakog ispiranja u destilovanoj vodi, pločice su prebačene u 0.02% biotin na 15 minuta, pa se ispiranje ponavlja. Nakon toga, pločice su kratko osušene, a presek je obeležen specijalnim flomasterom (Dako-pen). Zatim je na sredinu tkivnog preseka naneto 25  $\mu\text{l}$  tunel reakcione rastvora (terminalna deoksinukleotidil transferaza-TdT, fluoresceinom obeleženi nukleotidi), a preseci su pokriveni komadićima parafilma da bi se obezbedilo ujednačeno širenje rastvora i gubitak isparavanjem. Tkivni preseci su zatim stavljeni u vlažnu posudu koja je prebačena u sušnicu na 37 °C u trajanju od 60 minuta. Parafilm je zatim skinut, a pločice su ispirane radnim puferom TBS-om 3 puta po 5 minuta.

U sledećem koraku na tkivni presek stavljeno je 25  $\mu\text{l}$  "converter pod" rastvora (anti-fluorescein antitelo konjugirano sa HRP (engl. horse-radish peroxidase)), prekriveni su parafilmom i inkubirani u vlažnoj komori u sušnici 30 minuta na 37 °C. Zatim je parafilm skinut, a pločice su ponovo isprane radnim puferom 5 minuta. Pošto su pločice kratko osušene dodato je 100  $\mu\text{l}$  DAB hromogena, a pločice su zatim ostavljene 10 minuta na sobnoj temperaturi. Postupak kontrastiranja vršen je hematoksilinom u trajanju od 2 minuta. Tkivni preseci su onda isprani destilovanom vodom.

Na kraju je rađen postupak dehidratacije i prosvetljavanja tkivnog preseka. Pločice su prebačene u seriju etanola: 75%, 95-96% etanol kratko, a zatim 100% etanol 5 minuta. Po završetku pločice su prebačene u ksilol 10 minuta. Zatim su kratko osušene, stavljen je pokrovni medium DPX na središte preseka i pokrovna ljušpica. Kod svakog tkivnog preseka računat je broj pozitivnih ćelija na 3000 izbrojanih.

### III.7. STATISTIČKE METODE KORIŠĆENE U RADU

Granične vrednosti za određivanje biomarkera koje su korišćene u radu dobijene su metodom "minimalne p-vrednosti". Status Her2 određivan je CISH metodom tako da pacijente u zavisnosti da li imaju amplifikaciju Her2 gena ili ne možemo podeliti na pozitivne i negativne. Odnosi između kvantitativnih vrednosti parametara računati su Spearman-ovim testom korelacija. Distribucija kvantitativnih vrednosti određivana je Mann Whitney testom. Verovatnoće DFI (engl. disease-free interval) izračunate su metodom Kaplan-Meier, a u poređenju kriva preživljavanja korišćen je Log-rank test. Kao statistički značajne uzete su verovatnoće (p) manje ili jednake od 0.05. Svi testovi su rađeni u programu SigmaStat 3.5/Plot 10.



Slika 4. Verovatnoća DFI u celoj grupi posle operativnog uklanjanja primarnog tumora bolesno od 2,5 godine

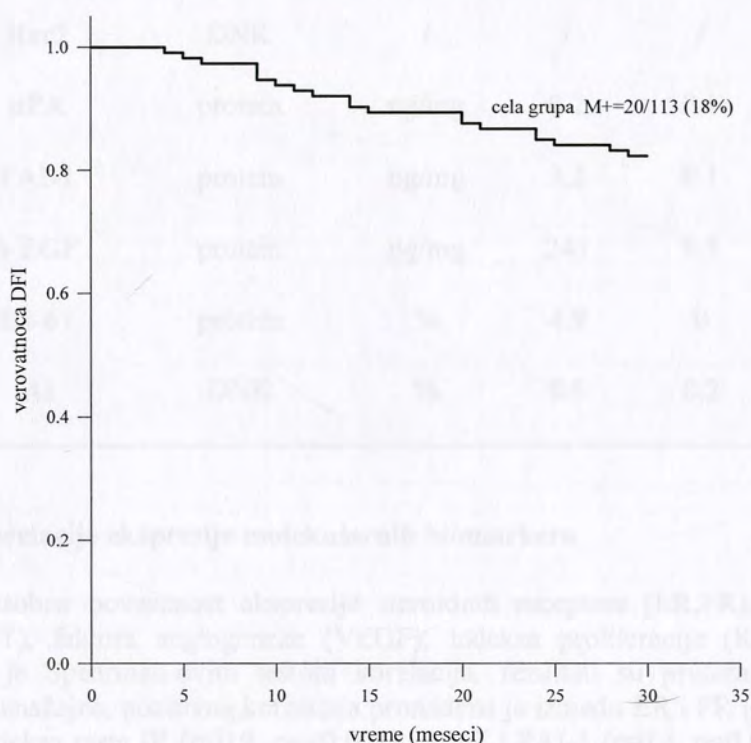
#### IV.1.1. Molekularni biomarkeri i njihova interpretacija

Molekularni biomarkeri su određivani na nivou proteina i DNK: ER, PR i Her2 određivani su u celim grupi posle operativnog, YAP, uPA, PAI-1 određivani su na ST preoperativno, a Ki-67 i spaprotinski antitelo na 48. kao analize koje se odnose na značaj

## IV. REZULTATI

### IV.1. TOK BOLESTI U PRVIH 2.5 GODINE TERAPIJE TAMOKSIFENOM

Analizom verovatnoće DFI u grupi pacijentkinja koje su primile terapiju tamoksifenom, pokazano je da u prvih 2.5 godina terapije dolazi do pojave udaljenih metastaza kod 18% pacijenata ( $M+=20/113$ ) (**Slika 1**). Pacijentkinje kod kojih nije došlo do pojave udaljenih metastaza praćene su 2.5 godina.



**Slika 1.** Verovatnoća DFI u celoj grupi pacijentkinja tokom perioda praćenja toka bolesti od 2.5 godine

#### IV.1.1. Molekularni biomarkeri i njihova ekspresija

Molekularni biomarkeri su proučavani na nivou proteina i DNK. ER, PR i Her2 proučavani su u celoj grupi pacijentkinja. VEGF, uPA, PAI-1 ispitivani su na 57 pacijentkinja, a Ki-67 i apoptotski indeks na 48, kao studije koja će ukazati na značaj

daljeg ispitivanja ovih biomarkera. Njihov nivo ekspresije prikazan je u vidu medijane, minimalne i maksimalne vrednosti (**Tabela II**).

**Tabela II** Ekspresija molekularnih biomarkera

biomarker	nivo ekspresije	jedinica	medijana	min	max
ER	protein	fmol/mg	82	1	1157
PR	protein	fmol/mg	23	1	948
Her2	DNK	/	/	/	/
uPA	protein	ng/mg	0.2	0.1	0.7
PAI-1	protein	ng/mg	3.2	0.1	73.1
VEGF	protein	pg/mg	241	6.5	4535
Ki-67	protein	%	4.9	0	32.3
Ai	DNK	%	0.8	0.2	1.8

#### IV.1.2. Korelacije ekspresije molekularnih biomarkera

Međusobna povezanost ekspresije steroidnih receptora (ER,PR), faktora invazije (uPA,PAI-1), faktora angiogeneze (VEGF), indeksa proliferacije (Ki-67) i apoptoze ispitivana je Spearman-ovim testom korelacija, rezultati su prikazani u **Tabeli III**. Statistički značajna, pozitivna korelacija pronađena je između ER i PR ( $r=0.6$ ,  $p<0.001$ ), Ki-67 i indeksa rasta IR ( $r=0.9$ ,  $p<0.001$ ), Ki-67 i PAI-1 ( $r=0.4$ ,  $p=0.02$ ), kao i između uPA i PAI-1 ( $r=0.035$ ,  $p=0.02$ ). Korelacije između ostalih molekularnih biomarkera nisu pokazale statističku značajnost. Poredeći godine pacijentkinja sa molekularnim biomarkerima nije nađena nikakva korelacija.

**Tabela III** Međusobne korelacije ekspresije molekularnih biomarkera

		PR	Ki-67	Ai	IR	VEGF	uPA	PAI-1
ER	r	0.6	-0.2	-0.02	-0.1	-0.1	-0.2	-0.1
	p	<b>&lt;0.001</b>	0.3	0.9	0.5	0.7	0.1	0.363
PR	r		0.01	0.1	0.01	-0.05	-0.1	-0.07
	p		0.9	0.5	0.9	0.7	0.4	0.6
Ki-67	r			0.2	0.9	0.2	-0.02	0.4
	p			0.3	<b>&lt;0.001</b>	0.4	0.9	<b>0.02</b>
Ai	r				-0.2	0.04	0.2	0.2
	p				0.2	0.8	0.3	0.2
IR	r					0.2	-0.1	0.3
	p					0.3	0.5	0.1
VEGF	r						0.2	0.25
	p						0.2	0.11
uPA	r							0.35
	p							<b>0.02</b>
PAI	r							
	p							

r – Spearman-ov koeficijent korelacije

p – verovatnoća

#### IV.1.3. Distribucija molekularnih biomarkera prema klasičnim patohistološkim parametrima prognoze

Raspodela nivoa ekspresije biomarkera prema patohistološkim parametrima rađena je primenom Man-Whitney testa (**Tabela IV**). Nivoi ekspresije ER i PR su značajno povišeni kod podgrupe pacijentkinja sa metastazama u limfnim čvorovima ( $p=0.03$ ,  $p=0.03$ ; respektivno). Ekspresija uPA, VEGF i Ai povišena je u podgrupi pacijentkinja bez zahvaćenih limfnih čvorova ( $p=0.02$ ,  $p=0.02$ ,  $p=0.05$ ; respektivno). U podgrupi pacijentkinja sa karcinomom dojke duktalnog tipa određene su povišene koncentracije uPA i PAI-1 ( $p=0.02$ ,  $p=0.05$ ).

**Tabela IV** Ekspresija biomarkera u grupama definisanim prema patohistološkim parametrima

	N	medijana	min	max	p-vrednost <sup>a</sup>
<b>ER (fmol/mg)</b>					
<b>Veličina tumora</b>					
pT1	58	82	1	1157	0.9
pT2	53	78	8	909	
<b>Nodalni status</b>					
N0	13	84	2	248	<b>0.03</b>
N+	89	82	1	833	
<b>Histološki tip</b>					
IDC	50	69	1	1157	0.3
ILC	46	82	3	658	
<b>Histološki gradus</b>					
G1	17	69	18	600	0.1
G3	19	84	3	909	
<b>PR (fmol/mg)</b>					
<b>Veličina tumora</b>					
pT1	58	23	2	733	0.4
pT2	53	22	1	948	
<b>Nodalni status</b>					
N0	13	22	1	216	<b>0.03</b>
N+	89	23	2	733	
<b>Histološki tip</b>					
IDC	50	22	1	948	0.5
ILC	46	23	2	608	
<b>Histološki gradus</b>					
G1	17	22	2	733	0.7
G3	19	22	1	948	

<sup>a</sup>Mann-Whitney test



nastavak Tabele IV

	N	medijana	min	max	p-vrednost
<b>uPA (ng/mg)</b>					
<b>Veličina tumora</b>					
pT1	24	0.14	0.06	0.67	0.5
pT2	22	0.15	0.08	0.59	
<b>Nodalni status</b>					
N0	10	0.15	0.09	0.67	<b>0.02</b>
N+	26	0.15	0.06	0.63	
<b>Histološki tip</b>					
IDC	23	0.15	0.07	0.67	<b>0.02</b>
ILC	16	0.15	0.06	0.37	
<b>Histološki gradus</b>					
G1	8	0.2	0.1	0.4	0.7
G3	12	0.2	0.1	0.7	
<b>PAI-1 (ng/mg)</b>					
<b>Veličina tumora</b>					
pT1	22	3	0.1	12.9	0.3
pT2	21	3	0.5	73.1	
<b>Nodalni status</b>					
N0	9	3	0.1	73.1	0.2
N+	25	3	0.4	21.9	
<b>Histološki tip</b>					
IDC	21	3	0.6	73.1	<b>0.05</b>
ILC	15	3	0.1	8.9	
<b>Histološki gradus</b>					
G1	7	3.2	0	99.9	1
G3	11	3.01	0.4	73.1	

<sup>a</sup>Mann-Whitney  
test

nastavak Tabele IV

	N	medijana	min	max	p- vrednost <sup>a</sup>
<b>VEGF (pg/mg)</b>					
<b>Veličina tumora</b>					
pT1	23	228	6.5	4535	0.7
pT2	21	241	19.3	2806.7	
<b>Nodalni status</b>					
N0	10	241	41.6	4535	<b>0.02</b>
N+	25	228	6.5	3753.4	
<b>Histološki tip</b>					
IDC	21	299	44.7	4535	0.02
ILC	17	358	6.5	1801.4	
<b>Histološki gradus</b>					
G1	8	287	42.4	531.3	0.5
G3	12	299	11	4535	
<b>Ki-67</b>					
<b>Veličina tumora</b>					
pT1	19	4.5	1.2	19.3	0.8
pT2	18	4.8	0	32.3	
<b>Nodalni status</b>					
N0	7	5.8	0	18.9	0.4
N+	24	4.5	0.1	32.3	
<b>Histološki tip</b>					
IDC	18	5.3	0	32.3	0.7
ILC	13	4.3	1.3	22.9	
<b>Histološki gradus</b>					
G1	6	4.2	1.5	9	0.1
G3	6	5.3	0	17	

<sup>a</sup>Mann-Whitney  
test

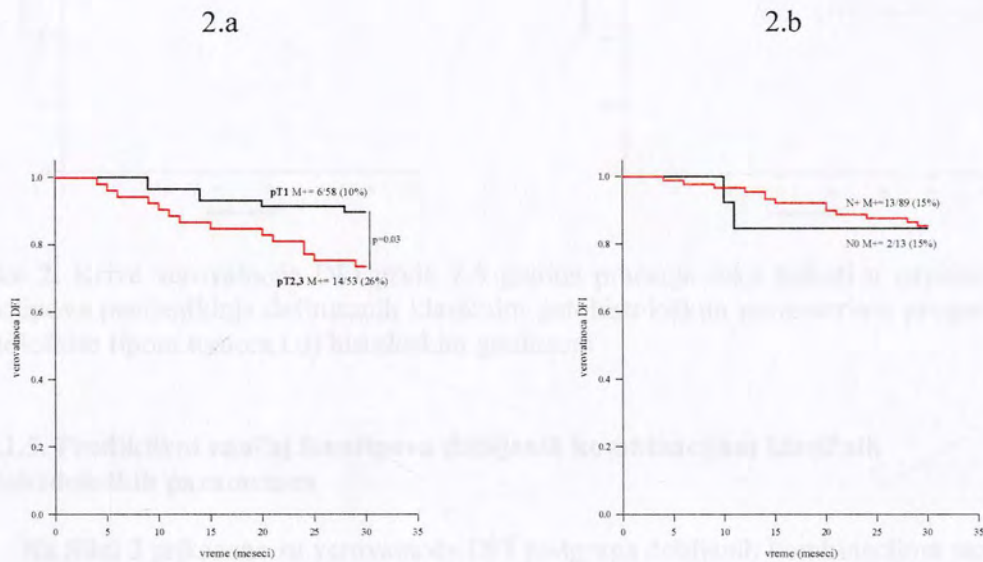
nastavak Tabele IV

	N	medijana	min	max	p- vrednost <sup>a</sup>
<b>Ai</b>					
<b>Veličina tumora</b>					
pT1	19	0.8	0.3	1.7	0.8
pT2	18	0.9	0.2	3.3	
<b>Nodalni status</b>					
N0	7	0.8	0.5	2.1	<b>0.05</b>
N+	24	0.8	0.2	1.8	
<b>Histološki tip</b>					
IDC	18	0.8	0.3	3.3	0.9
ILC	13	0.8	0.4	1.8	
<b>Histološki gradus</b>					
G1	6	0.9	0.2	0.9	0.08
G3	6	0.8	0.4	3.3	
<b>IR</b>					
<b>Veličina tumora</b>					
pT1	19	6.1	1.2	47.5	0.8
pT2	18	6.4	0	64.2	
<b>Nodalni status</b>					
N0	7	6.3	0	30.5	0.6
N+	24	5.9	0.6	24.9	
<b>Histološki tip</b>					
IDC	18	6.3	0	47.5	0.2
ILC	13	5.9	1.2	17.3	
<b>Histološki gradus</b>					
G1	6	6.1	2	14.7	0.5
G3	6	6.4	0	27.1	

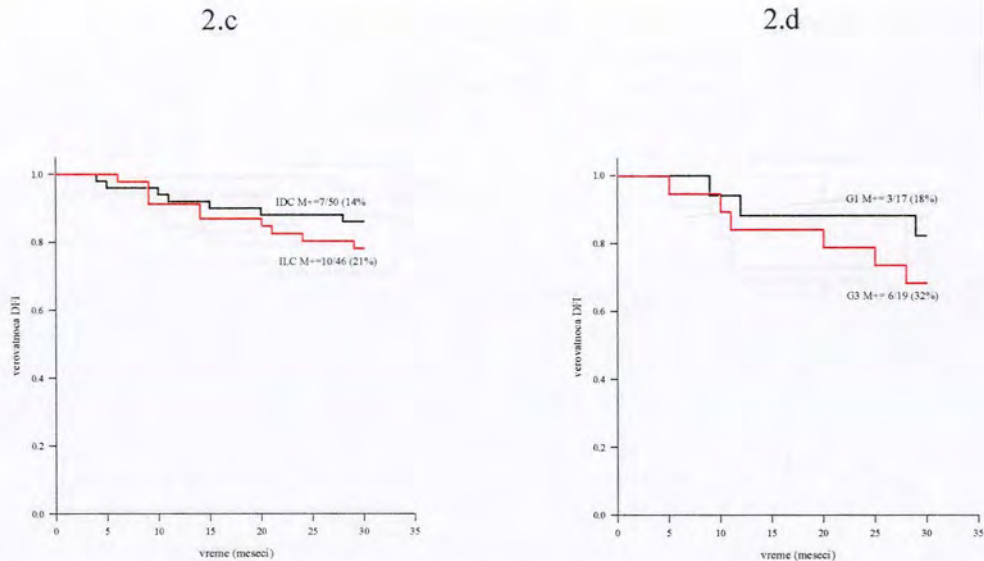
<sup>a</sup>Mann-Whitney  
test

#### IV.1.4. Prediktivni značaj patohistoloških parametara

Grupa pacijentkinja praćena 2.5 godina, koja je primala adjuvantnu terapiju tamoksifenom, podeljena je prema klasičnim patohistološkim parametrima na određene podgrupe. Zatim su verovatnoće DFI datih podgrupa određivane log-rank testom. Jedina statistički relevantna razlika dobijena je poređenjem podgrupa definisanih prema veličini tumora. Pacijentkinje sa pT1 tumorima, manjim od 2 cm, imaju manji procenat pojave udaljenih metastaza od pT2,3 podgrupe ( $p=0.03$ ) (Slika 2).



**Slika 2.** Krive verovatnoće DFI prvih 2.5 godina praćenja toka bolesti u zavisnosti od fenotipova pacijentkinja definisanih klasičnim patohistološkim parametrima prognoze: a) veličinom tumora, b) brojem zahvaćenih limfnih čvorova



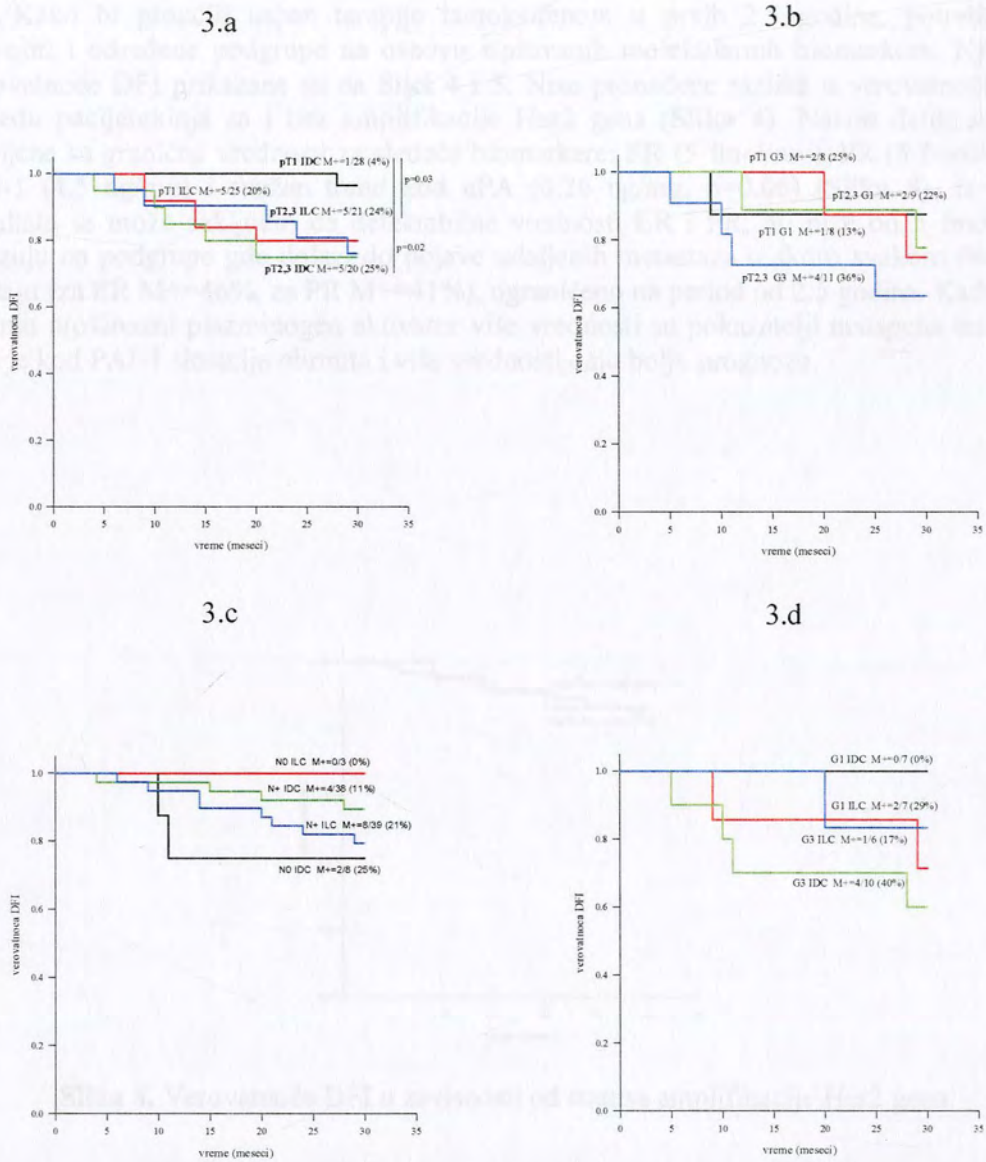
**Slika 2.** Krive verovatnoće DFI prvih 2.5 godina praćenja toka bolesti u zavisnosti od fenotipova pacijentkinja definisanih klasičnim patohistološkim parametrima prognoze: c) histološkim tipom tumora i d) histološkim gradusom

#### IV.1.5. Prediktivni značaj fenotipova dobijenih kombinacijom klasičnih patohistoloških parametara

Na **Slici 3** prikazane su verovatnoće DFI podgrupa dobijenih kombinacijom različitih patohistoloških parametara. Analize verovatnoća nam mogu dati bolje informacije o uspehu terapije tamoksifenom tokom ranog perioda praćenja od 2.5 godina. Statistički značajna razlika dobijena između podgrupe koju čine pacijentkinje sa povoljnom manjom veličinom tumora pT1 i histološkim tipom IDC i podgrupa sa većim tumorima pT2,3 i histološkim tipovima IDC i ILC ( $p=0.02$ ,  $p=0.03$ ; respektivno). Između ostalih podgrupa nije nađena statistički značajna razlika. Ali i pored toga mogu se izdvojiti pacijentkinje sa gradusom 1 i karcinomom duktalnog tipa, kao podgrupa kod koje nije došlo do pojava udaljenih metastaza u prvih 2.5 godine terapije. Slična je i grupa N0 ILC, ali zbog manjeg broja pacijenata u odnosu na ostale ( $n=3$ ), nije uzeta u obzir.

IV.1.6. Prediktivni značaj histopatoloških parametara

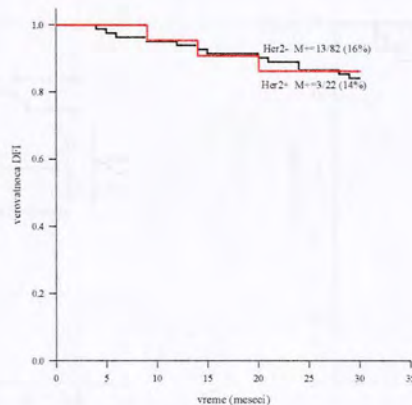
Kada bi prva grupa ispitanika bila podijeljena u dvije grupe prema veličini tumora i histološkom tipu, druga grupa u dvije grupe prema veličini tumora i histološkom tipu, a treća grupa u dvije grupe prema veličini tumora i histološkom tipu, onda bi se rezultati prikazali na slici 3.1-3.4. Na osnovu rezultata prikazanih u slici 3.1-3.4, može se zaključiti da veličina tumora i histološki tip imaju značajnu ulogu u predviđanju DFI.



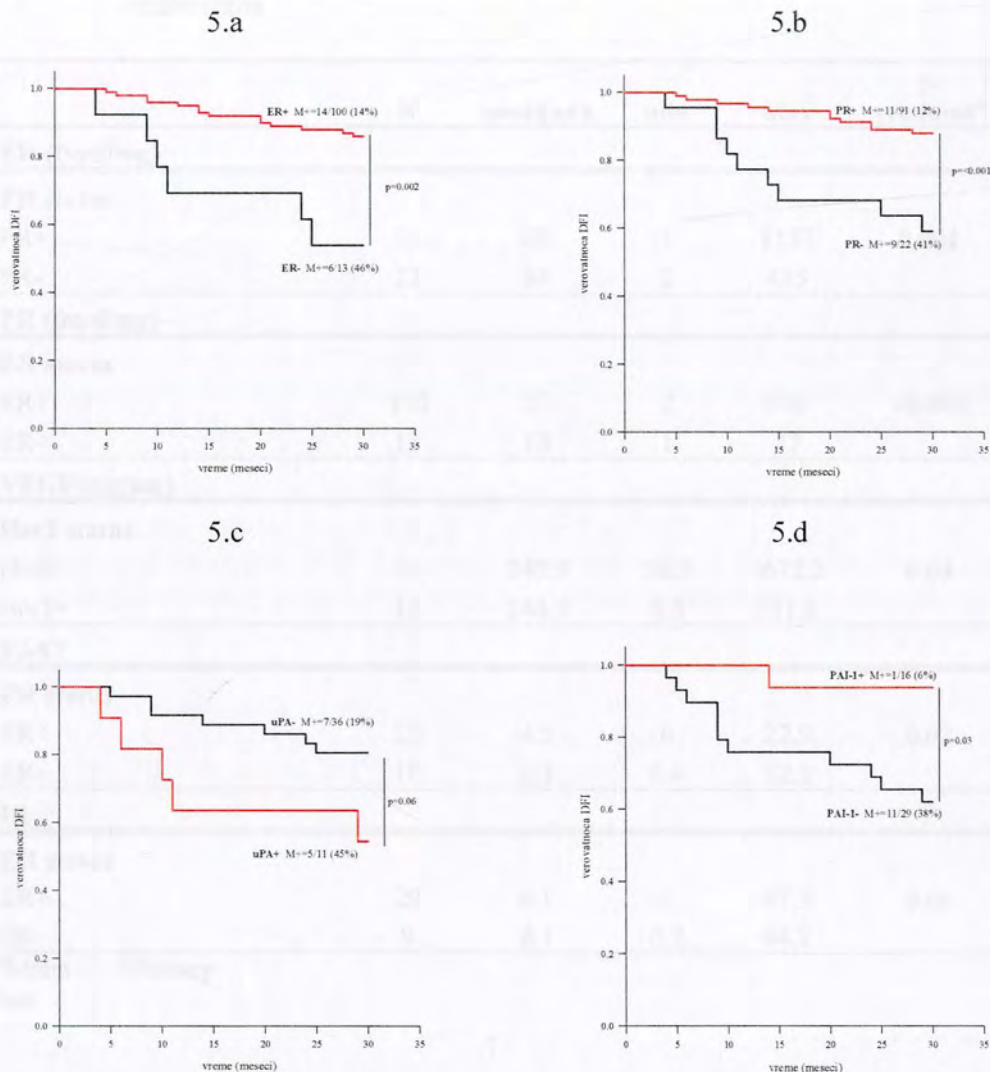
**Slika 3.** Verovatnoće DFI prvih 2.5 godina praćenja toka bolesti dobijenih kombinacijom klasičnih patohistoloških parametara: a) veličina tumora i histološki tip, b) veličina tumora i gradus, c) broj limfnih čvorova i histološki tip i d) histološki gradus i histološki tip

#### IV.1.6. Prediktivni značaj ispitivanih molekularnih biomarkera

Kako bi proučili uspeh terapije tamoksifenom u prvih 2.5 godine, potrebno je izdvojiti i određene podgrupe na osnovu ispitivanih molekularnih biomarkera. Njihove verovatnoće DFI prikazane su na **Slici 4 i 5**. Nisu pronađene razlike u verovatnoći DFI između pacijentkinja sa i bez amplifikacije Her2 gena (**Slika 4**). Nakon datih analiza dobijene su granične vrednosti za sledeće biomarkere: ER (5 fmol/mg), PR (5 fmol/mg), PAI-1 (4.5 ng/mg) i snažan trend kod uPA (0.26 ng/mg,  $p=0.06$ ) (**Slika 5**). Iz datih rezultata se može zaključiti da detektabilne vrednosti ER i PR, ali niže od 5 fmol/mg, ukazuju na podgrupe gde dolazi do pojave udaljenih metastaza u skoro svakom drugom slučaju (za ER  $M+=46\%$ , za PR  $M+=41\%$ ), ograničeno na period od 2.5 godina. Kada je u pitanju urokinazni plazminogen aktivator više vrednosti su pokazatelji neuspeha terapije, dok je kod PAI-1 situacija obrnuta i više vrednosti daju bolju prognozu.



**Slika 4.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od statusa amplifikacije Her2 gena



**Slika 5.** Verovatnoće DFI prvih 2.5 godina praćenja toka bolesti u zavisnosti od statusa ispitivanih molekularnih biomarkera: a) ER , b) PR , c) uPA i d) PAI-1

Dobijanjem podgrupa pacijentkinja na osnovu graničnih vrednosti molekularnih biomarkera, urađena je raspodela nivoa ekspresije svih molekula koji su obuhvaćeni istraživanjem. Uočeno je da u podgrupi PR-pozitivnih pacijentkinja postoje znatno više koncentracije ER. Pacijentkinje koje imaju negativne vrednosti receptora za estrogen, što ih svrstava u visokorizičnu grupu, imaju takođe znatno više vrednosti indeksa proliferacije Ki-67 i indeksa rasta. Mann-Whitney testom je takođe određeno da u Her2-negativnoj podgrupi postoje povišeni nivoi VEGF (**Tabela V**).



**Tabela V** Ekspresija biomarkera u grupama definisanim prema dobijenim graničnim vrednostima

	N	medijana	min	max	p-vrednost <sup>a</sup>
<b>ER (fmol/mg)</b>					
<b>PR status</b>					
PR+	91	69	1	1157	<b>0.001</b>
PR-	22	84	2	415	
<b>PR (fmol/mg)</b>					
<b>ER status</b>					
ER+	100	23	2	948	<b>&lt;0.001</b>
ER-	13	18	1	27	
<b>VEGF (pg/mg)</b>					
<b>Her2 status</b>					
Her2-	24	240.9	36.9	1672.2	<b>0.04</b>
Her2+	12	240.9	6.5	571.8	
<b>Ki-67</b>					
<b>ER status</b>					
ER+	29	4.5	0	22.9	<b>0.02</b>
ER-	10	5.3	0.4	32.3	
<b>IR</b>					
<b>ER status</b>					
ER+	29	6.1	0	47.5	<b>0.06</b>
ER-	9	6.1	0.2	64.2	

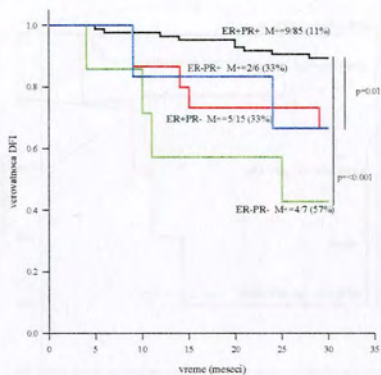
<sup>a</sup>Mann Whitney test

#### IV.1.7. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu molekularnih biomarkera

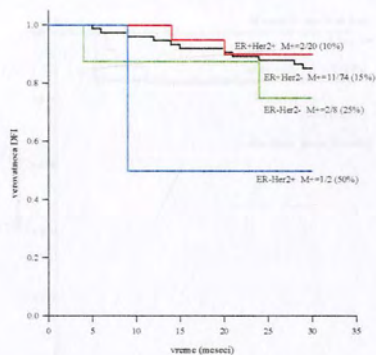
Određujući verovatnoću DFI podgrupa definisanih prema statusu molekularnih biomarkera, dobijeni su rezultati koji omogućavaju definisanje nove visokorizične podgrupe pacijentkinja (**Slika 6**).

- Združeni status ER i PR ukazuje na visokorizičnu grupu sa duplim negativnim statusom receptora (ER-PR-), tj. sa niskim koncentracijama steroidnih receptora manjih od 5 fmol/mg. Druga rizična podgrupa je ER+PR-. Statistički relevantna razlika dobijena je između ER+PR+ i ER-PR- podgrupe ( $p < 0.001$ ) i ER+PR+ i ER+PR- podgrupe ( $p = 0.01$ ).
- Na **Slici 6** pokazano da visoki nivoi ER i PAI-1 daju bolju prognozu za pacijentkinje u ranom praćenju. Kombinacijom ovih biomarkera izdvaja se podgrupa PAI-1+ER+ u kojoj nije bilo pojave udaljenih metastaza tokom prvih 2.5 godina. Statistički značajna razlika pronađena je između ove podgrupe i PAI-1+ER- podgrupe koja je visokorizična ( $p = 0.002$ ). Još jedna statistički značajna razlika nađena je između fenotipova koji su dobijeni združivanjem povoljnog i nepovoljnog statusa, PAI-1+ER- i PAI-1-ER+ ( $p = 0.03$ ).
- Kod podgrupe uPA+PR-, koju čine dva nepovoljna fenotipa, dolazi do pojave udaljenih metastaza čak u 80% slučajeva. Statistički značajna razlika pokazana je između date nepovoljne podgrupe i grupa uPA+PR+ ( $p = 0.007$ ), uPA-PR+ ( $p < 0.001$ ) i uPA-PR- ( $p = 0.04$ ).
- Kao trend izdvaja se visokorizična podgrupa unutar Her2-, to je PR-Her2- fenotip, i PAI-1-PR- podgrupa gde svaki drugi pacijent doživljava relaps u prvih 2.5 godine terapije tamoksifenom.

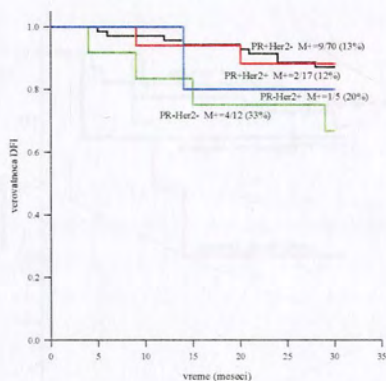
6.a



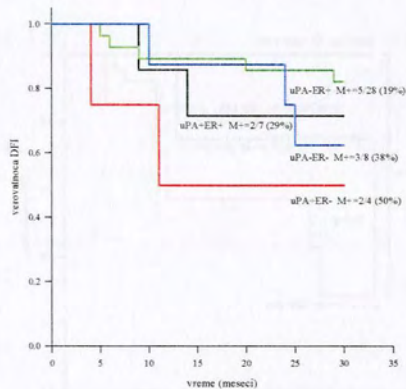
6.b



6.c

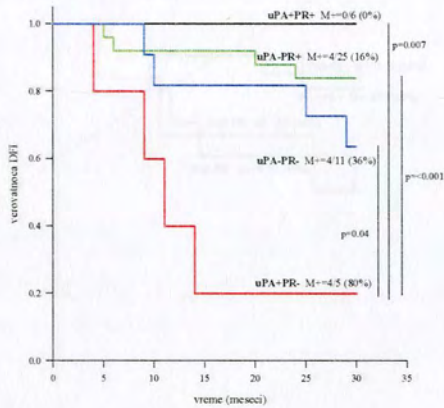


6.d

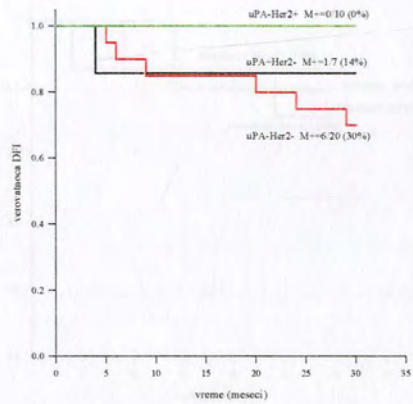


**Slika 6.1.** Verovatnoće DFI prvih 2.5 godina praćenja toka bolesti u zavisnosti od združenog statusa molekularnih biomarkera: a) ER, PR , b) ER, Her2, c) PR, Her2 i d) uPA, ER

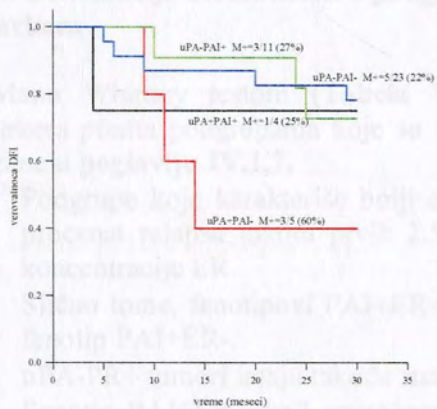
6.e



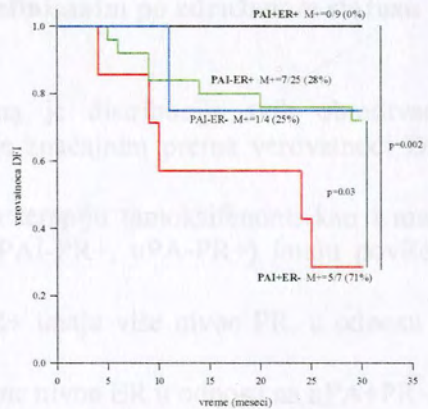
6.f



6.g

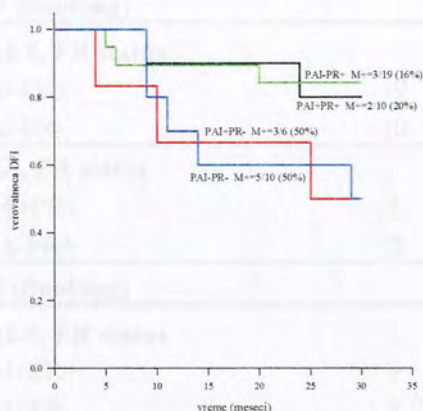


6.h

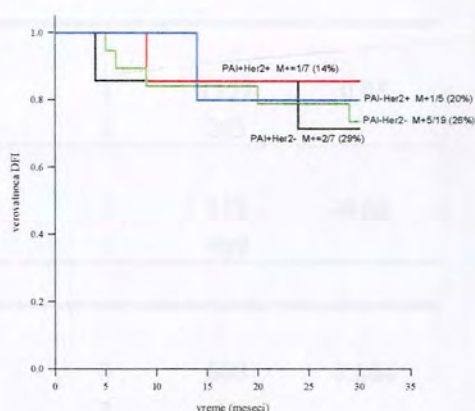


**Slika 6.2.** Verovatnoće DFI prvih 2.5 godina praćenja toka bolesti u zavisnosti od združenog statusa molekularnih biomarkera: e) uPA, PR , f) uPA, Her2 , g) uPA, PAI-1 , h) PAI-1, ER

6.i



6.j



**Slika 6.3.** Verovatnoće DFI prvih 2.5 godina praćenja toka bolesti u zavisnosti od združenog statusa molekularnih biomarkera: i) PAI-1, PR i j) PAI-1, Her2

#### IV.1.8. Distribucija biomarkera u podgrupama definisanim po združenom statusu biomarkera

Mann Whitney testom (**Tabela VI**) praćena je distribucija svih obrađivanih biomarkera prema podgrupama koje su se pokazale značajnim prema verovatnoći DFI, prikazane u **poglavlju IV.1.7**.

- Podgrupe koje karakteriše bolji odgovor na terapiju tamoksifenom, kao i manji procenat relapsa tokom prvih 2.5 godina (PAI-PR+, uPA-PR+) imaju povišene koncentracije ER.
- Slično tome, fenotipovi PAI+ER+ i PAI-ER+ imaju više nivoe PR, u odnosu na fenotip PAI+ER-.
- uPA-PR+ tumori imaju takođe znatno povišene nivoe ER u odnosu na uPA+PR-.
- Fenotip PAI+ER-, koji se pokazao kao negativan po verovatnoći DFI i statusu steroidnih receptora, specifičan je i po znatno višem nivou ćelija u proliferaciji i indeksu rasta tumora.

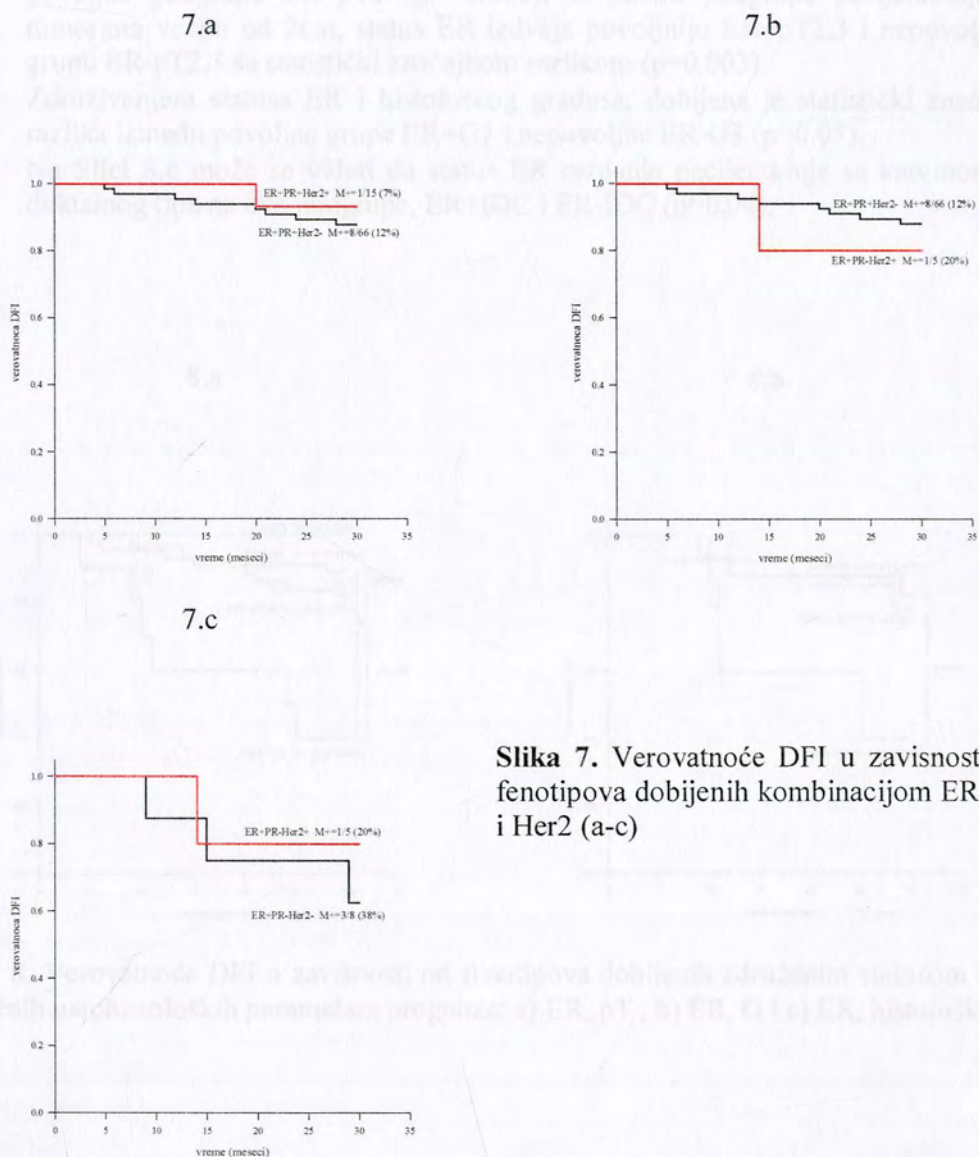
**Tabela VI** Distribucija biomarkera u podgrupama definisanim po združenom statusu molekularnih biomarkera

	<b>N</b>	<b>medijana</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>p-vrednost<sup>a</sup></b>
<b>ER (fmol/mg)</b>					
<b>PAI-1, PR status</b>					
PAI-PR+	19	59	1	1157	<b>0.05</b>
PAI-PR-	10	59	2	265	
<b>uPA, PR status</b>					
uPA+PR-	5	84	2	138	<b>0.06</b>
uPA-PR+	25	59	1	909	
<b>PR (fmol/mg)</b>					
<b>PAI-1, ER status</b>					
PAI+ER+	9	17	3	608	<b>0.004</b>
PAI+ER-	7	18	2	21	
PAI+ER-	7	18	2	21	<b>0.04</b>
PAI-ER+	25	20	2	948	
<b>Ki-67</b>					
<b>PAI-1, ER status</b>					
PAI+ER+	9	4.5	1.3	22.9	<b>0.02</b>
PAI+ER-	5	5.3	16.7	32.3	
PAI+ER-	5	5.8	16.7	32.3	<b>&lt;0.001</b>
PAI-ER+	20	4.9	0	12.34	
<b>IR</b>					
<b>PAI-1, ER status</b>					
PAI+ER+	9	6.3	2	18.9	<b>0.02</b>
PAI+ER-	5	6.4	11.3	64.2	
PAI+ER-	5	7.3	11.3	64.2	<b>0.01</b>
PAI-ER+	20	6.1	0	47.5	

<sup>a</sup>Mann Whitney test

**IV.1.9. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu ER, PR i Her2**

Povezivanjem povoljnih i nepovoljnih statusa steroidnih receptora i Her2, nisu pronađene razlike u verovatnoći DFI (Slika 7).

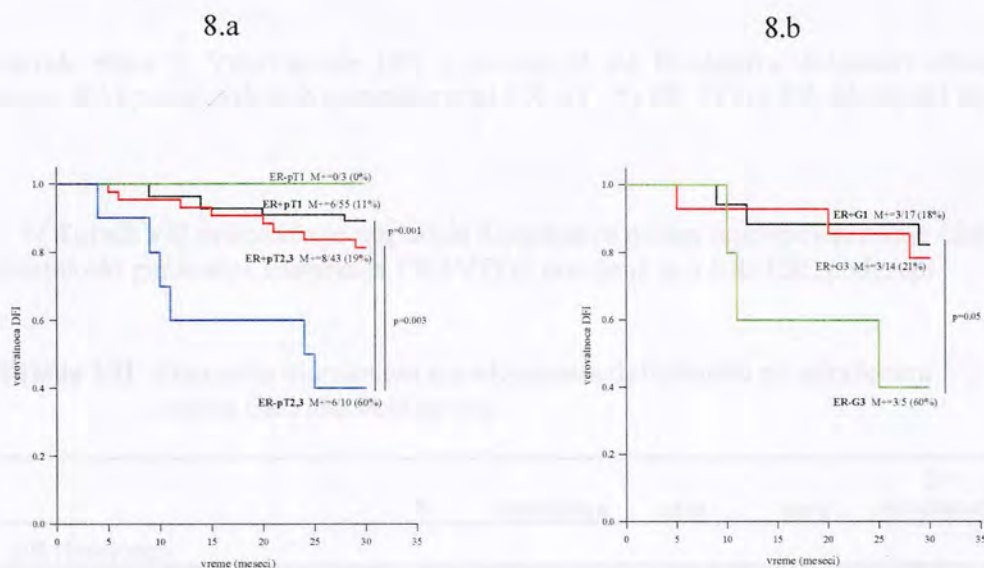


**Slika 7.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih kombinacijom ER, PR i Her2 (a-c)

#### IV.1.10. Prediktivni značaj združenog statusa ER i klasičnih patohistoloških parametara prognoze

ER je značajni prediktor uspeha terapije tamoksifenom. Spajanjem sa klasičnim parametrima prognoze izdvojene su visokorizične grupe za period od 2.5 godina (Slika 8).

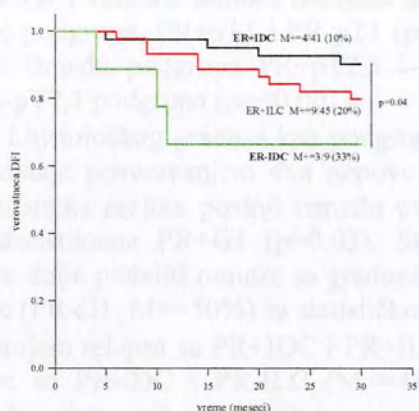
- U kombinaciji statusa ER i veličine tumora izdvaja se visokorizična podgrupa ER-pT2,3, u kojoj dolazi do pojave udaljenih metastaza kod svakog drugog pacijenta. Statistički značajna razlika pronađena je između date nepovoljne ER-pT2,3 i povoljne podgrupe ER+pT1 ( $p=0.001$ ). U okviru podgrupe pacijentkinja sa tumorima većim od 2cm, status ER izdvaja povoljniju ER+pT2,3 i nepovoljniju grupu ER-pT2,3 sa statistički značajnom razlikom ( $p=0.003$ ).
- Združivanjem statusa ER i histološkog gradusa, dobijena je statistički značajna razlika između povoljne grupe ER+G1 i nepovoljne ER-G3 ( $p=0.05$ ).
- Na Slici 8.c može se videti da status ER razdvaja pacijentkinje sa karcinomom duktalnog tipa na dve podgrupe, ER+IDC i ER-IDC ( $p=0.04$ ).



**Slika 8.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom ER i klasičnih patohistoloških parametara prognoze: a) ER, pT, b) ER, G i c) ER, histološki tip



8.c



**Nastavak Slike 8.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom ER i patohistoloških parametara: a) ER, pT , b) ER, G i c) ER, histološki tip

U **Tabeli VII** prikazana je raspodela biomarkera prema fenotipovima koje čine ER i patohistološki parametri. Ekspresija PR i VEGF povišena je u ER+IDC podgrupi.

**Tabela VII** Ekspresija biomarkera u podgrupama definisanim po združenom statusu ER i histološkog tipa

	N	medijana	min	max	p- vrednost <sup>a</sup>
<b>PR (fmol/mg)</b>					
<b>ER, IDC status</b>					
ER+IDC	41	22	3	948	<0.001
ER-IDC	9	17	1	27	
<b>VEGF (pg/mg)</b>					
<b>ER, IDC status</b>					
ER+IDC	14	375	44.7	4535	0.06
ER-IDC	4	358	213	2806.7	

<sup>a</sup>Mann Whitney test

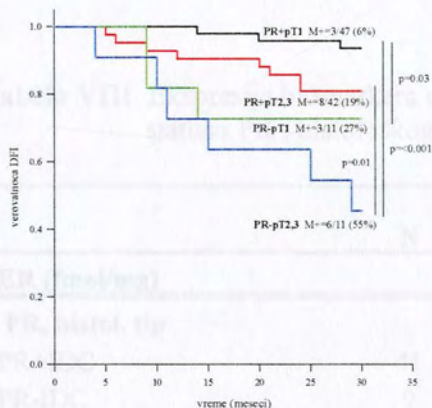
#### IV.1.11. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu PR i klasičnih patohistoloških parametara prognoze

Radi daljeg izolovanja podgrupa koje bi imale koristi od druge vrste terapije, analizirali smo verovatnoće DFI fenotipova dobijenih povezivanjem statusa PR i klasičnih parametara prognoze (Slika 9).

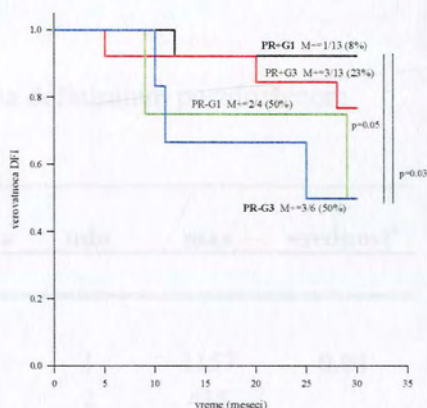
- Povezivanjem statusa PR i veličine tumora dobijena je statistička razlika između povoljne i nepovoljne podgrupe, PR+pT1 i PR-pT1 ( $p=0.03$ ). Statistički značajna razlika dobijena je i između podgrupa PR+pT2.3 i PR-pT2.3 ( $p=0.01$ ), kao i između PR+pT1 i PR-pT2,3 podgrupa ( $p<0.001$ ).
- U slučaju statusa PR i histološkog gradusa kao podgrupa sa najviše relapsa (50%) javlja se ona koja nastaje povezivanjem dva nepovoljna parametra, negativnog statusa PR i G3. Statistička razlika postoji između ove podgrupe i podgrupe sa najpovoljnijim karakteristikama PR+G1 ( $p=0.03$ ). Status PR, kao i u slučaju veličine tumora, može dalje podeliti tumore sa gradusom 1 na povoljne (PR+G1,  $M+=8\%$ ) i nepovoljne (PR-G1,  $M+=50\%$ ) sa statističkom razlikom ( $p=0.05$ ).
- Podgrupe sa malim brojem relapsa su PR+IDC i PR+ILC (7%, 17%; respektivno). Nepovoljne podgrupe su PR-IDC i PR-ILC ( $M+=44\%$ ,  $M+=40\%$ ). Statistička razlika postoji upoređivanjem ovih povoljnih i nepovoljnih podgrupa (PR+IDC i PR-IDC  $p=0.001$ , PR+IDC i PR-ILC  $p=0.005$ , PR+ILC i PR-IDC,  $p=0.04$ ).

U Tabeli VIII prikazana je distribucija molekularnih biomarkera prema statusu stvaranja podgrupe dobijenim u pogledu IV.118. Povećanje DFI pokazano je u podgrupama PR+ILC i PR+ILC, a u prvom od dva postepa (povećanje DFI). Povećanje PR+ILC i PR-IDC podgrupe, nepovoljnija podgrupe PR-IDC ima i povoljan statusu u praksi u PA.

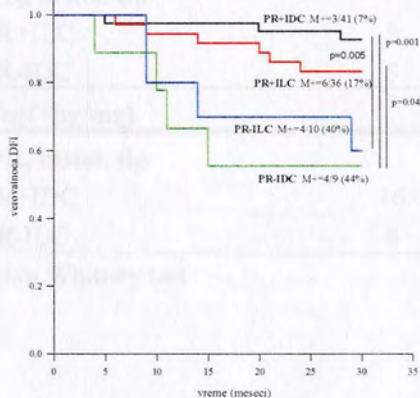
9.a



9.b



9.c



**Slika 9.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom PR i klasičnih patohistoloških parametara prognoze: a) PR, pT, b) PR, G i c) PR, histološki tip

U **Tabeli VIII** prikazana je distribucija molekularnih biomarkera prema statistički relevantnim podgrupama dobijenim u poglavlju **IV.1.10**. Povišeni nivo ER pokazan je u podgrupama PR+IDC i PR+ILC, a u prvoj od dve postoji i povišeni nivo VEGF. Poređenjem PR+ILC i PR-IDC podgrupe, nepovoljnija podgrupa PR-IDC ima i povišenu ekspresiju uPA.

**Tabela VIII** Ekspresija biomarkera u podgrupama definisanim po združenom statusu PR i histološkog tipa

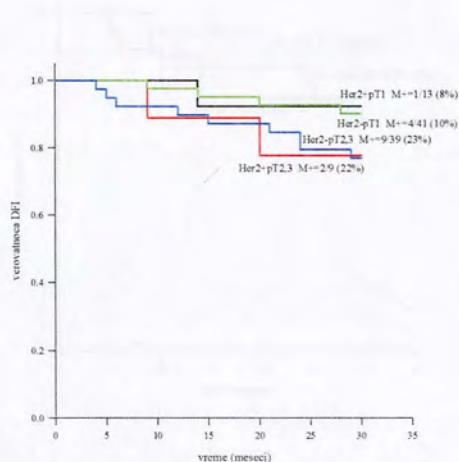
	N	medijana	min	max	p- vrednost <sup>a</sup>
<b>ER (fmol/mg)</b>					
<b>PR, histol. tip</b>					
PR+IDC	41	69	1	1157	<b>0.04</b>
PR-IDC	9	74	2	415	
<b>PR+ILC</b>					
PR-IDC	36	64	3	658	<b>0.01</b>
PR-IDC	9	74	2	415	
<b>uPA (ng/mg)</b>					
<b>PR, histol. tip</b>					
PR+ILC	8	0.14	0.06	0.17	<b>0.06</b>
PR-IDC	5	0.18	0.12	0.6	
<b>Vegf (pg/mg)</b>					
<b>PR, histol. tip</b>					
PR+IDC	16	375	44.7	4535	<b>0.06</b>
PR-ILC	8	358	6.5	567.5	

<sup>a</sup>Man Whitney test

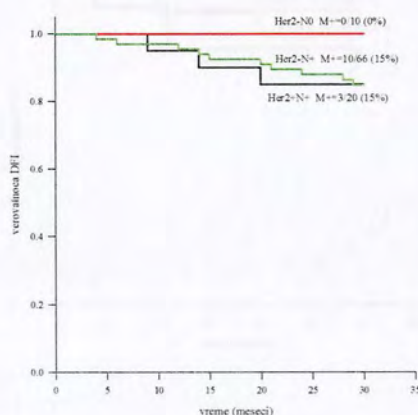
#### IV.1.12. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu Her2 i klasičnih parametara prognoze

Kombinacija klasičnih patohistoloških parametara prognoze i statusa amplifikacije Her2 gena nije dala statistički relevantne rezultate (Slika 10). Iako nisu dobijene podgrupe koje bolje ili lošije odgovaraju na terapiju tamoksifenom, možemo izdvojiti dve po specifičnosti. Podgrupa bez amplifikacije Her2 gena i bez zahvaćenih limfnih čvorova nema pojavu metastaza tokom perioda praćenja toka bolesti od 2.5 godine. Druga karakteristika je da u okviru ovog praćenja svi Her2+ tumori imaju i zahvaćene limfne čvorove.

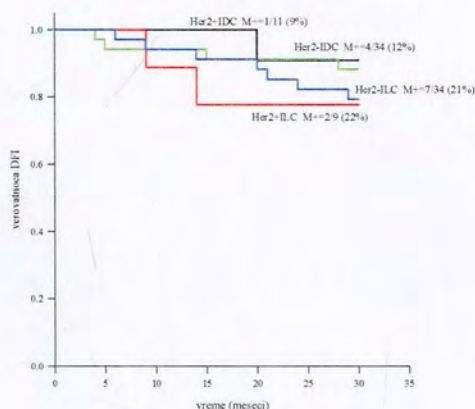
10.a



10.b



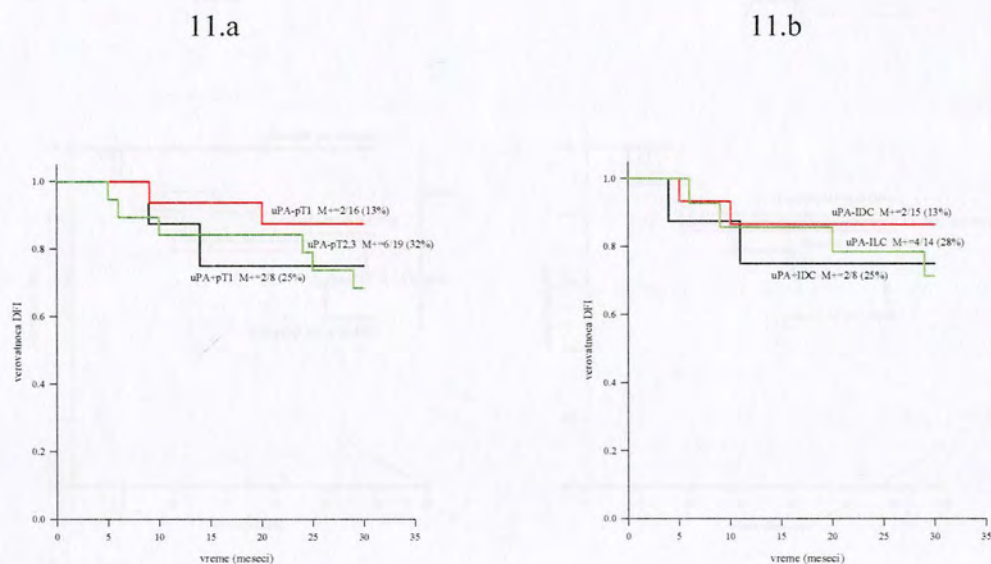
10.c



**Slika 10.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom Her2 i klasičnih patohistoloških parametara prognoze: a) Her2, pT , b) Her2, N i c) Her2, histološki tip

#### IV.1.13. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu uPA i klasičnih patohistoloških parametara prognoze

Združeni status uPA i klasičnih patohistoloških parametara prognoze, veličina i histološki tip tumora, nije ukazao na postojanje podgrupa sa različitim rizikom od pojave udaljenih metastaza (Slika 11). Na Slici 11.a nije prikazan fenotip uPA+pT2,3 zbog malog broja pacijentkinja (n=3), a izostavljen je i fenotip uPA+ILC (n=2) iz istog razloga na Slici 11.b.

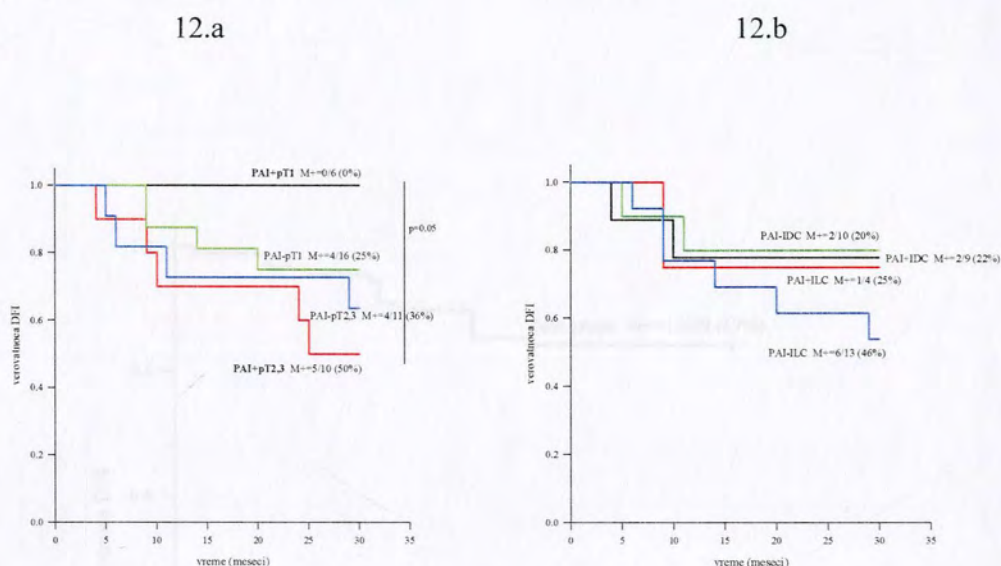


**Slika 11.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom uPA i klasičnih patohistoloških parametara prognoze: a) uPA, pT , b) uPA, histološki tip

#### IV.1.14. Prediktivni značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu PAI-1 i klasičnih patohistoloških parametara prognoze

Povišene koncentracije PAI-1, kao što je pokazano našim istraživanjem, ukazuju na bolju prognozu u prvih 2.5 godina. Povezivanjem sa klasičnim parametrima prognoze pronađena je statistička razlika samo između podgrupe PAI+pT1 (bez relapsa) i PAI+pT2,3 (50% udaljenih metastaza) ( $p=0.05$ ) (Slika 12).

Na Slici 12 prikazane su verovatnoće DFI za dve grupe u periodu od 2.5 godina prognoze. U ovom periodu dolazi do pojave udaljenih metastaza kod 17% pacijenata.

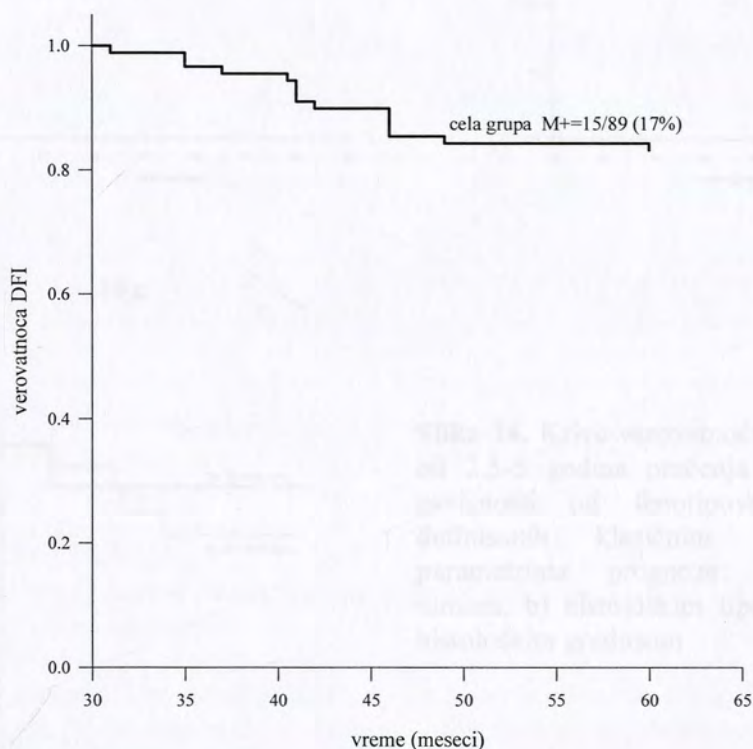


**Slika 12.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom PAI-1 i klasičnih parametara prognoze: a) PAI-1, pT, b) PAI-1, histološki tip

#### IV.2. TOK BOLESTI U PERIODU IZMEĐU 2.5 I 5 GODINA TERAPIJE TAMOKSIFENOM

Antiestrogena terapija tamoksifenom u grupi pacijentkinja sa detektabilnim nivoima ER traje 5 godina. U ovom poglavlju razmatrali smo verovatnoće DFI u periodu nakon 2.5 godine terapije, pa do kraja pete godine, tj. do završetka terapije. Drugim rečima, posmatrana je podgrupa pacijentkinja kod kojih nije došlo do pojave udaljenih metastaza tokom prvih 2.5 godina terapije tamoksifenom.

Na **Slici 13** prikazana je verovatnoća DFI za celu grupu u periodu od 2.5-5 godina terapije. U ovom periodu dolazi do pojave udaljenih metastaza kod 17% pacijentkinja.

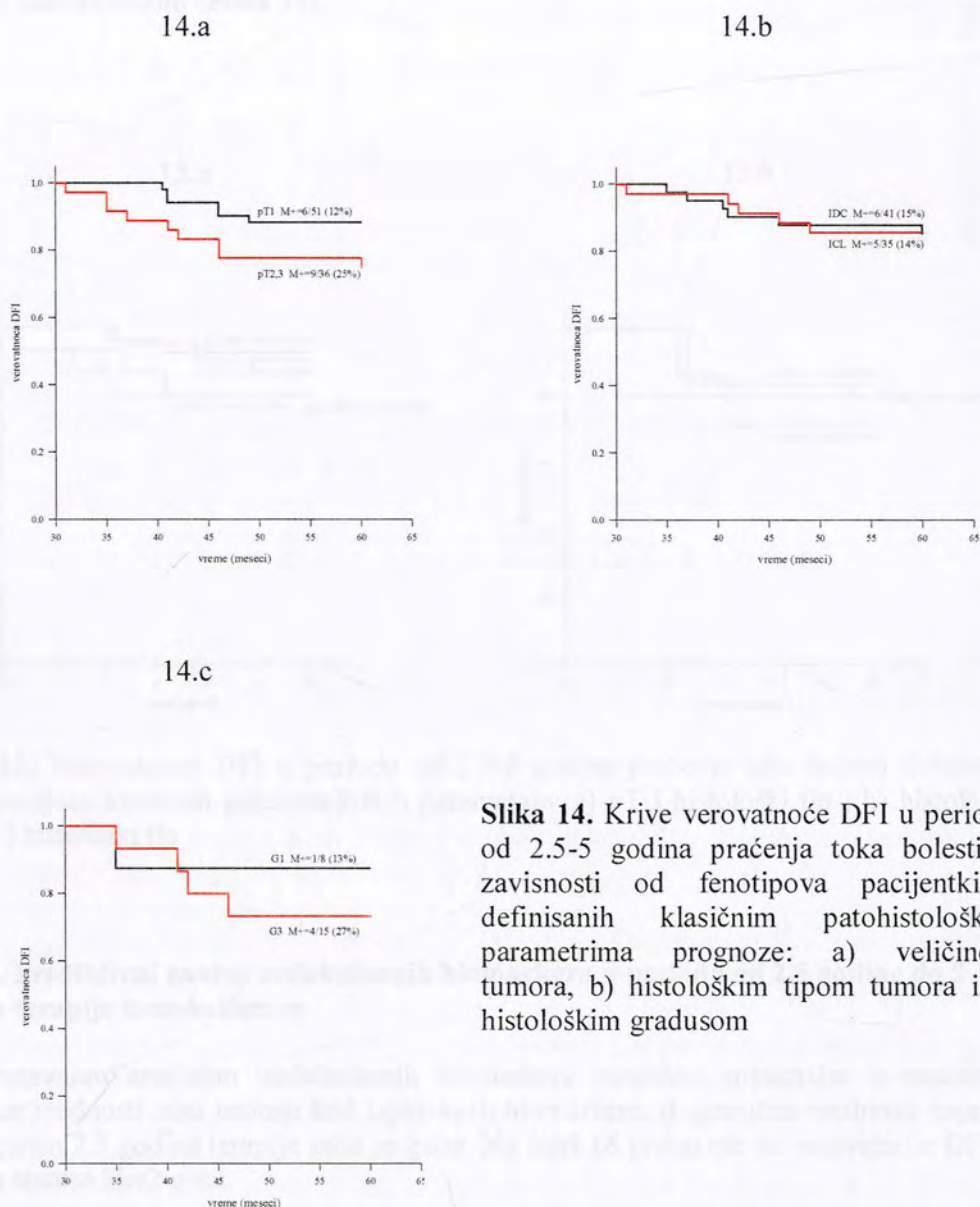


**Slika 13.** Verovatnoća DFI u celoj grupi pacijentkinja u periodu od 2.5 godine do 5 godina praćenja toka bolesti



## IV.2.1. Prediktivni značaj patohistoloških parametara

Na slici 14 prikazane su verovatnoće DFI za klasične patohistološke parametre.



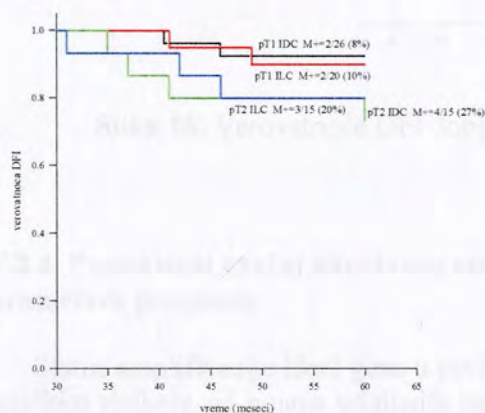
**Slika 14.** Krive verovatnoće DFI u periodu od 2.5-5 godina praćenja toka bolesti u zavisnosti od fenotipova pacijentkinja definisanih klasičnim patohistološkim parametrima prognoze: a) veličinom tumora, b) histološkim tipom tumora i c) histološkim gradusom

Datim rezultatima pokazano je da klasični patohistološki parametri prognoze ne izdvajaju povoljne i nepovoljne podgrupe pacijentkinja u periodu nakon 2.5 godina primanja terapije tamoksifenom. Značajnost i prednost pT1 podgrupe tokom prve 2.5 godine gubi se kada posmatramo pacijentkinje u ovom periodu. Podgrupe dobijene prema statusu limfnih čvorova nisu prikazane zbog malog broja pacijentkinja.

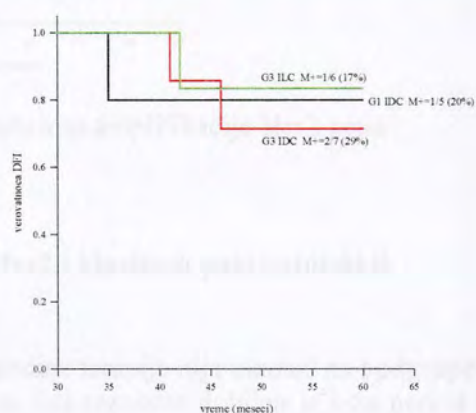
#### IV.2.2. Prediktivni značaj fenotipova dobijenih kombinacijom klasičnih patohistoloških parametara

Analizom fenotipova dobijenih spajanjem patohistoloških parametara nije pronađena statistička razlika koja bi ukazala na povoljne/nepovoljne grupe i njihov odgovor na terapiju tamoksifenom (Slika 15).

15.a



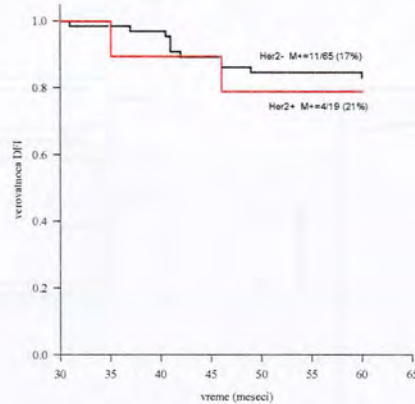
15.b



**Slika 15.** Verovatnoće DFI u periodu od 2.5-5 godina praćenja toka bolesti dobijenih kombinacijom klasičnih patohistoloških parametara: a) pT i histološki tip i b) histološki gradus i histološki tip

#### IV.2.3. Prediktivni značaj molekularnih biomarkera u periodu od 2.5 godine do 5 godina terapije tamoksifenom

Ponovnom analizom molekularnih biomarkera metodom minimalne p-vrednosti, granične vrednosti nisu nađene kod ispitivanih biomarkera, tj. granične vrednosti koje su važile prvih 2.5 godina terapije sada se gube. Na Slici 16 prikazane su verovatnoće DFI u slučaju statusa Her2 gena.



Slika 16. Verovatnoće DFI dobijene statusom amplifikacije Her2 gena

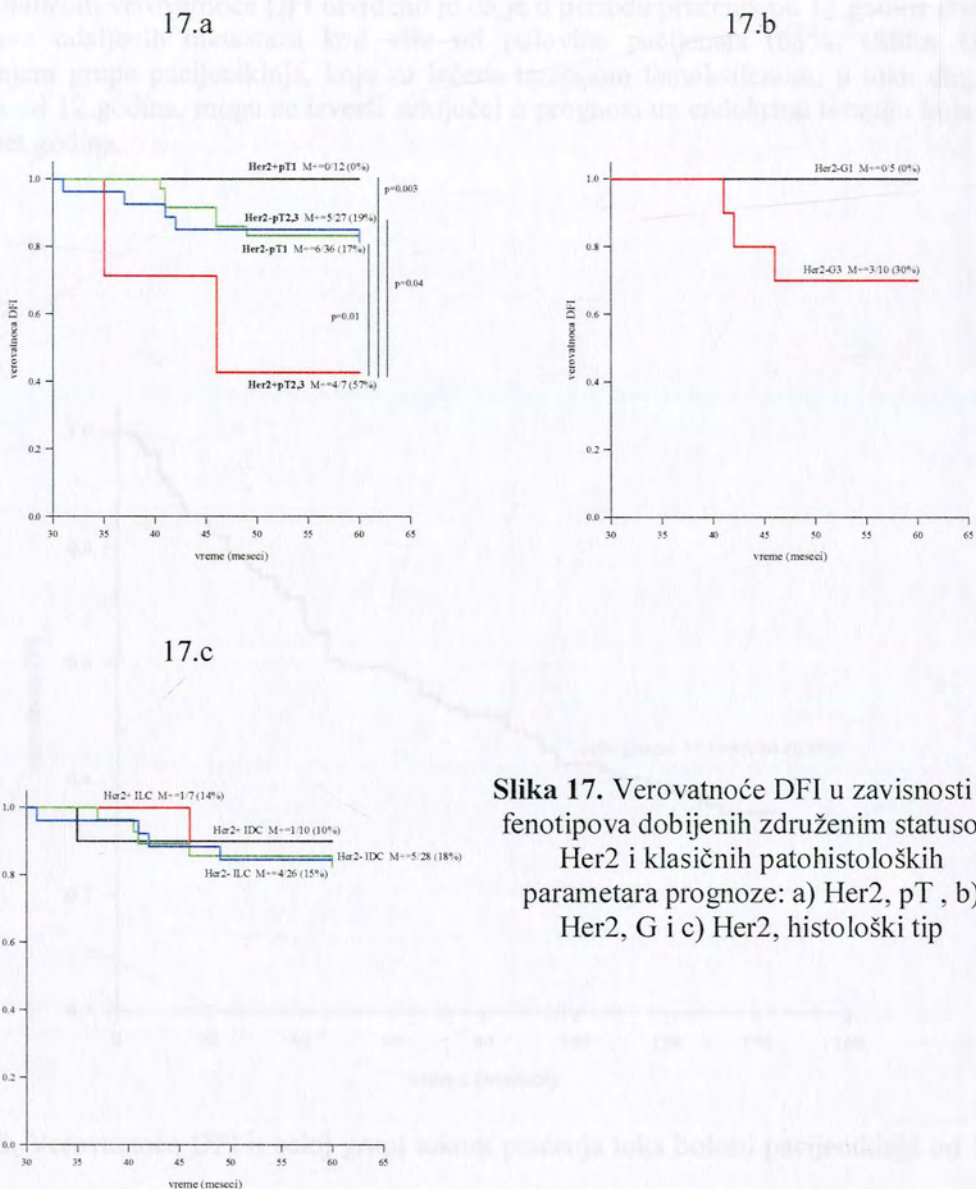
#### IV.2.4. Prediktivni značaj združenog statusa Her2 i klasičnih patohistoloških parametara prognoze

Status amplifikacije Her2 gena u prvih 2.5 godine terapije nije ukazao na podgrupe sa različitim rizikom od pojava udaljenih metastaza. Isti rezultat dobijen je i za period od 2.5-5 godina terapije.

- Združivanjem statusa Her2 gena i klasičnih patohistoloških parametara prognoze u periodu od 2.5-5 godina terapije, na **Slici 17.a** prikazane su razlike u verovatnoći DFI. Veličina tumora može razdvojiti Her2-pozitivne tumore na dve podgrupe sa statističkom razlikom u verovatnoći DFI ( $p=0.003$ ). Kao specifična izdvaja se Her2+pT1 podgrupa, bez relapsa u ovom periodu ( $M+=0/12$  (0%)). Nasuprot tome Her2 status razdvaja podgrupu pT2,3 ( $p=0.04$ ). Analiza ovih fenotipova pokazala je još jednu razliku u verovatnoći DFI, između podgrupa Her2+pT2,3 i Her2-pT1 ( $p=0.01$ ), gde je povoljnija podgrupa Her2-pT1 sa 17% relapsa.
- Statistički značajne razlike nisu dobijene povezivanjem sa histološkim gradusom. Jedino izdvajamo podgrupu Her2-G1, koja je nastala spajanjem dva povoljna statusa, bez pojave udaljenih metastaza u ovom periodu ( $M+=0/5$  (0%)). Zbog malog broja pacijentkinja nisu prikazane podgrupe Her2+G1 i Her2+G3.
- Nije bilo razlika spajanjem statusa Her2 gena i histološkog tipa tumora.

IV.3. TOK BOLESTI I PERIODI PRAĆENJA OD 12 GODINA

Analiza verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom Her2 i klasičnih patohistoloških parametara prognoze: a) Her2, pT, b) Her2, G i c) Her2, histološki tip



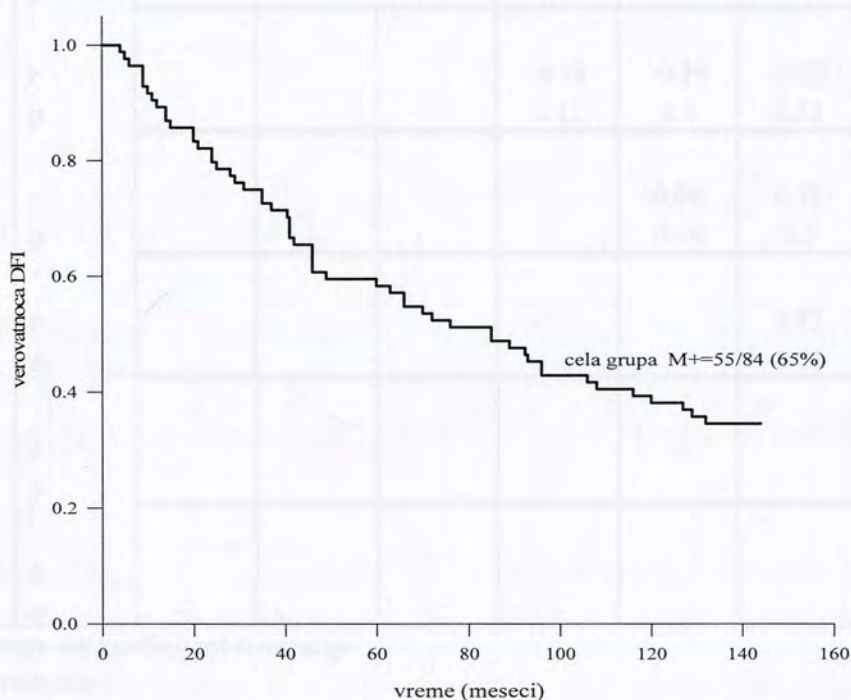
**Slika 17.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom Her2 i klasičnih patohistoloških parametara prognoze: a) Her2, pT, b) Her2, G i c) Her2, histološki tip

IV.3.1. Korišćenje skorovlje molekularnih biomarkera

Korišćenje molekularnih biomarkera igraće se Sverdlovom i drugim istraživačima i predstavljaju se Tabelom IX. Pozitivna korelacija pronađena je u slučaju ER i PR ( $p=0.001$ ), Ki-67 i ER ( $p=0.001$ ), VEGF i ER ( $p=0.02$ ). Negativna statistički značajna korelacija otkrivena je između ER i Ki-67 ( $p=0.04$ ). Kada se u poređju pogled pacijentkinja nisu pronađene korelacije sa molekularnim biomarkerima.

### IV.3. TOK BOLESTI U PERIODU PRAĆENJA OD 12 GODINA

Analizom verovatnoće DFI utvrđeno je da je u periodu praćenja od 12 godina došlo do pojave udaljenih metastaza kod više od polovine pacijenata (65%) (**Slika 19**). Ispitivanjem grupe pacijentkinja, koje su lečene terapijom tamoksifenom, u toku dugog praćenja od 12 godina, mogu se izvesti zaključci o prognozi uz endokrinu terapiju koja je trajala pet godina.



**Slika 18.** Verovatnoća DFI u celoj grupi tokom praćenja toka bolesti pacijentkinja od 12 godina

#### IV.3.1. Korelacije ekspresije molekularnih biomarkera

Korelacije molekularnih biomarkera ispitivane su Spearman-ovim testom korelacija i predstavljene su **Tabelom IX**. Pozitivna korelacija pronađena je u slučaju ER i PR ( $p < 0.001$ ), Ki-67 i IR ( $p < 0.001$ ) i Vegf i uPA ( $p = 0.02$ ). Negativna, statistički značajna korelacija, otkrivena je između PR i PAI-1 ( $p = 0.04$ ). Kada su u pitanju godine pacijentkinja, nisu pronađene korelacije sa molekularnim biomarkerima.

Tabela IX Korelacije ekspresije molekularnih biomarkera

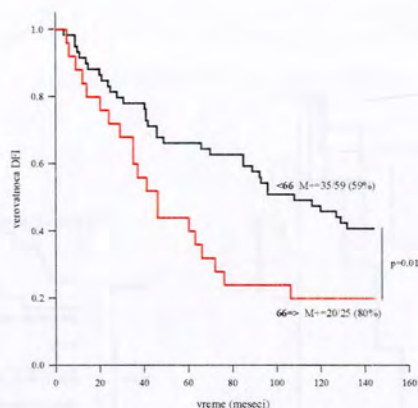
		PR	Ki-67	Ai	IR	VEGF	uPA	PAI-1
ER	r	0.61	-0.19	-0.03	-0.03	0.07	-0.105	-0.3
	p	<b>&lt;0.001</b>	0.3	0.9	0.83	0.64	0.53	0.12
PR	r		-0.06	0.15	0.07	-0.009	-0.308	-0.36
	p		0.7	0.42	0.7	0.9	0.06	<b>0.04</b>
Ki-67	r			0.22	0.62	0.19	0.18	0.09
	p			0.24	<b>&lt;0.001</b>	0.29	0.34	0.62
Ai	r				-0.28	-0.19	-0.22	0.07
	p				0.12	0.3	0.22	0.7
IR	r					0.06	0.12	-0.07
	p					0.74	0.5	0.7
VEGF	r						0.37	-0.1
	p						<b>0.02</b>	0.6
uPA	r							0.18
	p							0.31
PAI	r							
	p							

r – Spearman-ov koeficijent korelacije

p – verovatnoća

#### IV.3.2. Prognostički značaj kliničko-patoloških parametara

Proučavajući verovatnoće DFI između kliničko-patoloških parametara, jedina statistički značajna razlika dobijena je u slučaju godina pacijentkinja ( $p=0.01$ ) (**Slika 19**). Metodom minimalne p-vrednosti uočeno je da pacijentkinje, koje su u trenutku otkrivanja bolesti imale manje od 66 godina imaju znatno manji rizik od pojave udaljenih metastaza tokom perioda od 12 godina (59%). Kod podgrupe pacijentkinja starijih od 66 godina u periodu praćenja od 12 godina dolazi do 20 relapsa od 25 pacijentkinja, tj. 80%. Veličina tumora, status limfnih čvorova, histološki tip i gradus nisu dali statistički relevantne rezultate.



**Slika 19.** Kriva verovatnoće DFI tokom perioda praćenja toka bolesti od 12 godina u zavisnosti od godina pacijentkinja

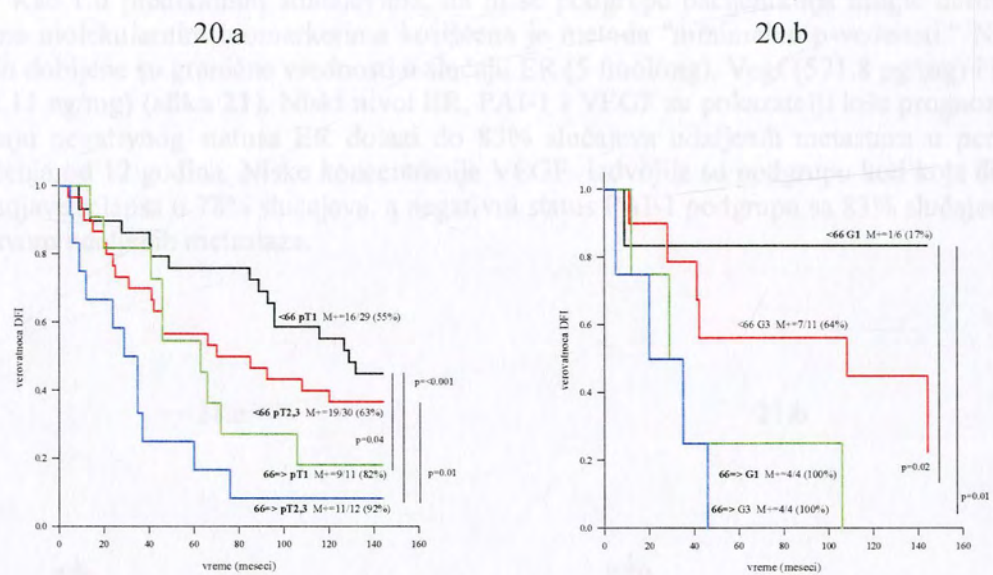
#### IV.3.3. Prognostički značaj fenotipova dobijenih kombinacijom klasičnih kliničko-patoloških parametara

Spajanjem kliničko-patoloških parametara dobili smo podgrupe pacijentkinja predstavljene na **Slici 20**.

- Godine predstavljaju izrazito jak prognostički faktor. Granična vrednost od 66 godina razdvaja podgrupu pT1 ( $p=0.04$ ) i podgrupu pT2,3 ( $p=0.01$ ) na povoljnu i nepovoljnu. Uz to, statistički značajna razlika dobijena je između pacijentkinja mlađih od 66 godina i tumorima manjim od 2 cm i podgrupe  $66 \geq pT2,3$  ( $p < 0.001$ ) nastale spajanjem dva nepovoljna faktora.
- U okviru gradusa jedan, statistička razlika je nađena između pacijentkinja mlađih i starijih od 66 godina ( $p=0.02$ ). Slično tome, razlika postoji i između podgrupa  $<66 G1$  i  $66 \geq G3$  ( $p=0.01$ ).

IV.3.4. Prognoziški značaj ispitivanja biomarkera u karcinomu

Kao i u prethodnim studijama, da bi se podgrupe pacijenata moglo razlikovati prema molekularnim markerima korišćena je metoda "limb" (Lasso). Na taj način dobijene su grupe sa vrednostima iznad ER (5.50), VEGF (571.8 ng/ml), PAI-1 (2.11 ng/ml) (slika 21). Niski nivoi HER, PAI-1 i VEGF su pokazali lošu prognozu. U slučaju pozitivnog nalaza ER došlo je do 83% slučajeva uklanjanja metastaza u periodu prve 12 godina. Nisko koncentracije VEGF i PAI-1 doveli su do poboljšanja: kod svih bolesnika sa negativnim nalazom VEGF i PAI-1 u 78% slučajeva, a pozitivna statusa u 60% slučajeva. U slučaju pozitivnog nalaza ER došlo je do 83% slučajeva uklanjanja metastaza.



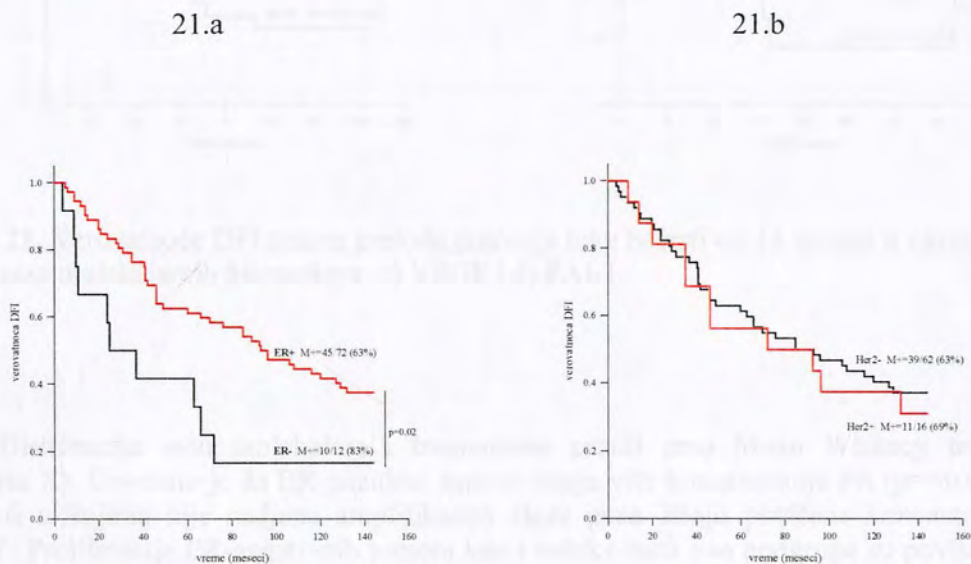
**Slika 20.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova nastalih spajanjem klasičnih parametara prognoze: a) godine, pT , b) godine, histološki gradus

**Slika 21.** Verovatnoće DFI tokom perioda praćenja toka bolesti od 12 godina u zavisnosti od statusa molekularnih biomarkera: a) ER, b) Her2

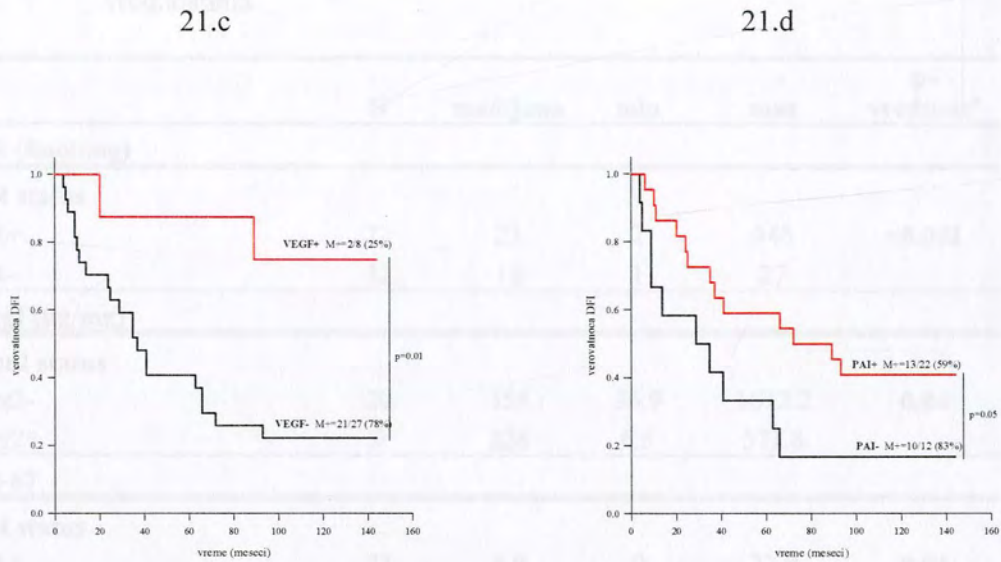


#### IV.3.4. Prognostički značaj ispitivanih molekularnih biomarkera

Kao i u predhodnim slučajevima, da bi se podgrupe pacijentkinja mogle definisati prema molekularnim biomarkerima korišćena je metoda "minimalne p-vednosti." Na taj način dobijene su granične vrednosti u slučaju ER (5 fmol/mg), Vegf (571.8 pg/mg) i PAI-1 (2.11 ng/mg) (slika 21). Niski nivoi ER, PAI-1 i VEGF su pokazatelji loše prognoze. U slučaju negativnog statusa ER dolazi do 83% slučajeva udaljenih metastaza u periodu praćenja od 12 godina. Niske koncentracije VEGF izdvojile su podgrupu kod koje dolazi do pojave relapsa u 78% slučajeva, a negativni status PAI-1 podgrupu sa 83% slučajeva sa pojavom udaljenih metastaza.



**Slika 21.** Verovatnoće DFI tokom perioda praćenja toka bolesti od 12 godina u zavisnosti od statusa molekularnih biomarkera: a) ER , b) Her2



**Slika 21.** Verovatnoće DFI tokom perioda praćenja toka bolesti od 12 godina u zavisnosti od statusa molekularnih biomarkera: c) VEGF i d) PAI-1

Distribuciju svih molekularnih biomarkera pratili smo Mann Whitney testom (**Tabela X**). Utvrđeno je da ER-pozitivni tumori imaju više koncentracije PR ( $p < 0.001$ ). Tumori u kojima nije nadjena amplifikacija Her2 gena imaju povišene koncentracije VEGF. Proliferacija ER-negativnih tumora kao i indeks rasta ove podgrupe su povišeni u ovoj podgrupi.

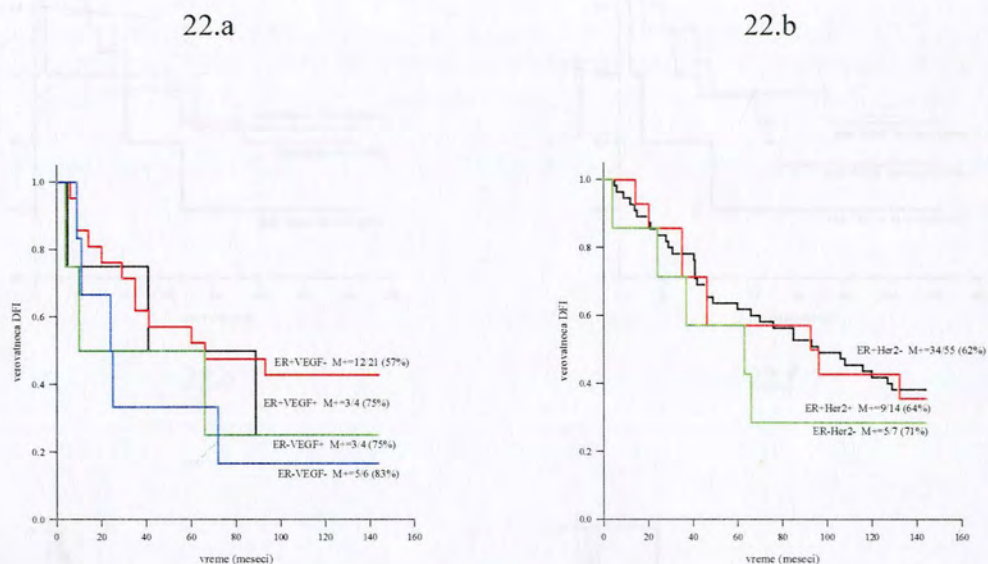
**Tabela X** Distribucija biomarkera u grupama definisanim prema dobijenim graničnim vrednostima

	<b>N</b>	<b>medijana</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>p- vrednost<sup>a</sup></b>
<b>PR (fmol/mg)</b>					
<b>ER status</b>					
ER+	72	23	2	948	<b>&lt;0.001</b>
ER-	12	18	1	27	
<b>Vegf (pg/mg)</b>					
<b>Her2 status</b>					
Her2-	20	358	36.9	1672.2	<b>0.04</b>
Her2+	9	228	6.5	571.8	
<b>Ki-67</b>					
<b>ER status</b>					
ER+	23	4.9	0	22.9	<b>0.03</b>
ER-	9	4.5	0.4	32.3	
<b>IR</b>					
<b>ER status</b>					
ER+	23	6.1	0	47.5	<b>0.06</b>
ER-	9	6.3	0.2	64.2	

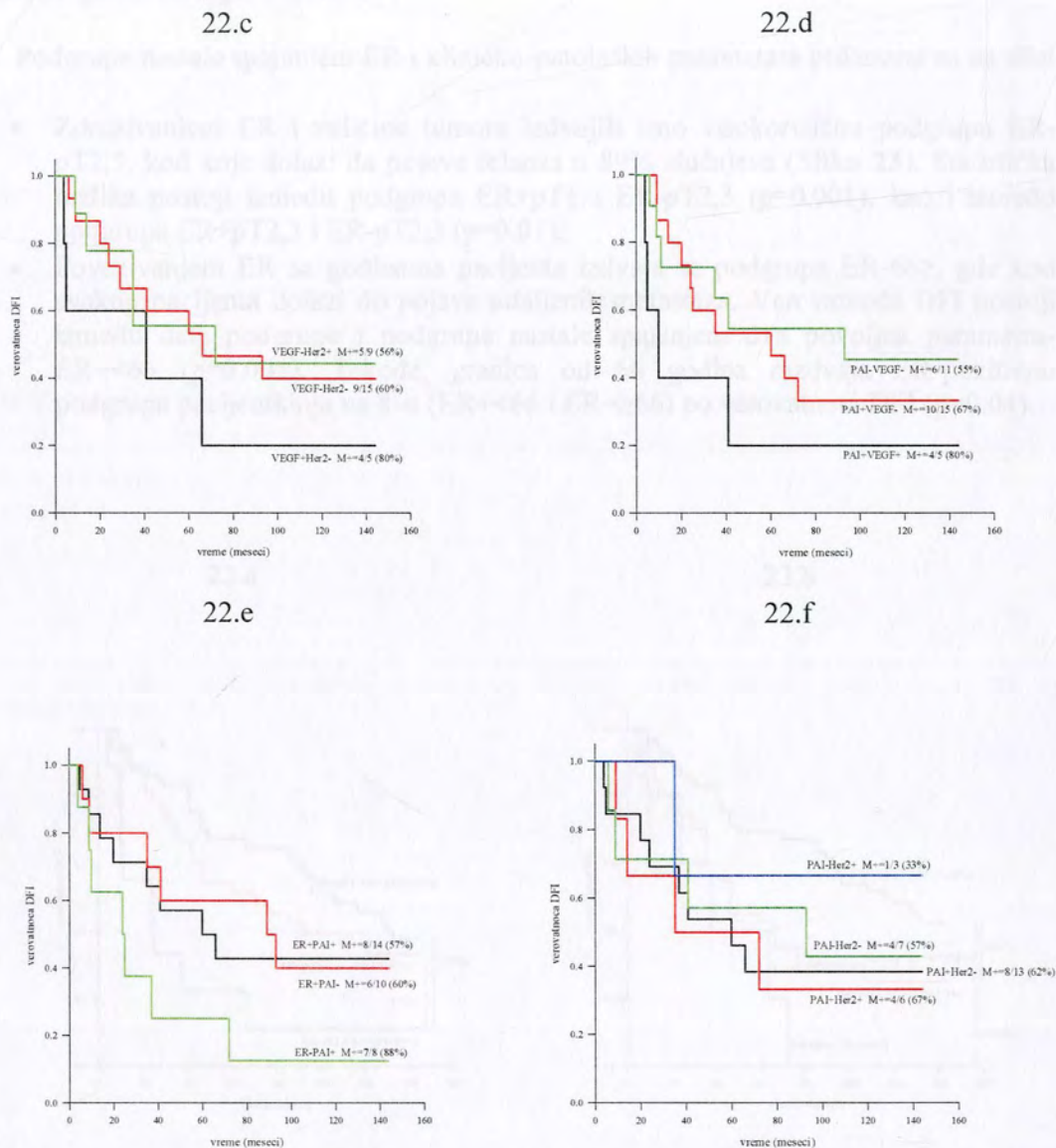
<sup>a</sup>Man Whitney test

**IV.3.5. Prognostički značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu molekularnih biomarkera**

Združivanjem molekularnih biomarkera prema njihovim graničnim vrednostima i analizom DFI nisu nađene razlike između podgrupa pacijentkinja (Slika 22).



**Slika 22.** Verovatnoće DFI tokom perioda praćenja toka bolesti od 12 godina u zavisnosti od združenog statusa molekularnih biomarkera: a) ER i VEGF , b) ER i Her2

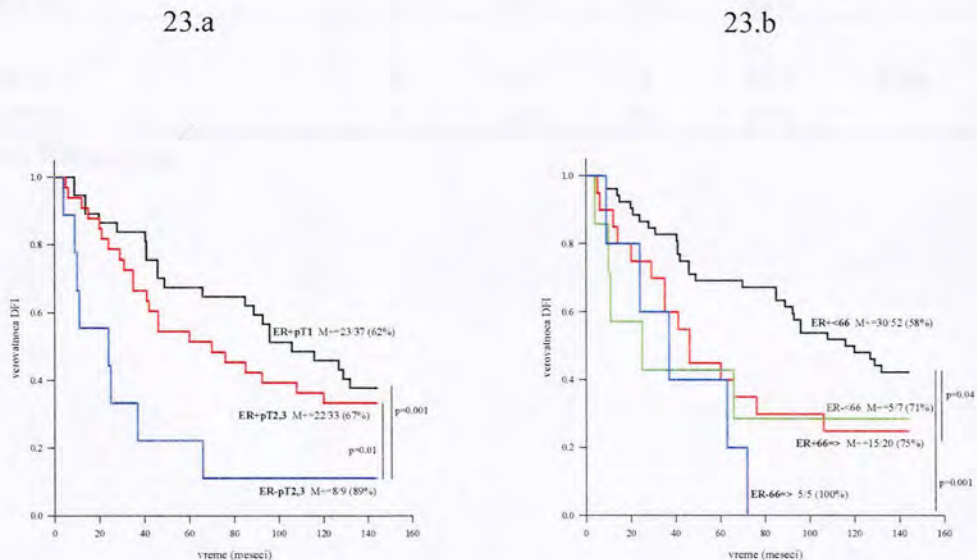


Slika 22. Verovatnoće DFI tokom perioda praćenja toka bolesti od 12 godina u zavisnosti od združenog statusa molekularnih biomarkera: c) VEGF i Her2 , d) PAI i VEGF , e) ER i PAI-1 , f) PAI-1 i Her2

#### IV.3.6. Prognostički značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu ER i kliničko-patoloških parametara

Podgrupe nastale spajanjem ER i kliničko-patoloških parametara prikazane su na slici 24.

- Združivanjem ER i veličine tumora izdvojili smo visokorizičnu podgrupu ER-pT2,3, kod koje dolazi da pojave relapsa u 89% slučajeva (Slika 23). Statistička razlika postoji između podgrupa ER+pT1 i ER-pT2,3 ( $p=0.001$ ), kao i između podgrupa ER+pT2,3 i ER-pT2,3 ( $p=0.01$ ).
- Povezivanjem ER sa godinama pacijenta izdvaja se podgrupa ER-66 $\geq$ , gde kod svakog pacijenta dolazi do pojave udaljenih metastaza. Verovatnoća DFI postoji između date podgrupe i podgrupe nastale spajanjem dva povoljna parametra ER+<66 ( $p=0.001$ ). Takođe, granica od 66 godina razdvaja ER-pozitivnu podgrupu pacijentkinja na dve (ER+<66 i ER+ $\geq$ 66) po verovatnoći DFI ( $p=0.04$ ).



**Slika 23.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom ER i klasičnih parametara prognoze: a) ER, pT, b) ER, godine

Distribucija molekularnih biomarkera između podgrupa, koje su dobijene analizom verovatnoće DFI, rađena je Mann-Whitney testom i prikazana **Tabelom XI**. Uočeno je da podgrupe ER+pT1 i ER+pT2,3, koje imaju manji procenat pojave udaljenih metastaza tokom perioda praćenja od 12 godina, poseduju i pozitivne karakteristike izražene visokom koncentracijom PR i niskim indeksom proliferacije Ki-67. Za razliku od njih podgrupa ER-pT2,3 ima suprotne, negativne pokazatelje ova dva biomarkera.

**Tabela XI** Raspodela biomarkera u grupama dobijenim povezivanjem ER i kliničko-patoloških parametara

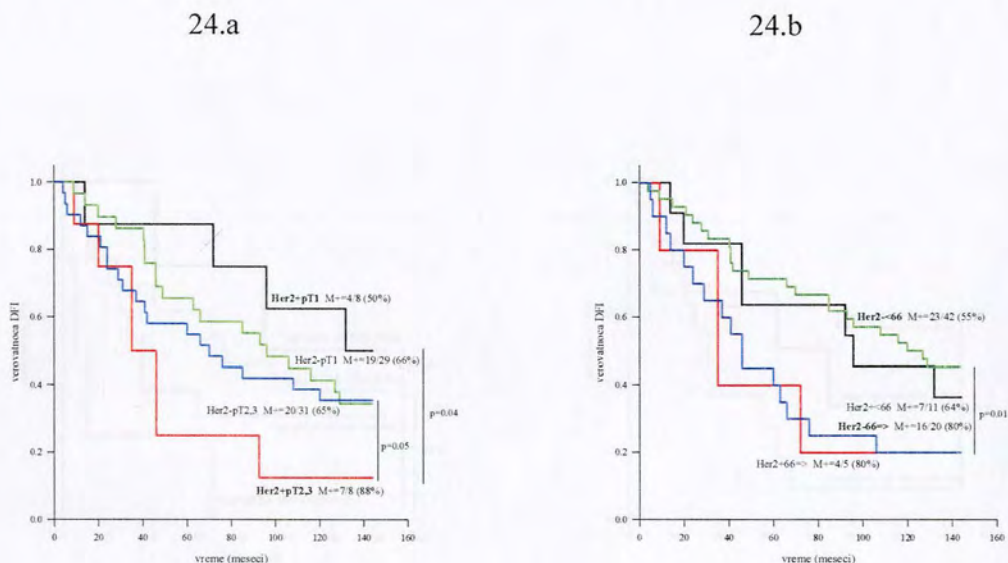
	<b>N</b>	<b>medijana</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>p-vrednost<sup>a</sup></b>
<b>PR (fmol/mg)</b>					
<b>ER , pT status</b>					
ER+pT1	37	23	2	733	<b>0.004</b>
ER-pT2,3	9	18	1	21	
ER+pT2,3	33	22	2	948	<b>0.003</b>
ER-pT2,3	9	18	1	21	
<b>Ki-67</b>					
<b>ER , pT status</b>					
ER+pT1	11	5.3	1.2	12.3	<b>0.01</b>
ER-pT2,3	6	4.4	0.4	32.3	
ER+pT2,3	10	4.3	0	22.9	<b>0.04</b>
ER-pT2,3	6	4.4	0.4	32.3	

<sup>a</sup>Mann Whitney test

#### IV.3.7. Prognostički značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu Her2 i kliničko-patoloških parametara

Status amplifikacije gena Her2 zajedno sa klasičnim parametrima prognoze ukazao je na postojanje podgrupa sa različitim verovatnoćom nastanka udaljenih metastaza (Slika 24).

- U okviru podgrupe Her2+ pacijentkinja pT status se pokazao kao jak prognostički parametar razdvajajući podgrupu na Her2+pT1 i Her2+pT2,3 ( $p=0.04$ ). Statistička razlika postoji i između podgrupe Her2-pT1 i Her2+pT2,3 ( $p=0.05$ ).
- Granična vrednost od 66 godina razdvaja podgrupu pacijentkinja sa Her2-negativnim tumorima na dve, Her2-<66 i Her2-66 $\geq$  ( $p=0.01$ ).



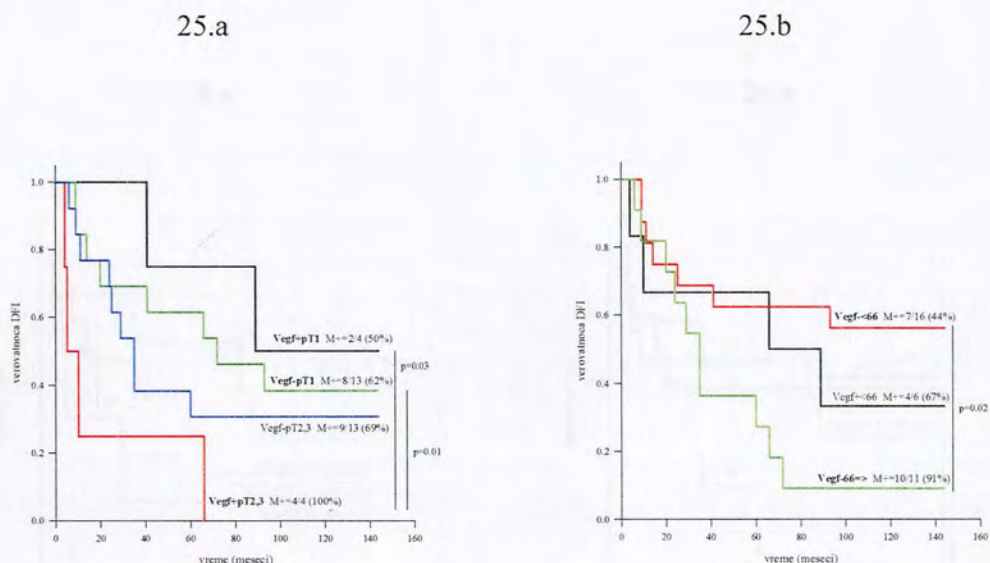
**Slika 24.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom Her2 i klasičnih parametara prognoze: a) Her2, pT, b) Her2, godine



#### IV.3.8. Prognostički značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu VEGF i kliničko-patoloških parametara

Status fenotipova prema VEGF i parametrima prognoze prikazan je na **Slici 25**.

- Kao i u slučaju ostalih molekularnih biomarkera, pT status se pokazao kao dovoljno značajan parametar da razdvoji VEGF-pozitivne pacijentkinje na dve podgrupe ( $p=0.03$ ). Statistička razlika postoji i između VEGF+pT2,3 i VEGF-pT1 podgrupe ( $p=0.01$ ).
- Kada su u pitanju godine pacijentkinja, granična vrednost od 66 razdvaja po verovatnoći podgrupu VEGF-negativnih pacijentkinja na dve (VEGF-<66 i VEGF- $\geq 66$ ) sa statističkom razlikom ( $p=0.02$ ).

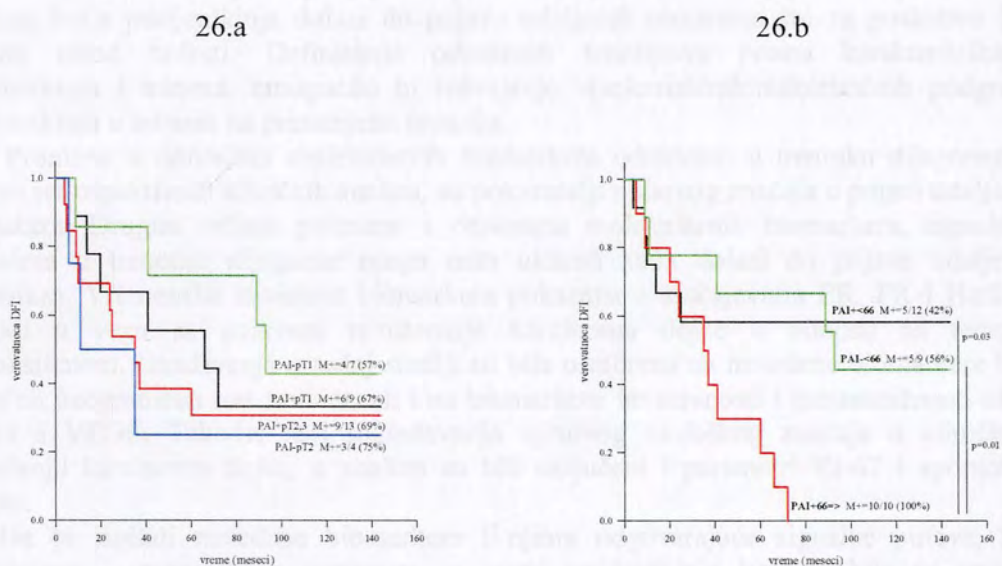


**Slika 25.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom VEGF i klasičnih parametara prognoze: a) VEGF, pT, b) VEGF, godine

### IV.3.9. Prognostički značaj podgrupa definisanih prema združenom statusu PAI-1 i kliničko-patoloških parametara

Verovatnoće DFI prema statusu PAI-1 i kliničko-patoloških parametara prikazane su na Slici 26.

- Spajanjem veličine tumora sa statusom PAI-1 nisu izdvojene razlike u verovatnoći DFI.
- Godine su izdvojile dve podgrupe u okviru PAI-1+ podgrupe pacijentkinja (PAI+<66 i PAI+≥66) sa statističkom razlikom ( $p=0.03$ ). Pronađena je izrazito negativna podgrupa pacijentkinja starijih od 66 godina sa pozitivnim statusom PAI-1, u kojoj dolazi do pojave udaljenih metastaza kod svih pacijentkinja u periodu praćenja od 12 godina, M+=10/10 (100%). Statistička razlika postoji i između date nepovoljne podgrupe i PAI-1-<66 podgrupe ( $p=0.001$ ).



**Slika 26.** Verovatnoće DFI u zavisnosti od fenotipova dobijenih združenim statusom PAI-1 i klasičnih parametara prognoze: a) PAI-1, pT, b) PAI-1, godine

## V. DISKUSIJA

Karcinom dojke, kao svaki drugi solidni karcinom, je okarakterisan nekontrolisanim rastom, invazivnošću, metastatičnošću i autonomnošću. Novija istraživanja dala su eksperimentalnu potvrdu da varijabilnost kliničkog toka karcinoma dojke u najvećoj meri zavisi od unutrašnje biološke heterogenosti samog tumora. Uprkos monoklonalnoj prirodi transformacije normalne epitelne ćelije u malignu, tumor je poliklonalan. Ta poliklonalnost se ne zadržava samo na primarnom tumoru već je prisutna i u klinički nedetektabilnim mikrometastazama. Prisustvo tih mikrometastaza, koje su sastavljene od niza nestabilnih različitih ćelija, otežava izlječenje pacijentkinja i uspeh terapija. Pored toga, izuzetno je teško pronaći nove biomarkere radi prognoze toka bolesti, ali i predvideti da li će određena terapija biti uspešna.

Kada je u pitanju karcinom dojke ablativna, kao i aditivna, endokrina terapija je jedna od najstarijih i najviše upotrebljivanih. Danas terapija tamoksifenom značajno produžava vreme bez ponovnog javljanja bolesti kod obolelih pacijentkinja. Uprkos tome, značajan broj pacijentkinja ne odgovara na terapiju, tj. dolazi do pojave rezistencije bilo da je ona *de novo* ili stečena, koje se javljaju ranije ili kasnije u toku terapije. Na taj način kod velikog broja pacijentkinja dolazi do pojave udaljenih metastaza što za posledicu ima fatalan ishod bolesti. Definisane određene fenotipove prema karakteristikama pacijentkinja i tumora, omogućilo bi izdvajanje visokorizičnih/niskorizičnih podgrupa pacijentkinja u odnosu na primenjenu terapiju.

Promene u odnosima molekularnih biomarkera određenih u trenutku dijagnoze, u okviru retrospektivnih kliničkih analiza, su pokazatelji njihovog značaja u pojavi udaljenih metastaza. Drugim rečima promene u odnosima molekularnih biomarkera, signalnim putevima u trenutku dijagnoze mogu nam ukazati kada dolazi do pojave udaljenih metastaza. Vremenska zavisnost biomarkera pokazana u slučajevima ER, PR i Her2 se dovodi u vezu sa pojavom rezistencije karcinoma dojke u odnosu na terapiju tamoksifenom. Istraživanja u našoj studiji su bila usmerena na navedene biomarkere koji utiču na neograničen rast tumora, ali i na biomarkere invazivnosti i metastatičnosti uPA, PAI-1 i VEGF. Takođe, radi sagledavanja njihovog biološkog značaja u kliničkom ponašanju karcinoma dojke, u analizu su bili uključeni i parametri Ki-67 i apoptotski indeks.

Da bi ispitali navedene biomarkere i njima odgovarajuće signalne puteve, kao prediktivne i prognostičke parametre, u grupi pacijentkinja koja je bila na terapiji tamoksifenom posmatrali smo klinički tok bolesti u okviru tri vremenska perioda. U prvih 2.5 godine terapije kliničko praćenje se zasnivalo na saznanju da je u tom periodu prisutna najveća učestalost pojave udaljenih metastaza, ali i da je to vreme za koje mnogi autori sugerišu da je odgovarajuće za zamenu adjuvantne terapije tamoksifenom sa terapijom inhibitora aromataza (Saphner i sar, 1996; Houghton, 2006; Houghton, 2005; Mansell i sar, 2009; Kennecke i sar, 2008). Kliničko praćenje u periodu od 2.5-5 godina je neophodno kako bi se utvrdila stečena rezistencija. Takođe u primarnom tumoru mogu postojati i biomarkeri i signalni putevi koji su detektabilni, ali ispoljavaju svoje funkcije kasnije u toku terapije (Tovey i sar, 2005). Pored toga, pacijentkinje su klinički praćene i kroz period od dvanaest godina kako bi utvrdili prognostički značaj kliničko-patoloških i molekularnih parametara.

## V.1. TOK BOLESTI U PRVIH 2.5 GODINE TERAPIJE TAMOKSIFENOM

### V.1.1. Značaj patohistoloških parametara

Analize grupe pacijentkinja koje su primale terapiju tamoksifenom, pokazale su da u prvih 2.5 godine primanja terapije dolazi do pojave udaljenih metastaza kod 18% pacijentkinja. Proučavajući verovatnoće DFI u ovoj grupi analizirali smo prvo klasične patohistološke parametre. Veličina tumora u trenutku operacije pokazala se kao značajna u predikciji odgovora na tamoksifen tokom prve 2.5 godine terapije. Pacijentkinje sa tumorima većim od 2 cm imaju lošiji tok bolesti i kod njih dolazi do pojave udaljenih metastaza u 26% slučajeva ( $p=0.03$ ). To je u skladu sa drugim objavljenim studijama (Mansell i sar, 2009). Nasuprot tome status limfnih čvorova, koji pokazuje metastatsku sposobnost tumora, i predstavlja najznačajniji faktor prognoze/predikcije nije pokazao značajnost. Naša pretpostavka je da zbog velike razlike između podgupa N0 i N+, kao i malog broja pacijentkinja u N0 podgrupi statistička obrada nije mogla dati potpuno pouzdan rezultat. Poređenjem verovatnoća DFI pacijentkinja sa histološkim gradusima 1 i 3 dobijeni su slični rezultati, iako pacijentkinje sa gradusom 1 imaju samo 18% (≈svaka šesta pacijentkinja) pojave udaljenih metastaza u poređenju sa 32% (≈svaka treća pacijentkinja) pacijentkinja sa gradusom 3. Za razliku od toga gradus 3 i zahvaćeni limfni čvorovi predstavljaju bitne prediktore pojave udaljenih metastaza tokom prvih 2.5 godina terapije prema studijama koje su radili Mansell, Kennecke i Debled (Mansell i sar, 2009; Kennecke i sar, 2008; Debled i sar, 2007).

Veličina tumora predstavlja veoma značajan parametar u ispitivanoj grupi pacijentkinja i dobar pokazatelj razlike između toka bolesti malih ( $<2$  cm) i velikih ( $2$  cm $\geq$ ) tumora. Predpostavka je da veći tumori ispoljavaju veću verovatnoću u nastanku udaljenih mikrometastaza i na taj način pojavu metastatske bolesti karcinoma dojke. Kombinujući patohistološke parametre utvrdili smo da značajne razlike postoje i između pT1 tumora dukalnog tipa i pT2,3 dukalnog i lobularnog histološkog tipa ( $p=0.02$ ,  $p=0.03$ ; respektivno). Ova razlika u DFI prevashodno postoji zbog razlike u veličini tumora, a ne histološkog tipa. U našoj studiji histološki gradus 1 tumora združen sa invazivnim duktalnim karcinomom je definisao niskorizičnu grupu tokom prve 2.5 godine terapije tamoksifenom, pri čemu nijedna pacijentkinja nije ispoljila pojavu udaljenih metastaza. Pored značajne uloge veličine tumora i histološkog gradusa na tok bolesti, moguće je da je sama priroda bolesti duktalnih i lobularnih karcinoma različita i obuhvata genetske promene koje vode ka bržem ili sporijem formiranju metastaza.

### V.1.2. Značaj ispitivanih molekularnih biomarkera: ER, PR i Her2

Endokrina zavisnost, koja se određuje prema nivoima ER i PR, dugo vremena je bila jedini molekularni prediktivni pokazatelj koji određuje terapiju primarnog operabilnog karcinoma dojke. Samim tim prisustvo ER i PR je dobar pokazatelj uspeha terapije tamoksifenom (EBCTCG, 2005). Receptor za estrogen predstavlja najbitniji molekul za rast tumora dojke i njegovo širenje. Kvantitativne vrednosti u našoj grupi pokazale su širok raspon ER, koji se kretao od 1 do 1157 fmol/mg. Pošto su na terapiji tamoksifenom bile sve pacijentkinje sa prisutnim ER, odredili smo graničnu vrednost koja je pacijentkinje podelila na dve podgrupe, nisku i visokorizičnu podgrupu. Određivanje granične vrednosti različitim metodama pokazalo se kao veoma bitno kroz niz studija. Rane studije uzimale su veoma nisku graničnu vrednost da bi razlikovali ER-pozitivne od ER-negativnih tumora (McGuire i Vollmer, 1975). Upotrebom klasične

biohemijske metode granična vrednost od 3 fmol/mg identifikovala je grupu sa vrednostima većim od te kao onu sa mnogo boljim odgovorom na endokrinu terapiju. Nakon toga mnoge laboratorije digle su granične vrednosti za ER i PR na 10, odnosno 20 fmol/mg, što na kraju može dovesti do toga da se neke pacijentkinje klasifikuju kao ER-negativne čime bi im se uskratila endokrina terapija (Osborne, 1998). Pacijentkinje čiji tumori imaju granične nivoe ER između 4 i 10 fmol/mg takođe pokazuju dobar odgovor na tamoksifen (Knight i sar, 1980).

U našoj studiji dobijena vrednost od 5 fmol/mg definisala je graničnu vrednost za oba receptora. Podgrupa sa „negativnim” statusom receptora za ER imala je čak 46% slučajeva pojave udaljenih metastaza. To bi značilo da svaka druga pacijentkinja sa koncentracijama ER manjim od 5 fmol/mg pripada visokorizičnoj podgrupi posmatrano u toku prve 2.5 godine terapije. Slični rezultati su potvrđeni i u drugim studijama (Mauriac i sar, 2007; Kennecke i sar, 2008).

Ipak ER „pozitivan” status u istraživanoj grupi nije dovoljan i jedini značajan za uspeh endokrine terapije. Pored velikog broja pacijentkinja kod kojih ne dolazi do pojave udaljenih metastaza u ER-pozitivnoj podgrupi, izdvajamo 14% pacijentkinja kod kojih ipak dolazi do relapsa tokom prve 2.5 godine. Ove ER-pozitivne pacijentkinje su vrlo brzo razvile metastaze i ukazale na moguće postojanje *de novo* rezistencije na terapiju tamoksifenom. Upravo ova podgrupa pacijentkinja mogla bi imati još koristi od utvrđivanja novih prediktivnih biomarkera, kako bi se definisale podgrupe pacijentkinja koje bi bile kandidati za promenu terapije. Tumori sa „negativnim” statusom receptora za estrogen imaju još jednu nepovoljnu karakteristiku, to je visok proliferativni indeks. Naše analize su pokazale sa statističkom značajnošću da ER-negativni tumori imaju povišene vrednosti Ki-67 kao pokazatelja proliferacije u odnosu na ER-pozitivne ( $p=0.02$ ). Veća proliferacija time pokazuje da je rast ovih tumora, a time i pojava mikrometastaza, brži i agresivniji. Može se zaključiti da biološki markeri, ER i Ki-67, ispoljavaju i klinički značaj u ranom praćenju pacijentkinja kao prediktivni markeri u okviru terapije tamoksifenom.

Receptor za progesteron spada u grupu estrogenom regulisanih molekula. Prisustvo PR dugo se smatralo garancijom očuvanosti funkcije ER, tj. njegovog genomskog, klasičnog delovanja (Hopp i sar, 2004). Prema današnjim istraživanjima oko 60% pacijentkinja sa ER-pozitivnim tumorima odgovara na endokrinu terapiju, dok u slučaju ER+PR+ tumora taj broj se povećava na 70-80% (McGuire i sar, 1975, McGuire, 1980). Iz toga se može izvesti zaključak da PR povećava prediktivnu moć ER, definišući na još bolji način podgrupe pacijentkinja koje dobro odgovaraju na terapiju tamoksifenom. Analizama rezultata naših istraživanja pokazali smo da je PR nezavisan prediktivni faktor, koji efikasno ukazuje na uspeh terapije tamoksifenom. Da postoji velika zavisnost između ER i PR pokazano je i pozitivnom korelacijom između ova dva receptora ( $p<0.001$ ), kao i distribucijom kvantitativnih vrednosti gde se vidi da se više vrednosti ER okupljaju oko viših vrednosti PR ( $p<0.001$ ). „Pozitivne” vrednosti PR slično kao i ER izdvajaju niskorizičnu podgrupu, ali sa istovremeno 12% slučajeva pojave udaljenih metastaza. Time se zapravo pokazuje da postoje i nepovoljni faktori kod pojedinih pacijentkinja koji doprinose pojavi rezistencije na tamoksifen. „Negativnost” PR je bitan prediktor neuspeha terapije tamoksifenom što je pokazano i drugim studijama (Mauriac i sar, 2007).

Humani epidermalni receptor faktora rasta (Her2) spada u grupu najviše ispitivanih biomarkera karcinoma dojke. Ipak njegova uloga u progresiji bolesti nije još uvek dovoljno ispitana. Kao rezultat javljaju se mnoga neslaganja, posebno kada je u pitanju njegov značaj kao faktora predikcije. Njegova prognostička uloga dobro je dokazana, gde se može videti da pacijentkinje sa amplifikacijom Her2 gena, tj. povišenom ekspresijom

imaju i kraći period do ponovnog javljanja bolesti, kao i ukupno preživljavanje (Seshadri i sar, 1993; Slamon i sar, 1989; Slamon i sar, 1987).

Pošto je Her2 protein koji učestvuje u nizu signalnih puteva, brzo se došlo do zaključka da bi on mogao imati udela i u rezistenciji na terapiju tamoksifenom. Naravno rezultati i studije se i danas mnogo razlikuju. Postoji veći broj studija koji govori da je povišeni nivo Her2 proteina dobar pokazatelj budućeg neuspeha endokrine terapije (Newby i sar, 1997; Carlomagno i sar, 1996; Bianco i sar, 1998; Borg i sar, 1994), dok drugi tvrde suprotno (Knoop i sar, 2001; Elledge i sar, 1998). Eksperimenti na hormon zavisnim ćelijskim linijama su pokazali da tranfekcijom više kopija Her2 gena dolazi do promene i one postaju hormon nezavisne (Benz i sar, 1992). Veze koje postoje između ER i Her2, kao mogućí razlog rezistencije, se još uvek ispituju. Neke od studija govore da estrogini specifično inhibiraju Her2 ekspresiju, tako da ćelije dojke odgovaraju na estrogen promenom u receptorima na njihovoj površini. Na taj način ćelija podešava svoju senzitivnost na autokrine i parakrine faktore (Knoop i sar, 2001). Eksperimentalno je potvrđeno *in vitro* studijama da dolazi do dramatičnog smanjenja Her2 mRNA i proteinske ekspresije u ER-pozitivnim ćelijskim linijama karcinoma dojke tretiranim 17-estradiolom, što bi značilo da postoji izvestan uticaj na promotor Her2 gena (Antoniotti i sar, 1994). Na osnovu toga tamoksifen bi mogao delovati na oslobađanje od Her2 inhibicije sprečavajući dejstvo estrogena, što dalje potvrđuju nalazi da ER-pozitivne ćelije tretirane tamoksifenom imaju povišen nivo Her2 (Russell i sar, 1992; Antoniotti i sar, 1992).

Her2 koreliše sa negativnošću ER i u literaturi proporcija ER-pozitivnih pacijentkinja među Her2-pozitivnim kreće se oko 10% (Knoop i sar, 2001). Upravo ta činjenica bi se mogla i uzeti kao razlog zašto pacijentkinje koje imaju povišenu ekspresiju Her2 ne reaguju na tamoksifen, tj. pacijentkinje koje su sa pozitivnim statusom Her2 obično su i ER-negativne. Naši rezultati pokazali su da nema nikakve razlike u verovatnoći DFI između pacijentkinja sa i bez amplifikacije gena Her2. DFI je praktično identičan tokom prve 2.5 godine praćenja, a nisu nađene ni razlike u sadržaju ER i PR u podgrupama sa i bez amplifikacije Her2 gena. Moguće objašnjenje je da iako postoji amplifikacija Her2 gena koja vodi njegovoj povišenoj ekspresiji, formirani protein nije aktivan. Jedna od studija pokazuje da samo manji broj tumora koji ima povišenu ekspresiju Her2, oko 30%, sadrži fosforilisanu formu receptora za koju se smatra da je jedina aktivna (DiGiovanna i sar, 1996). Takođe, da bi ispoljio svoju funkciju neophodno je da Her2 dimerizuje sa nekim iz familije Her proteina, što znači da je njihovo prisustvo neophodno za aktivnost Her2. Prema tome u daljim studijama Her2 ne treba gledati nezavisno od ostalih članova familije.

### V.1.3. Združeni status ER, PR i Her2

ER je prihvaćeni prediktivni marker koji se koristi za donošenje odluke o endokrinoj terapiji, dok je uloga PR mnogo kontraverznija (Cui i sar, 2005). Ipak veliki broj studija se slaže sa činjenicom da je PR nezavisan prediktivni marker, kao i da daje dodatne prediktivne informacije uz ER (Bardou i sar, 2003).

Tamoksifen se kao oblik endokrine terapije uspešno koristi više od 20 godina, ali inhibitori aromataze novije generacije, kao i druge vrste terapije već se koriste umesto tamoksifena. Nekoliko studija je pokazalo da se pik pojave udaljenih metastaza javlja nakon 2.5 godina od početka terapije. Ovaj period, između druge i treće godine terapije uzima se kao najbolji za prebacivanje sa tamoksifena na terapiju inhibitorima aromataza (Saphner i sar, 1996; Houghton, 2006; Houghton, 2005). U ATAC (engl. Arimidex,

Tamoxifen, Alone or in Combination) studiji pokazano je da u prvih 2.5 godine terapije inhibitori aromataza smanjuju pojavu udaljenih metastaza za 7% više u odnosu na tamoksifen (Houghton, 2006). Slična retrospektivna analiza BIG 1-98 pokazala je da dolazi do smanjenja pojave udaljenih metastaza za 30% u poređenju sa tamoksifenom (Mauriac i sar, 2007). Pored toga, kao jedno od glavnih pitanja koje se vodi je da li odmah nakon hiruške terapije primeniti terapiju inhibitorima aromataza, nakon 2.5 ili 5 godina prvobitne terapije tamoksifenom (Punglia i sar, 2005; Cuzick i sar, 2006). Postoje dosta ograničeni podaci o identifikaciji podgrupa pacijentkinja koje bi imale više koristi od promene terapije tamoksifenom. U odsustvu tih informacija, najpragmatičniji pristup je u identifikaciji pacijentkinja sa najvećim rizikom od rane pojave udaljenih metastaza koje bi u tom pogledu imale najviše koristi od rane terapije inhibitorima aromataza. Pored podgrupe sa najvećim rizikom za pojavu udaljenih metastaza ER-PR-, u jednu od rizičnih podgrupa spada ER+PR- za koju je specifično da slabije reaguje na terapiju tamoksifenom, što je i pokazano studijom Baum-a i saradnika (Baum i sar, 2003). Danas postoje različita objašnjenja fenotipa ER+PR-, kao i šta on ukazuje kada je u pitanju terapija ovih pacijentkinja. Najčešće objašnjenje je da je ER nefunkcionalan i kao takav ne dovodi do transkripcije gena PR, koji je pod direktnim uticajem ovog transkripcionog faktora. Takvi tumori nisu više zavisni od estrogena kada je u pitanju rast i preživljavanje i samim tim tamoksifen ne deluje na njih (Cui i sar, 2005). Ovakvo objašnjenje danas je pod znakom pitanja, pre svega zbog studija u kojima su pacijentkinje sa ER+PR- tumorima dobijale terapiju inhibitorima aromataza. Naime inhibitori aromataza smanjuju nivo estrogena, koji je onda u potpunosti nedostupan ER. Data podgrupa pacijentkinja reagovala je znatno bolje na ovu vrstu terapije, što je dalje ukazalo da je ER funkcionalan i da postoje drugi razlozi neuspeha terapije tamoksifenom (Dowsett, 2007; Cui i sar, 2005). Prema Lapidus-u i saradnicima razlog lošijeg ishoda bolesti pacijentkinja sa ovim fenotipom je u metilaciji i represiji promotora PR gena. Iako metilacija PR promotora nije pronađena u fenotipu sa pozitivnim statusom tumora za ER i PR, 21-40% ER+PR- tumora ipak ima metilaciju ovog promotora (Lapidus i sar, 1998). Drugo moguće objašnjenje leži u genetskom gubitku jedne kopije gena, gubitku heterozigotnosti, na PR genskom lokusu. Studije pokazuju da do gubitka heterozigotnosti dolazi u 40% karcinoma dojke kao i da postoji veza sa gubitkom ekspresije PR (Tomlinson i sar, 1996; Winqvist i sar, 1995). Ipak, ova dva objašnjenja nisu odgovorila na pitanje rezistencije ER+PR- tumora na tamoksifen, s obzirom na činjenicu da je cilj tamoksifena ER, a ne PR. Treće moguće objašnjenje leži u činjenici da su ER+PR- tumori rezultat manjih cirkulišućih nivoa endogenog estrogena kod postmenopausalnih pacijentkinja koji je nedovoljan da indukuje ekspresiju PR, iako je ER i njegov put delovanja funkcionalan. To dokazuje i kratak tretman pacijentkinja sa ER+PR- tumorima estrogenom, što u potpunosti vraća nivo PR (Bloom i sar, 1980).

Alternativni mehanizam koji objašnjava ovu pojavu leži u molekularnim interakcijama između ER i receptora faktora rasta, što dalje vodi promenama u signalnim putevima i odnosima klasičnog i neklasičnog delovanja ER. Eksperimentima na ćelijskoj liniji ZR-75 utvrđeno je da sa povećanjem nivoa ekspresije Her2 dolazi i do smanjenja nivoa PR i pojave rezistencije (Konecny i sar, 2003). Her2 se pojavljuje kao osnovni uzrok rezistencije, ali i nestanka PR. Smatra se da sa povišenom ekspresijom Her2 dolazi do aktiviranja signalnih puteva, pre svega PI3K/Akt-mTor, koji vodi smanjenju ekspresije PR. Ova snižavanje nivoa PR odvija se na nivou mRNA i predpostavlja se da se vrši preko AP-1 transkripcionog faktora, tj. represijom PR promotora (Petz i sar, 2004). Više studija je pokazalo da signalni putevi Her2 mogu direktno uticati na ER njegovom fosforilacijom (Kato i sar, 1995; Gee i sar, 2001; Campbell i sar, 2001). Ova fosforilacija ER ne samo da

dovodi do toga da tamoksifen deluje kao agonist, samim tim i do rezistencije, već i do toga da ER izaziva transkripciju različitih gena u odnosu na njegovo klasično delovanje. Značajnu ulogu u rezistenciji i gubitku PR može imati i membranski ER svojim delovanjem na Her2. Primećeno je da u tumorima kod kojih dolazi do rezistencije, pod uticajem estrogena ali i tamoksifena dolazi do brze fosforilacije, ali i aktivacije EGFR/Her2 (Shou i sar, 2004). Povišeni nivoi membranskog i citoplazmatskog ER su pronađeni u ćelijama karcinoma dojke u kojima postoji amplifikacija Her2 gena (Chung i sar, 2002). Prema tome estrogen i tamoksifen mogu dovesti do smanjenja PR u uslovima pojačanog delovanja signalnog puta koji počinje od membranskog ER (engl. MISS-membrane initiated steroid signaling) i uticaja na receptore faktora rasta.

Analize verovatnoće DFI, tokom prve 2.5 godine terapije tamoksifenom u našoj grupi, pokazale su da je podgrupa koja najbolje odgovara na terapiju upravo sa duplim „pozitivnim” statusom steroidnih receptora, ER+PR+. Ako posmatramo samo ER kao prediktivni marker, možemo videti da kada je njegov status „pozitivan” dolazi do pojave udaljenih metastaza tokom prve 2.5 godine terapije samo u 14% slučajeva (≈svaka sedma pacijentkinja). Ali dodajući status PR, vidimo da se prediktivna moć povećava tako da kod podgrupe ER+PR+ dolazi do pojave udaljenih metastaza u 11% slučajeva (≈svaka deveta pacijentkinja). Iz toga zaključujemo da PR u kombinaciji sa ER pomaže u boljem definisanju podgupa i njihovom odgovoru na terapiju. Kao najnepovoljnija podgrupa javlja se sa ona sa duplim „negativnim” statusim ER-PR-, gde dolazi do pojave udaljenih metastaza kod 57% pacijentkinja. Tumori sa negativnim statusim receptora za PR, tj. ER+PR-, i u našoj analiziranoj grupi pokazuju statističku razliku u odnosu na ER+PR+ fenotip ( $p=0.01$ ). Ono što je zanimljivo je da je PR vremenski zavistan prediktor rizika od pojave udaljenih metastaza, pri čemu taj rizik opada u periodu između 2.5-5 godina terapije. Drugim rečima PR nema nikakav prediktivni uticaj u podgrupi pacijentkinja koje u prvih 2.5 godine terapije nisu imale pojavu udaljenih metastaza. Na ovaj način PR „negativnost” identifikuje podgrupu pacijentkinja kod koje možda dolazi do pojave *de novo* rezistencije. Slični rezultati dobijeni su i u drugim studijama (Tovey i sar, 2005; Ponzoni i sar, 2006). Određene studije govore da pored „negativnog” statusa PR, značajnu ulogu u rezistenciji ima i Her2, koji je povišen (Carlomagno i sar, 1996; Ponzoni i sar, 2006). Ipak naše analize nisu pokazale da status Her2 ima bilo kakvu ulogu u rezistenciji. Povezivanjem Her2 sa ER i PR, dobili smo trostruke fenotipove, ali ne postoji nikakva razlika između ER+PR+Her2- povoljne podgrupe i nepovoljne ER+PR-Her2+. Slab uticaj Her2 na rezistenciju na tamoksifen potvrdili su i drugi (Tovey i sar, 2005; Knoop i sar, 2001; Elledge i sar, 1998). Povezivanjem samo ER i Her2 nisu dobijeni statistički relevantni rezultati, kao i u slučaju spajanja PR i Her2. Da bi se dobili što relevantniji rezultati potrebno je ispitati i značaj drugih receptora iz Her familije, pre svega EGFR, koji su dimerizacioni partneri Her2 i neophodni su za njegovu aktivaciju.

Prema našim rezultatima ER+PR+ je niskorizična podgrupa, tako da pacijentkinje iz ove podgrupe nisu kandidati za promenu terapije u prvih 2.5 godine. Dalje kliničko praćenje ovih niskorizičnih podgrupa može ukazati na potrebu ka sekvencijalnom pristupu u davanju terapije. Sa druge strane, ER+PR- podgrupa se pokazala kao nepovoljna i primena inhibitora aromataza odmah nakon hiruške terapije kod ove podgrupe donela bi možda bolje rezultate, što je i potvrđeno ATAC studijom (Dowsett i sar, 2005). U slučaju duplog negativnog fenotipa ER-PR- mogu se izvesti slični zaključci. Koncentracije niže od 5 fmol/mg za ER i PR siguran su znak neuspjeha terapije tamoksifenom.



#### V.1.4. Prediktivni značaj ER i patohistoloških parametara prognoze

Veličina tumora se pokazala kao značajan parametar u predviđanju odgovora na terapiju tamoksifenom. Povezivanjem sa biomarkerima, na prvom mestu ER, može se nastaviti u daljem grupisanju pacijentkinja prema njihovoj verovatnoći DFI. Time se omogućava dalje definisanje nisko/visokorizičnih podgrupa pacijentkinja u okviru već definisanih podgrupa. Našim analizama pokazano je da spajanjem dva povoljna faktora, tj. tumora manjih od 2 cm koji su ER-pozitivni dobija najpovoljnija podgrupa. Evidentno je postojanje razlike između date podgrupe i najnepovoljnije visokorizične podgrupe ER-pT2,3 ( $p=0.001$ ), kod koje dolazi do pojave udaljenih metastaza u 60% slučajeva. Dokazano je da ER, prema svom „pozitivnom”/„negativnom” statusu, može razdvojiti podgrupu pacijentkinja sa tumorima većim od 2 cm na dve sa različitim DFI. ER status time pokazuje značajnost u podgrupi pacijentkinja sa većim tumorima od 2cm i na taj način definiše podgrupe sa različitim rizikom u pojavi udaljenih metastaza.

Kennecke i saradnici su utvrdili da su gradus 3 i niske vrednosti ER značajni prediktori rane pojave metastaza, tj. u periodu prvih 2.5 godina terapije (Kennecke i sar, 2008). U našoj grupi pacijentkinja, podela prema gradusu na dve podgrupe, povoljnu G1 i nepovoljnu G3, a zatim računanje DFI nije dalo evidentne razlike. Povezivanjem sa ER dobijena je visokorizična podgrupa ER-G3 koja se značajno razlikuje od podgrupe ER+G1. Ovo je i očekivani rezultat s obzirom da tumori sa niskim nivoima ER slabije odgovaraju na endokrinu terapiju, a gradus 3 označava tumore sa većom proliferacijom i smanjenom diferencijacijom.

Slično kao i sa gradusom, ER na osnovu svoje prediktivne moći izdvaja dve podgrupe unutar grupe tumora dukalnog tipa. ER-negativni tumori dukalnog tipa imaju veći rizik od pojave udaljenih metastaza ( $M+=33%$ ). Ove razlike u DFI potiču od statusa ER. Računanjem distribucije PR u ER+IDC i ER-IDC podgrupama, pokazali smo da je ekspresija PR veća u ER+IDC podgrupi. Isti rezultat dobijen je i u slučaju ekspresije VEGF u ovoj podgrupi. Veća ekspresija PR i VEGF, prema našim analizama, je pokazatelj boljeg odgovora na terapiju tamoksifenom, što je i osnovna karakteristika ER+IDC tumora.

#### V.1.5. Prediktivni značaj PR i patohistoloških parametara prognoze

Povezivanjem patohistoloških parametara i statusa PR, načinjen je i korak dalje u definisanju visokorizičnih podgrupa, potencijalnih kandidata za promenu terapije tamoksifenom. Veličina tumora i status PR, računanjem verovatnoće DFI tokom prve 2.5 godine terapije, izdvojile su pre svega niskorizičnu podgrupu malih tumora sa pozitivnim statusom PR. Ova PR+pT1 podgrupa ima samo 6% slučajeva sa pojavom udaljenih metastaza. Ali preko statusa PR našim analizama je pokazano da unutar povoljne podgrupe sa manjim pT1 tumorima postoje izvesne razlike koje se manifestuju i različitom verovatnoćom DFI. Tako da statistička razlika ( $p=0.03$ ) postoji između PR+pT1 podgrupe sa samo 6% slučajeva pojave metastaza i PR-pT1 sa 27% slučajeva sa metastazama. Pored toga bitna razlika je takođe pokazana i između PR+pT1 i podgrupe sa najvećim rizikom pojave udaljenih metastaza, PR-pT2,3 ( $M+=55%$ ) ( $p<0.001$ ). U ovoj visokorizičnoj podgrupi do pojave udaljenih metastaza dolazi kod svake druge pacijentkinje u periodu prve 2.5 godine terapije. To je čini dobrim kandidatom za agresivniju terapiju. U okviru tumora većih od 2 cm, a na osnovu statusa PR, izdvajaju se dve podgrupe koje pokazuju značajne razlike u toku bolesti. Značaj prediktivne moći PR može se videti i u činjenici da čak i veći tumori pT2,3, ali sa „pozitivnim” statusom PR imaju bolji odgovor na terapiju

tamoksifenom (M+=19%), nego manji pT1 sa negativnim statusom PR (M+=27%). Prema tome status PR se pokazao u našoj grupi pacijentkinja kao veoma značajan za predikciju uspeha terapije, definišući detaljnije rizik pojedinih podgrupa sa različitom veličinom tumora. Negativnost PR i povećanje veličine tumora, zajedno predstavljaju bitne faktore rizika koje ukazuju na neuspeh terapije tamoksifenom. Ovim analizama se zaključuje da između tumora koji spadaju u istu podgrupu po veličini ipak postoje izvesne razlike. Upravo te razlike se mogu videti analiziranjem biomarkera kao što je PR. Novi biomarkeri na sličan način mogu doprineti u daljem grupisanju na prvi pogled već jasno definisanih grupa.

Histološki gradus pomaže u boljem definisanju agresivnosti tumora, dajući informacije o stepenu njegove diferencijacije i proliferacije. U našoj grupi pacijentkinja gradus 1, zajedno sa pozitivnim statusom PR otkriva podgrupu sa samo 8% slučajeva kod kojih dolazi do pojave udaljenih metastaza. Značajne razlike koje postoje između navedene i dve sledeće podgrupe PR-G1 (M+=50%) (p=0.05) i PR-G3 (M+=50%) (p=0.03) potvrđuju veliki prediktivni značaj PR. Prema tome, i u ovom slučaju status PR igra najznačajniju ulogu u izboru potencijalne terapije koja može biti primenjena.

Verovatnoće DFI podgrupa nastalih združivanjem statusa PR i histološkog tipa tumora pomogle su nam u daljem definisanju rizičnih podgrupa. Prediktivni značaj dobijenih podgrupa zasniva se ipak na prediktivnoj moći PR. Pacijentkinje koje imaju tumore sa „pozitivnim” statusom PR i bilo duktalni ili lobularni histološki tip imaju mnogo bolji odgovor na terapiju tamoksifenom sa manjim brojem pojave metastaza u periodu prvih 2.5 godine terapije. Na taj način bitne razlike u verovatnoći pojave udaljenih metastaza su uočene između PR+IDC (M+=7%) i PR-IDC (M+=44%) (p=0.001), zatim između PR+IDC i PR-ILC (M+=40%) (p=0.005) i na kraju PR+ILC (M+=17%) i PR-IDC (M+=44%) (p=0.04).

Nakon dobijenih verovatnoća DFI, poredeći podgrupe sa dobijenim statističkim razlikama u DFI po ekspresiji ispitivanih biomarkera zaključili smo da postoje izvesne karakteristike podgrupa koje objašnjavaju bolji ili lošiji tok bolesti:

- PR+IDC i PR+ILC, obe povoljne podgrupe karakterišu i povećani nivoi ER u tumorima, što je još jedan od dokaza zbog čega bolje odgovaraju na terapiju tamoksifenom.
- Pored toga, poredeći podgrupe pacijentkinja sa tumorima PR+IDC i PR-ILC po ekspresiji VEGF, uočeno je da povoljnija podgrupa PR+IDC ima i povišene nivoe VEGF što je prema našim analizama povoljna karakteristika.
- Poredeći PR+ILC i PR-IDC po ekspresiji uPA takođe je dobijena statistički relevantna razlika. uPA je značajno povišen u PR-IDC, što dodatno ukazuje na slab odgovor na terapiju upravo zbog povećanog dejstva ove proteaze na razgradnju ekstraćelijskog matriksa i time veće invazivne sposobnosti tumora.

Podgrupe koje karakteriše „pozitivan” status progesteronskog receptora, specifične su i po visokim vrednostima ER. Samim tim uspeh terapije tamoksifenom mnogo je veći kod ovih podgrupa tako da razmatranje moguće promene terapije kod njih ne može biti sugerisano.

#### V.1.6. Prediktivni značaj Her2 i patohistoloških parametara prognoze

Postoji dosta neslaganja u literaturi koja se tiču odnosa između amplifikacije Her2 gena i drugih prognostičkih faktora (Clark i McGuire, 1991). U nekim od studija pominje se slaba veza Her2 amplifikacije i statusa limfnih čvorova (Borg i sar, 1990; Uehara i sar, 1990), dok drugi nisu pronašli nikakve asocijacije (Heintz i sar, 1990). Prema studiji Tiwari i saradnika amplifikacija Her2 gena direktno je povezana sa nodalnim metastazama

(Tiwari i sar, 1992). Kada su u pitanju drugi prognostički parametri spominju se veze sa visokim gradusom (Wright i sar, 1989), kao i sa veličinom tumora (Borg i sar, 1990; Uehara i sar, 1990).

Analize verovatnoće DFI u našoj grupi pacijentkinja nisu otkrile visoko ili niskorizične podgrupe definisane na ovaj način. Povezivanjem statusa Her2 sa statusom limfnih čvorova nije dobijena statistička razlika između podgrupa, ali se ipak može izdvojiti Her2-N0 podgrupa. Analize su pokazale da pacijentkinje bez metastaza u limfnim čvorovima i bez amplifikacije Her2 gena nemaju pojavu udaljenih metastaza prvih 2.5 godina terapije (M+=0%). Interesantno je da sve pacijentkinje koje imaju zahvaćene limfne čvorove malignim ćelijama, takođe imaju i amplifikaciju Her2 gena. Klinička značajnost nije pronađena kombinovanjem statusa Her2 i veličine tumora, histološkog tipa i gradusa.

### V.1.7. Prediktivni značaj uPA i PAI-1

Serin proteaza urokinazni plazminogen aktivator (uPA) i njegov inhibitor (PAI-1) su ključni faktori u proteolitičkoj kaskadi koja je uključena u procese fiziološke i patofiziološke razgradnje i remodeliranja ekstraćelijskog matriksa (Harbeck i sar, 2004). Dokazano je da uPA igra veoma bitnu ulogu u progresiji kancera, posebno invaziji i metastazi. Prema tome očekivano je i da njegovi nivoi korelišu sa metastatskim potencijalom i samim tim sa prognozom pacijenta (Duffy i sar, 1987). Veći broj studija potvrđuje značajnu ulogu uPA i PAI-1 kao faktora nezavisnih od klasičnih prognostičkih parametara, statusa limfnih čvorova, veličine tumora i histološkog gradusa (Duffy i sar, 1999; Duffy i sar, 2002). U studiji koja je obuhvatala 8377 pacijentkinja sa karcinomom dojke, rađene su kvantitativne analize nivoa uPA i PAI-1. Dobijeni rezultati govore da pacijentkinje sa visokim nivoom uPA i PAI-1 imaju veću verovatnoću pojave udaljenih metastaza (Look i sar, 2002), što je i ranije uočeno u drugim studijama (Jänicke i sar, 1993; Jänicke i sar, 1991).

Prediktivna moć uPA i PAI-1 nije ispitana u tolikoj meri, tj. broj studija koji govore o uticaju na adjuvantnu terapiju tamoksifenom je zastupljen u malom broju. U nekoliko studija gde je korišćen tamoksifen kod pacijentkinja sa uznapredovalim karcinomom dojke, visoki nivoi uPA i PAI-1 pokazali su neuspeh terapije i pojavu metastaza (Meijer-van Gelder i sar, 2004; Meijer-van Gelder i sar, 2003; Manders i sar, 2004; Foekens i sar, 1995).

Neuspeh terapije tamoksifenom kod pacijentkinja sa povišenim nivoom uPA nije u potpunosti objašnjen. Pored svog delovanja kao proteaze, uPA vezivanjem za svoj receptor uPAR može pokrenuti neki od signalnih puteva, pre svega MAPK, koji se završavaju na ER, omogućavajući njegovu ligand nezavisnu aktivaciju i povećanje agonističkog dejstva tamoksifena (Tang i sar, 1998; Konakova i sar, 1998).

Postojanje izvesnih veza sa ER, tj. uticaj estrogena i ER na ekspresiju uPA i PAI-1 nije definitivno dokazan. Davis i saradnici govore o o kontroli uPA kompleksa putem estrogena u ćelijama koje sadrže ER (Davis i sar, 1995), dok Levenson svojim istraživanjima na ćelijskim linijama pokazuje da estrogen negativno deluje na stvaranje uPA i PAI- mRNA i aktivnost samih proteina (Levenson i sar, 1998).

Ipak postoje podaci koje govore o suprotnom delovanju ER na uPA i PAI-1. Dokazano je da u promotornom regionu uPA gena postoji vezujuće mesto za AP-1 i NFκB transkripcione faktore (Lengyel i sar, 1996; Nerlov i sar, 1991), pa bi jedno od objašnjenja pozitivnog uticaja ER na ekspresiju uPA bila u neklasičnom signalnom putu ER i interakcijama sa AP-1. AP-1 bi dalje svojim delovanjem kao transkripcioni faktor uticao na povišenje nivoa uPA.

Analizom verovatnoće DFI, za vrednosti uPA i PAI-1, dobijene su granične vrednosti. U slučaju PAI-1 dobijena je granična vrednost na osnovu koje su podgrupe definisane i podeljene na „pozitivne” i „negativne”. U slučaju uPA prisutan je izrazit trend, prema kojem je definisana granična vrednost. Direktno poređenje graničnih vrednosti sa ranije objavljivanim podacima je teško, zbog činjenice da se ranije objavljuvani podaci razlikuju po ekstrakcionim metodama (Foekens i sar, 1992), antitelima i populacijama koje su istraživane (Harbeck i sar, 1999; Janicke i sar, 1993). Analize koje smo uradili u našoj grupi pokazuju da su povišene vrednosti uPA direktan pokazatelj neuspeha terapije tamoksifenom i većeg rizika od pojave udaljenih metastaza. Veći nivoi uPA samim tim ukazuju i na povećanu razgadnju ekstraćelijskog matriksa, ali i na mogući uticaj na signalne puteve u ćeliji preko uPAR što još treba utvrditi daljim analizama. U uPA-pozitivnoj podgrupi došlo je do pojave udaljenih metastaza u 45% slučajeva, nasuprot uPA-negativne gde imamo 19% slučajeva sa metastazama tokom prve 2.5 godine terapije tamoksifenom. Slab odgovor na terapiju tamoksifenom kod pacijentkinja čiji tumori imaju povišeni nivo uPA dokazan je i u drugim studijama (Manders i sar, 2004).

Veliki broj problema i nesuglasica javio se istraživanjem uloge PAI-1 u biologiji tumora. Dokazi da pacijenti sa povećanim nivoom PAI-1 u tumorima imaju lošiju prognozu (Andreasen i sar, 1997), prvo su došli kao iznenađene, s obzirom na činjenicu da je osnovna uloga PAI-1 upravo u inhibiciji uPA. To je bio motiv da se potraže nove funkcije PAI-1 kako bi se objasnili dobijeni rezultati (Andreasen i sar, 2000). Određene studije govore da PAI-1 može delovati protiv migracije i invazije, inhibirajući uPA. Druga hipoteza je da PAI-1 neophodan za optimalnu funkciju uPA sistema, regulišući adheziju ćelija i vršeći restrikciju adhezije u vremenu i prostoru (Andreasen i sar, 2000). U većini studija gde je proučavan značaj PAI-1 kao prediktivnog faktora, visoki nivoi su povezivani sa lošijim odgovorom na terapiju (Meijer-van Gelder i sar, 2004). Analiza pacijentkinja u našoj grupi pokazala je u potpunosti suprotne rezultate od objavljivanih. Prema našim analizama verovatnoće DFI, kod pacijentkinja sa povišenim vrednostima PAI-1 dolazi do boljeg odgovora na terapiju tamoksifenom. U PAI-1-pozitivnoj podgrupi tokom prve 2.5 godine terapije tamoksifenom dolazi do pojave metastaza samo kod jedne pacijentkinje od 16 ispitivanih. Nasuprot tome, kod PAI-1-negativne podgrupe, do pojave udaljenih metastaza dolazi u 38% slučajeva. Moguće objašnjenje ovakvog rezultata je u estrogenom regulisanju PAI-1 ekspresije, primarno preko ER. Prema tome visoki nivoi PAI-1 ukazivali bi na veću aktivnost ER, pa bi i terapija tamoksifenom bila mnogo uspešnija kod ove podgrupe.

Analizirajući međusobne odnose ispitivanih molekularnih biomarkera, pozitivna korelacija dobijena je između uPA i PAI-1 ( $p=0.02$ ), kao i između PAI-1 i Ki-67 ( $p=0.02$ ). Pozitivna korelacija uPA i PAI-1 dobijana je i u drugim studijama (Foekens i sar, 1994). Iz toga zaključujemo da sa rastom uPA raste i PAI-1, ali da se njihov uticaj na tok bolesti razlikuje, tj. da u ispitivanoj studiji PAI-1 deluje primarno kao inhibitor uPA. Time on povećava uspešnost terapije tamoksifenom kada je prisutan u višim nivoima. Zajednički rast uPA i PAI-1 zapravo nam sugerše o regulisanju ovih biomarkera od strane zajedničkog transkripcionog faktora. Nisu pronađene korelacije između uPA ili PAI-1 i ER ili PR, što neke od studija potvrđuju (Foekens i sar, 1995), dok druge govore o negativnoj korelaciji između steroidnih receptora i uPA, PAI-1 (Ferno i sar, 1996).

### V.1.8. Prediktivni značaj združenog statusa uPA, PAI-1 i ostalih ispitivanih molekularnih biomarkera

Povezivanjem uPA sa ostalim ispitivanim biomarkerima pokušali smo da već postojeće povoljne ili nepovoljne podgrupe dodatno definišemo.

#### a) uPA

Združivanjem uPA sa ER nisu dobijene podgrupe sa većim prediktivnim potencijalom, ali je preciznije definisana ER-negativna podgrupa pacijentkinja spajanjem sa uPA-pozitivnom. Kod date ER-uPA+ podgrupe do pojave udaljenih metastaza dolazi u svakom drugom slučaju. Ovaj rezultat je i očekivan usled spajanja dve nepovoljne podgrupe koje su zasebno specifične po većoj proliferaciji i invazivnom potencijalu.

Velike razlike između podgrupa dobijene su spajanjem PR i uPA. Kao izrazito nepovoljna podgrupa javlja se uPA+PR-, koja je nastala spajanjem dva nepovoljna biološka parametra. U ovoj podgrupi dolazi do pojave metastaza kod 80% pacijentkinja tokom perioda od 2.5 godina. Slab odgovor na terapiju tamoksifenom je i očekivan kod ove podgrupe upravo zbog „negativnog” statusa PR što ukazuje na aberantne signalne puteve i moguću pojavu *de novo* rezistencije, dok povišen nivo uPA pokazuje intenzivnu razgradnju ekstrasćelijskog matriksa. U poređenju sa ovom nepovoljnom podgrupom, ostali fenotipovi pokazuju mnogo bolji odgovor na terapiju i razliku u vremenu do pojave udaljenih metastaza uPA+PR+ ( $p=0.007$ ), uPA-PR+ ( $p<0.001$ ) i uPA-PR- ( $p=0.04$ ). Prateći distribuciju ostalih molekularnih biomarkera prema navedenim podgrupama među kojima postoji razlika u verovatnoći DFI dobijeno je da izrazito nepovoljna uPA+PR- podgrupa ima smanjene nivoe ER u poređenju sa uPA-PR+. Smanjeni nivo ER je jedan od razloga neuspeha terapije tamoksifenom u ovoj podgrupi.

Povišeni nivoi Her2 povezani su sa progresijom i metastazom tumora (Slamon i sar, 1989). Neke od prekliničkih studija sugerišu da Her2 ima ulogu u progresiji tumora tako što promoviše invazivni kapacitet tumorskih ćelija kroz povećanu adheziju ćelija (Xu i sar, 1997), kao i kroz povišenu ćelijsku pokretljivost (Ignatoski i sar, 2000). Ipak mehanizam na osnovu koga Her2 reguliše metastatski potencijal nije u potpunosti razjašnjen. Skorašnja klinička ispitivanja, na kanceru kolona, ukazuju direktnu ulogu Her2 u invaziji i metastaziranju kroz regulaciju proteolitičkih enzima, pre svega uPA (Berney i sar, 1998). Kada su u pitanju veze Her2 i uPA karcinoma dojke, u studiji Konecny-a i saradnika dokazana je slaba povezanost Her2 i uPA, za koju se smatra je bazirana više na indirektnim interakcijama nego na direktnoj regulaciji (Konecny i sar, 2001). U istoj studiji je na ćelijskim linijama karcinoma dojke sa povišenim nivoom Her2 pokazano da ipak ne dolazi do povećanja uPA. Analizirajući naše podatke došli smo do zaključka da Her2 nema ulogu u regulaciji uPA, tako da mehanizme koji kontrolišu ovu proteazu još treba ispitati. Pored toga spajanjem statusa ova dva biomarkera takođe nisu dobijene povoljne/nepovoljne podgrupe koje bi dalje bile analizirane.

#### b) PAI-1

Za razliku od uPA, PAI-1 pokazuje povezanost sa ER u našoj ispitivanoj grupi, tako da su njihovim združivanjem dobijene izvesne razlike koje ukazuju na tok bolesti. Pacijentkinje sa tumorima koji imaju visoke nivoe PAI-1 i ER, PAI-1+ER+, pokazale su odličan odgovor na terapiju tamoksifenom. Tokom prve 2.5 godine terapije ne dolazi do pojave udaljenih metastaza u ovoj grupi ( $M+=0\%$ ). Iz razlike koja postoji između ove i podgrupe PAI-1+ER- ( $p=0.002$ ), zaključujemo da unutar postojeće povoljne PAI-1-pozitivne podgrupe možemo ukazati na one pacijentkinje koje ipak imaju povećan rizik, a

to su upravo one sa PAI-1+ER- tumorima, gde dolazi do relapsa u 71% slučajeva tokom prvih 2.5 godina praćenja toka bolesti. Prema dobijenoj razlici u verovatnoći DFI između PAI-1-ER+ podgrupe (M+=28%) i PAI-1+ER- (M+=71%) (p=0.03), možemo videti da bez obzira na pozitivan status PAI-1, upravo je ER odlučujući faktor koji povećava interval bez pojave bolesti. Poredeći ekspresije ispitivanih biomarkera između podgrupa PAI-1+ER+ i PAI-1+ER-, kao i između podgrupa PAI-1+ER- i PAI-1-ER+, uočeno je da postoje značajne razlike koje mogu objasniti povoljan/nepovoljan ishod bolesti pacijentkinja u podgrupama. PAI+ER- podgrupa, kao izuzetno nepovoljna sa 71% slučajeva pojave metastaza tokom prvih 2.5 godine terapije, poseduje i znatno viši indeks proliferativnosti (Ki-67) i indeks rasta. Time zaključujemo da tumori sa ovim karakteristikama znatno brže proliferišu, povećavajući na taj način i verovatnoću pojave udaljenih metastaza. Pored toga PAI+ER- tumore karakteriše i smanjeni nivo PR, što je i u skladu sa negativnošću ER i slabim odgovorom na terapiju tamoksifenom.

Kombinacijama prema statusu PAI-1 i PR nisu izdvojene statistički značajne podgrupe, kao i u slučaju PAI-1 i Her2. Iako ne postoje statističke razlike, mogu se izdvojiti dve podgrupe prema statusu PAI-1 i PR, niskorizična podgrupa PAI-1-PR+ sa 16% slučajeva kod kojih je došlo do pojave udaljenih metastaza i visokorizična podgrupa PAI-1-PR- sa 50% metastaza. Ono što ih takođe međusobno razdvaja je ekspresija ER, koja je značajno veća (p=0.05) kod PAI-1-PR+ podgrupe. Kao i u predhodno opisanim podgrupama to je glavni razlog, uz pozitivnost PR za uspeh endokrine terapije.

Spajanjem uPA i PAI-1 takođe nisu dobijeni značajni rezultati, ali se pored toga može izdvojiti visokorizična podgrupa uPA+PAI-1- gde dolazi do pojave metastaza kod svake druge pacijentkinje.

#### **V.1.9. Prediktivni značaj združenog statusa uPA, PAI-1 i patohistoloških parametara prognoze**

uPA i PAI-1 u većini studija se pokazuju kao značajni prognostički parametri, nezavisni od statusa limfnih čvorova, veličine tumora i histološkog gradusa (Duffy i sar, 1999; Schmitt i sar, 1997). Pored toga, uPA i PAI-1 ukazuju na razlike između visoko i niskorizičnih pacijentkinja (Harbeck i sar, 2002; Konecny i sar, 2001), i omogućavaju procenu rizika od pojave metastaza čak i u grupama već definisanim utvrđenim prognostičkim faktorima (Harbeck i sar, 2002). uPA u našoj studiji nije dodatno podelio pacijentkinje već definisane po veličini i histološkom tipu tumora. Kada je u pitanju PAI-1 dobijen je visoko značajan trend između PAI-1+pT1 i PAI-1+pT2,3 tumora (p=0.05). Kod pacijentkinja sa tumorima manjim od 2 cm i sa pozitivnim statusom PAI-1 nije bilo pojave udaljenih metastaza (M+=0%), dok u visokorizičnoj podgrupi PAI-1+pT2,3 pojava metastaza je zabeležena kod svake druge pacijentkinje (M+=50%). Time je i pokazano da sa porastom veličine tumora raste metastatski potencijal, tj. invazivnost tumora, kao i da pozitivan status PAI-1 kao inhibitora invazije, ne utiče na smanjenje metastaziranja kod tumora većih od 2 cm. PAI-1+pT1 tumori definišu podgrupu sa odličnim odgovorom na terapiju tamoksifenom, dok kada je u pitanju nepovoljna podgrupa promena terapije bi mogla doneti više uspeha u smislu odlaganja ponovnog javljanja bolesti.

Bitno je istaći na mogućnost da se kod određenih fenotipova sa specifičnim biološkim karakteristikama javlja rana rezistencija i da promena terapije odmah nakon hiruškog odstranjenja tumora može znatno promeniti tok bolesti.

## V.2. TOK BOLESTI U PERIODU OD 2.5 DO 5 GODINA TERAPIJE TAMOKSIFENOM

Više studija pokazalo je superiornost endokrine terapije inhibitorima aromataza nad tamoksifenom, s tim da pojedine podgrupe pacijentkinja mogu imati veću korist od promene terapije u određeno vreme. Iako studije govore o boljem učinku inhibitora aromataza kao adjuvantne terapije odmah nakon hiruške terapije, posle 2-3 godine i nakon 5 godina inicijalne terapije tamoksifenom (Thürlimann i sar, 2005; Baum i sar, 2002), velika neslaganja postoje oko vremena uključenja ove terapije. Kao bitan faktor u odlučivanju su i negativni efekti inhibitora aromataza poput povećanog rizika od pojave osteoporoze u poređenju sa tamoksifenom koji povećava gustinu kostiju (Debled i sar, 2007). Ipak rizik od pojave metastaza je mnogo veći od rizika koji nose negativni efekti inhibitora aromataza.

Analizama pacijentkinja u periodu od 2.5-5 godine terapije tamoksifenom pokušali smo da odgovorimo na pitanje vremenske zavisnosti ispitivanih biomarkera i klasičnih patohistoloških parametara. Drugim rečima, kao jedno od pitanja koje se postavlja je da li određeni parametar tumora ili pacijenta može ukazati na pojavu udaljenih metastaza u periodu između 2.5-5 godina terapije tamoksifenom, tj. da li parametri zadržavaju svoju prediktivnu moć, definisanu nakon dijagnoze, kod pacijentkinja koje tokom prve 2.5 godine terapije nisu imale pojavu udaljenih metastaza. U našoj grupi pacijentkinja u ovom periodu došlo je do pojave metastaza u 17% slučajeva. Pored toga, praćenjem određenih bioloških karakteristika primarnih tumora pokušali smo odgovoriti na pitanja kako te osobine utiču na pojavu stečene rezistencije na terapiju tamoksifenom.

### V.2.1. Prediktivni značaj patohistoloških parametara

Analize verovatnoća DFI u ovom periodu pokazale su da ne postoje razlike u pojavi udaljenih metastaza između podgrupa definisanih prema patohistološkim parametrima, statusu limfnih čvorova, veličini tumora, histološkom tipu i gradusu. Veličina tumora, koja se pokazala kao značajan parametar tokom prve 2.5 godine terapije, sada gubi svoju značajnost. Time je pokazano da pacijentkinje, bilo sa tumorima pT1 ili pT2,3, koje nisu imale metastaze u prvom delu terapije, sada u periodu od 2.5-5 godina terapije imaju približno jednaku verovatnoću pojave udaljenih metastaza. Isti tok bolesti, u periodu između 2.5-5 godina terapije tamoksifenom, kod pacijentkinja koji su imale tumore različite veličine nam sugeriše o uspehu terapije u ranom periodu.

Važno je istaći da kombinacijama klasičnih patohistoloških parametara takođe nije dobijena razlika između podgrupa.

### V.2.2. Prediktivni značaj ispitivanih biomarkera

Statistička analiza ispitivanih biomarkera u grupi pacijentkinja u periodu od 2.5-5 godine terapije tamoksifenom, sa ciljem potvrđivanja već ustanovljenih ili dobijanja novih graničnih vrednosti, pokazala je da ispitivani biomarkeri nemaju značaj u ovom periodu. Razlike u verovatnoći između niskih i visokih nivoa ER u periodu od 2.5-5 godina terapije nestaju, tj. gubi se povećani rizik od pojave metastaza u ER-negativnoj grupi koji je postojao prve 2.5 godine terapije. Slični rezultati dobijeni su i u drugim studijama (Kennecke i sar, 2008). Kada je u pitanju PR, studija Tovey-a i saradnika govori da je negativnost ovog receptora vremenski zavistan prediktor rizika od pojave metastaza u periodu od prve tri godine terapije tamoksifenom, sa oštrim padom značajnosti nakon toga

(Tovey i sar, 2005). Ovaj rezultat je identičan onom koji je dobijen našom studijom, gde pacijentkinje sa ER+PR- tumorima imaju značajnije lošiji tok bolesti od ER+PR+ tumora u prvih 2.5 godina terapije. Ta značajnost se posle prve 2.5 godine gubi. Gubitak prednosti pacijentkinja koje su imale „pozitivan” status steroidnih receptora govori nam da terapija tamoksifenom više nema uticaja, tako da u preostalim mikrometastazama postoje alternativni mehanizmi koji dovode do njihovog širenja.

### **V.2.3. Prediktivni značaj združenog statusa Her2 i patohistoloških parametara prognoze**

Rezistencija tumora na inicijalnu terapiju tamoksifenom može se javiti veoma brzo po davanju terapije, ali takođe do nje može doći i vremenom kada se već govori o stečenoj rezistenciji (Massarweh i sar, 2008). Utvrđivanje vremena pojave udaljenih metastaza na osnovu mehanizama koji dovode do stečene rezistencije još uvek predstavlja veliki problem. Ipak mnogobrojni dokazi pokazuju da EGFR/Her2 signalni putevi imaju veliki uticaj na pojavu rezistencije (Shou i sar, 2004). U studiji Tovey-a i saradnika govori se da pored uloge Her2 u ranoj rezistenciji, moraju postojati mehanizmi koji stoje iza kasnije pojave metastaza tokom terapije tamoksifenom i koji mogu uključivati predhodno dormantne Her2 puteve koji se takođe mogu detektovati u trenutku dijagnoze (Tovey i sar, 2005).

Računanjem verovatnoće DFI prema statusu amplifikacije Her2 gena, nisu dobijene razlike između podgrupa sa pozitivnim i negativnim statusom. Povezivanje sa patohistološkim parametrima pokazalo se značajnim samo u slučaju združivanja statusa Her2 i veličine tumora. Veličina tumora razdvaja podgrupu pacijentkinja koje imaju tumore sa amplifikacijom Her2 gena na dve podgrupe sa velikom razlikom u verovatnoći DFI ( $p=0.003$ ). Kao povoljna izdvaja se Her2+pT1 podgrupa u kojoj nema pojave metastaza u periodu od 2.5-5 godina terapije tamoksifenom ( $M+=0\%$ ) naspram Her2+pT2,3 kod koje dolazi do pojave metastaza u 57% slučajeva. Prema tome veličina tumora unutar Her2-pozitivne podgrupe igra veoma važnu ulogu u ovom periodu. Interesantno je da se pT2,3 podgrupa tumora na osnovu Her2 statusa takođe može deliti na povoljnu i nepovoljnu ( $p=0.04$ ). Iz toga se može zaključiti da amplifikacija gena znatno doprinosi lošijem toku bolesti kod pacijentkinja sa tumorima većim od 2 cm. Rezultati koji su dobijeni za period od prvih 2.5 godina terapije ne pokazuju ovu značajnost Her2pT statusa koja je dobijena za period od 2.5-5 godine terapije. Moguće objašnjenje je da posle određenog vremena u mikrometastazama dolazi do aktiviranja Her2, kod pacijentkinja koje su primale terapiju tamoksifenom (Gutierrez i sar, 2005; Lipton i sar, 2005). Ova aktivacija Her2 posle 2.5 godine mogla bi se povezati sa smanjenim genomskim delovanjem ER izazvanim tamoksifenom i istovremenim povećanjem negenomskog delovanja ER. Upravo to negenomsko delovanje membranskog ER moglo bi dovesti do aktiviranja nivoa Her2 kao i povećanja agonističke aktivnosti tamoksifena i pojave stečene rezistencije (Massarweh i sar, 2008).



### V.3. TOK BOLESTI U PERIODU PRAĆENJA OD 12 GODINA

Karcinom dojke je bolest sa dugim periodom nastanka, ali i dugim kliničkim tokom bolesti. Za razliku od nekih drugih oblika kancera, kod karcinoma dojke ne postoji petogodišnji period nakon koga bi pacijenti bez metastaza proglašavani potpuno izlečenim. Tako da bi se moglo reći da karcinom dojke predstavlja sistemsku bolest, kod koje dolazi do ponovnog javljanja bolesti čak i 30 godina nakon inicijalne dijagnoze. Glavni izazov u lečenju ove bolesti je da se kod pacijentkinja poveća period bez ponovnog javljanja bolesti pošto su metastaze vodeći uzrok smrti. Podjednako teško i značajno je utvrditi efikasnost terapija, zbog potrebe da se pacijentkinje prate duži vremenski period. Takvo dugo praćenje pacijentkinja sa karcinomom dojke omogućava dobijanje bitnih informacija za lekare i pacijente o dugoročnom ishodu bolesti, na osnovu koga se može planirati i terapija (Gordon i sar, 2007).

#### V.3.1. Prognostički značaj kliničko-patoloških parametara

Praćenjem pacijentkinja kroz dugi period od 12 godina, došli smo do rezultata da kod više od polovine pacijentkinja dolazi do pojave udaljenih metastaza ( $M^+=65\%$ ). Ovakvo dugogodišnje praćenje pacijentkinja nam može ukazati na značaj i efikasnost terapije tamoksifenom u trajanju od 5 godina, s obzirom da kod trećine pacijentkinja sa operabilnim karcinomom dojke dolazi do pojave udaljenih metastaza tokom prvih 10 godina od operacije (EBCTCG, 1990). Značaj klasičnih kliničko-patoloških parametara se menja sa vremenom, tako da određeni prognostički parametri dobijaju, a drugi gube na značaju sa dugim praćenjem toka bolesti.

Više studija govori o gubitku prognostičke moći klasičnih parametara posle određenog vremena (Arriagada i sar, 2006). U ispitivanoj grupi pacijentkinja, za period od 12 godina, kliničko-patološki parametri: zahvaćenost limfnih čvorova malignim ćelijama, veličina tumora, histološki tip i gradus nisu pokazali razliku u verovatnoći DFI.

Kao jedna od bitnih karakteristika karcinoma dojke je da se njegova incidenca povećava sa godinama pacijentkinja (Martelli i sar, 2008). Više od 33% svih karcinoma dojke javlja se kod žena preko 70 godina starosti (Ferlay i sar, 2007). Kada su u pitanju starije pacijentkinje kao najbolja pokazala se hiruška terapija. Ipak, uloga godina pacijenta u prognozi bolesti ostaje veoma kontraverzna (Tsuchiya i sar, 1997). Postoje studije koje govore o godinama kao nezavisnom prognostičkom parametru (Nixon i sar, 1994), dok u drugim nije pronađen uticaj godina pacijenta na prognozu bolesti (Crowe i sar, 1994). Prema studiji Tsuchiya i saradnika, pacijentkinje mlađe od 35 godina i starije od 66 imaju slabije preživljavanje u odnosu na one koje pripadaju središnjoj grupi (Tsuchiya i sar, 1997). Jedno od objašnjenja je da i mlađi i stariji pacijenti imaju tumore sa potencijalom za brz rast i invaziju, što dalje vodi brzoj diseminaciji (Solin i sar, 1989). Takve karakteristike tumora imaju biološku osnovu koja dovodi do lošije prognoze ovih pacijenata.

Godine kao prognostički faktor samo među postmenopauzalnim pacijentkinjama su proučavane u manjoj meri. Host i saradnici ukazuju da nakon 50 godine dolazi do brzog smanjenja preživljavanja (Høst i sar, 1986). Ali uprkos preovlađujućem mišljenju da starije pacijentkinje imaju lošiju prognozu, Fisher i saradnici sugerišu da možda postoje određene promene u histologiji karcinoma dojke koje su povezane sa godinama pacijenta, koje takođe dovode do manje agresivnih tumora kod starijih osoba (Fisher i sar, 1997).

Analizom verovatnoće DFI prema godinama starosti pacijentkinja u ispitivanoj grupi pokazano je da postoji značajna razlika između pacijentkinja starijih i mlađih od 66

godina. Ova razlika nije primećena za period prvih 2.5 godina, kao ni za period između 2.5 i 5 godina terapije tamoksifenom, pokazujući da nema razlike u verovatnoći pojave udaljenih metastaza između mlađih i starijih pacijentkinja u postmenopauzi. Međutim posmatrajući dug period od 12 godina, pacijentkinje starije od 66 godina imaju znatno lošiju prognozu. U ovoj podgrupi čak 80% pacijentkinja u periodu od 12 godina ima pojavu udaljenih metastaza, za razliku od pacijentkinja mlađih od 66 sa 59% slučajeva kod kojih je došlo do metastatske bolesti. Lošija prognoza starijih pacijentkinja mora imati biološku osnovu koja dovodi do nepovoljnog ishoda bolesti. Distribucija biomarkera ispitivanih u našoj grupi nije pokazala da postoje razlike u tumorima ove dve podgrupe.

### **V.3.2. Prognostički značaj fenotipova dobijenih kombinacijom klasičnih kliničko-patoloških parametara**

Godine pacijentkinja u trenutku dijagnoze mogu preciznije definisati visokorizične podgrupe i uz to povećati prognostičku moć drugih klasičnih parametara prognoze. Kombinacijom godina pacijentkinja sa veličinom tumora izdvojene su visokorizične i niskorizične podgrupe. Ono što je bitno ukazati je da pacijentkinje različitih godina, ali sa istom veličinom tumora imaju potpuno drugačiji tok, kao i period bez bolesti. Analizom dobijenih podataka zaključili smo da godine pacijentkinja igraju važnu ulogu u razvoju bolesti, čak i kod pacijentkinja sa istom veličinom tumora koje bi na prvi pogled trebale imati sličan odgovor na terapiju i dalji tok bolesti. Tako pacijentkinje mlađe i starije od 66 godina, a u okviru podgrupa pT1 i pT2,3 pokazuju bitne razlike u vremenu pojave udaljenih metastaza ( $p=0.04$ ,  $p=0.01$ , respektivno). Kao izuzetno povoljna podgrupa je ona sa pacijentkinjama mlađim od 66 godina i sa malim pT1 tumorima ( $M+=55\%$ ), dok je podgrupa sa najnepovoljnijim ishodom  $66 \geq pT2,3$  kod koje dolazi do pojave udaljenih metastaza čak u 92% slučajeva u periodu od 12 godina. Biološku osnovu različitog toka bolesti kod dve podgrupe pacijentkinja različitih po godinama tek treba utvrditi.

Histološki gradus, kao samostalni prognostički parametar, nije pokazao značaj u ispitivanoj grupi pacijentkinja u periodu od 12 godina. Ipak njegovo povezivanje sa godinama pacijentkinja pokazuje da unutar iste podgrupe definisane gradusom jedan pacijentkinje imaju različit tok bolesti u zavisnosti da li su mlađe ili starije od 66 godine ( $p=0.02$ ). U odnosu na povoljnu podgrupu  $<66G1$  kod koje dolazi do pojave udaljenih metastaza samo u 17% slučajeva, kao najnepovoljnija javlja se podgrupa pacijentkinja starijih od 66 godina sa tumorima kod kojih je određen histološki gradus 3. U ovoj podgrupi kod svih pacijentkinja dolazi do pojave metastaza u periodu praćenja od 12 godina. Pri tome sve metastaze u lošijoj  $66 \geq G3$  podgrupi se dešavaju veoma rano, tokom 4-5 godina od dijagnoze, što dodatno pokazuje izuzetnu agresivnost tumora sa ovim karakteristikama.

Daljim poređenjem ekspresija ispitivanih biomarkera nisu dobijene razlike u ovim podgrupama. Još 1957 Mcdonald i saradnici su došli do zaključka da biološki faktori determinišu tok bolesti karcinoma dojke (Mcdonald, 1957). Očigledno lošiji tok bolesti za pojedine podgrupe obuhvaćene našim analizama mora imati osnovu u biološkoj heterogenosti tumora koja se ispoljava kroz različitu agresivnost i invazivnost.

### **V.3.3. Prognostički značaj molekularnih biomarkera: ER, PR, Her2**

Iako tamoksifen značajno produžava period bez pojave bolesti i ukupno preživljavanje (Khoshnoud i sar, 2008), donoseći na taj način veliku korist pacijentkinjama u odlaganju bolesti, postoje izvasna neslaganja o tome koliko dugo ove

pacijentkinje imaju prednost u odnosu na one koje nisu primile terapiju. Dok određene studije govore da se benefit tretmana tamoksifenom smanjuje sa vremenom (Gordon i sar, 2007), druge pokazuju da terapija tamoksifenom poboljšava preživljavanje pacijentkinja sa prisutnim steroidnim receptorima u tumorima i do perioda od 15 godina (EBCTCG, 2005).

Kada je u pitanju ER, postoje konflikti rezultati njegove prognostičke uloge u dužem praćenju. Više studija pokazuje da rana prednost ER-pozitivnih tumora nije zadržana u dugom praćenju (Aamdal i sar, 1984; Parl i sar, 1984), dok Kennecke i saradnici prikazuju da visoko pozitivni status ER smanjuje i do 50% rizik od ponovnog javljanja bolesti u poređenju sa pacijentkinjama koje imaju niske vrednosti ER (Kennecke i sar, 2007). Konflikti rezultati mogu nastati usled malog broja pacijentkinja uključenih u studiju, heterogene populacije pacijentkinja, nedostatka standardne granične vrednosti za ER i kratkog perioda praćenja pacijentkinja (Khoshnoud i sar, 2008).

Ispitivanjem značaja ER u našoj grupi pacijentkinja pokazano je da ovaj biomarker zadržava svoj značaj i u dugom periodu praćenja od 12 godina. Pozitivnost ER uz terapiju tamoksifenom znatno produžava period bez pojave metastaza. U podgrupi pacijentkinja sa ER-pozitivnim tumorima postoji 63% slučajeva u kojima dolazi do pojave udaljenih metastaza, dok u ER-negativnoj podgrupi ovaj procenat iznosi 83%. Slab odgovor na terapiju tamoksifenom kod ER-negativne podgrupe je i očekivan i dokumentovan drugim studijama (EBCTCG, 2004). Pored toga ER-negativni tumori u ispitivanoj podgrupi imaju niz negativnih osobina. Praćenjem ekspresije biomarkera pokazano je da je u ER-negativnim tumorima nivo PR znatno smanjen u odnosu na ER-pozitivnu podgrupu ( $p < 0.001$ ), što je u saglasnosti sa već dobijenom pozitivnom korelacijom između ER i PR ( $p < 0.001$ ). Pored toga, proliferativni indeks Ki-67 i indeks rasta tumora povišen je u ER-negativnim tumorima u odnosu na ER-pozitivne tumore ( $p = 0.03$ ;  $p = 0.06$ ). Ti rezultati pokazuju da se ER-negativni tumori imaju viši nivo proliferacije, koji se manifestuje bržim rastom. To pokazuje i činjenica da se sve pojave metastaza u ER-negativnoj podgrupi dešavaju do 6 godine praćenja. Prema Khoshnoud-u, ER-negativne ćelije karcinoma dojke su specifične po stimulisanoj ekspresiji gena faktora rasta i regulatora ćelijskog ciklusa, a sam status ER upravo daje više informacija vezanih za nivo rasta tumora nego za njegov metastatski kapacitet (Khoshnoud i sar, 2008).

Analiza verovatnoće DFI, u zavisnosti od prisustva amplifikacije Her2 gena, nije pokazala nikakvu statistički značajnu razliku. Može se zaključiti da Her2 nije nezavisan prognostički marker, tako da pacijentkinje sa amplifikacijom Her2 gena nemaju nepovoljniji ishod bolesti gledano kroz dugi period od 12 godina. Združivanjem ER i Her2 takođe nije pokazano prisustvo statistički relevantnih razlika.

#### **V.3.4. Prognostički značaj združenog statusa ER i kliničko-patoloških parametara**

Negativnost ER prema našim rezultatima ne ukazuje samo na slab odgovor na terapiju tamoksifenom, već i otkriva podgrupu tumora koji su agresivniji i sa bržim rastom. Spajanjem ER sa veličinom tumora dodatno se mogu definisati tumori sa negativnim karakteristikama, kao i sa povećanom invazivnošću. Analizama koje su usledile smo zaključili da tumori sa niskim koncentracijama ER i tumorima većim od 2 cm imaju mnogo veću verovatnoću od pojave udaljenih metastaza u poređenju sa ostalim podgrupama. Kod te nepovoljne podgrupe primećena je velika agresivnost, s obzirom da se ponovno javljanje bolesti javlja kod 89% pacijentkinja u periodu od 12 godina. Pored niskih vrednosti ER, analizama distribucije biomarkera dobijeno je da se u ER-pT2,3 tumorima nalaze i izrazito niski nivoi PR i visoki nivoi Ki-67. Kao i u slučaju ER-

negativnih tumora, visoka vrednost indeksa proliferacije dodatno ukazuje na brzinu rasta i metastatski potencijal ovih tumora. Mikrometastaze koje se javljaju tokom rasta primarnog tumora nose sa sobom i njegove negativne osobine, omogućavajući brzu proliferaciju i ponovno javljanje bolesti.

Godine pacijentkinja prema našim analizama predstavljaju nezavisan prognostički parametar. Korelacije između ER i godina pacijentkinja nisu dobijene. Daljim analizama verovatnoće DFI potvrđeno je u većoj meri da negativne podgrupe definisane prema ER i godinama pacijentkinja zajedno otkrivaju podgrupe sa još lošijim tokom bolesti. Godine pacijentkinja i u ovom slučaju su se pokazale kao veoma bitne i otkrile da i unutar podgrupe sa ER-pozitivnim tumorima postoje razlike u toku bolesti. Statistička razlika između ER+<66 i ER+≥66 podgrupa (p=0.04) pokazuje da uprkos pozitivnosti ER koja bi trebalo da donese benefit, starije pacijentkinje imaju znatno lošiji tok bolesti sa 75% slučajeva pojave udaljenih metastaza u periodu od 12 godina. Agresivnost i invazivnost ER-pozitivnih tumora pacijentkinja starijih od 66 godina nam govori da postoje unutrašnje biološke karakteristike tumora koje dovode do lošijeg toka bolesti kod ove podgrupe. Drugo objašnjenje bi bilo u slabijem delovanju tamoksifena kod starijih pacijentkinja, možda zbog gubitka ER sa vremenom. Naše analize biomarkera nisu pokazale razlike u ekspresiji među ispitivanim podgrupama. Utvrđivanjem velike razlike u verovatnoći DFI između ER+<66 i ER-66≥ podgrupa (p=0.001), zaključili smo i da kod svih ER-negativnih pacijentkinja starijih od 66 godina dolazi do pojave metastaza u periodu od 12 godina, i to do 6 godine od trenutka operacije.

Dalje analize novih biomarkera mogle bi otkriti više o ponašanju tumora kod starijih pacijentkinja.

### **V.3.5. Prognostički značaj združenog statusa Her2 i kliničko-patoloških parametara**

Posmatrajući period praćenja bolesti od 12 godina, samostalni status amplifikacije Her2 gena u našoj ispitivanoj grupi nije ukazao na bilo kakve razlike u pojavi udaljenih metastaza kod pacijentkinja sa i bez amplifikacije. Prema drugim studijama, povišena ekspresija Her2 može dodati nove prognostičke informacije uz postojeće koje daju veličina tumora, nodalni status i histološki gradus (Ferrero-Poüs i sar, 2000). Naše analize pokazuju da iako samostalno Her2 i veličina tumora nemaju značajnu prognostičku ulogu, njihovo spajanje ipak otkriva podgrupe koje se znatno razlikuju po verovatnoći DFI. Tako, pacijentkinje sa amplifikacijom Her2 gena mogu imati potpuno drugačiji tok bolesti u zavisnosti od veličine tumora. Kod pacijentkinja sa Her2+pT1 tumorima dolazi do pojave udaljenih metastaza u svakom drugom slučaju, dok u Her2+pT2,3 podgrupi u 88% slučajeva (p=0.04). Statistička razlika je takođe dobijena između podgrupa Her2-pT1 i Her2+pT2,3 (p=0,05). Na ovaj način izdvaja se podgrupa sa tumorima većim od 2 cm i amplifikacijom gena, kod koje treba razmisliti o drugačijem pristupu lečenja.

Povezivanjem parametra godina pacijentkinja sa statusom Her2 potvrđen je veliki značaj godina pacijentkinja kao prognostičkog parametra. U podgrupi pacijentkinja sa Her-negativnim tumorima, postoji razlika između mlađih i starijih od 66 godina (p=0.01). Pacijentkinje starije od 66 godina imaju lošiji tok bolesti i kod njih treba razmotriti uvodjenje drugih terapija.

### **V.3.6. Prognostički značaj uPA i PAI-1**

Procesi progresije i invazije tumora odigravaju se preko niza proteaza, pri čemu uPA igra veoma bitnu ulogu. Preko niza studija je pokazano da je ekspresija uPA i njegovog

inhibitora tipa 1 (PAI-1) povećana kod karcinoma dojke, kao i da je njihova povišena vrednost povezana sa slabijom prognozom (Look i sar, 2002) i slabijim odgovorom na terapiju tamoksifenom (Foekens i sar, 1995). Za razliku od kratkog praćenja gde je dobijena granična vrednost za uPA na osnovu koje su pacijentkinje razdvojene na podgrupe koje se razlikuju po verovatnoći DFI, za period od 12 godina uPA nema značaja. Nasuprot tome, PAI-1 je imao značaj za period prve 2.5 godine terapije, što je potvrđeno i za period od 12 godina. „Pozitivne” vrednosti PAI-1 pokazuju bolju prognozu sa 59% slučajeva pojave udaljenih metastaza u poređenju sa negativnim vrednostima gde dolazi do pojave metastaza u 83% slučajeva ( $p=0.05$ ). Nisu dobijene korelacije između PAI-1 i ostalih molekularnih biomarkera. Dobijeni rezultat koji govori da pacijentkinje sa povišenim nivoom PAI-1 u tumorima imaju bolju dugoročnu prognozu nam ukazuje na moguću regulaciju od strane ER i samim tim uspeh delovanja tamoksifena. Povezivanjem PAI-1 sa ER, VEGF i Her2 statusom, u pogledu verovatnoće DFI nisu izdvojene povoljne/nepovoljne podgrupe.

### V.3.7. Prognostički značaj PAI-1 i kliničko-patoloških parametara

PAI-1 se definiše kao značajan prognostički faktor, nezavisan od klasičnih parametara prognoze kao što su zahvaćenost limfnih čvorova malignim ćelijama, veličina tumora i histološki gradus (Duffy i sar, 2002). Povezivanje PAI-1 sa klasičnim parametrima prognoze u našoj ispitivanoj grupi nije ukazalo na neke specifične podgrupe. Ipak, združivanje PAI-1 sa godinama pacijentkinja izdvojilo je izrazito nepovoljnu podgrupu pacijentkinja starijih od 66 godina sa pozitivnim statusom PAI-1. U ovoj podgrupi kod svih pacijentkinja dolazi do pojave udaljenih metastaza i to već do 6-7 godine praćenja. Značajna razlika je uočena između ove i podgrupe PAI+<66 ( $M+=42%$ ) ( $p=0.03$ ), kao i podgrupe PAI-<66 ( $p=0.01$ ). Velika razlika između podgrupa postoji pre svega zbog prognostičkog značaja godina, što se vidi i time da su podgrupe pacijentkinja sa PAI-1-pozitivnim tumorima i različitih godina potpuno drugačije po toku bolesti.

### V.3.8. Prognostički značaj VEGF

Angiogeneza predstavlja još jedan od ključnih faktora u razvoju tumora, progresiji i metastazi, ali se malo zna o regulaciji ovoga procesa, kao i o učestvovanju steroidnih hormona (Folkman, 1992). Izloženost estrogenu se smatra glavnim faktorom rizika kada je u pitanju karcinom dojke i većina njih zadržava svoju hormonalnu zavisnost (Rossouw i sar, 2002). VEGF predstavlja najznačajniji faktor angiogeneze, o čijoj regulaciji se malo zna. Bitna činjenica koja je ukazala na njegovu moguću regulaciju je otkriće ERE (engl. estrogen response element) u promotornom regionu Vegf gena (Hyder i sar, 2000). Moguća regulacija VEGF ekspresije putem steroidnih hormona, pre svega estrogena, je istraživana u velikoj meri. Nakamura i saradnici tvrde da se celokupna angiogeneza, pa i ekspresija VEGF u epitelijalnim ćelijama terminalne duktalno-lobularne jedinice regulišu putem estrogena i progesterona (Nakamura i sar, 1999). Kao dokaz u prilog toj hipotezi javljaju se određene prekliničke studije na ćelijskim linijama karcinoma dojke u kojima je pokazano da estrogeni indukuju brzu ekspresiju VEGF, koja je zatim blokirana čistim antagonistima estrogena (Hyder i sar, 2000). Povezanost između VEGF i odgovora na terapiju tamoksifenom nedovoljno je ispitana (Rydén i sar, 2005). Više studija govori da tamoksifen, slično kao i estrogen, povišava nivo mRNA VEGF, ali da istovremeno sprečava sekreciju VEGF i na taj način smanjuje nivo ekstraćelijskog VEGF. To je dokazano *in vitro* u ćelijskim kulturama i *in vivo* u solidnim tumorima (Garvin i Dabrosin,

2003). Visoke vrednosti VEGF uglavnom su povezivane sa slabijim odgovorom na terapiju tamoksifenom (Linderholm i sar, 2000; Rydén i sar, 2005). Analizom ispitivane grupe pacijentkinja dobijeni su dosta konflikti rezultati u poređenju sa drugim studijama. U okviru perioda praćenja od 12 godina, pacijentkinje koje su imale tumore sa visokim nivoom VEGF imale su mnogo bolji odgovor na terapiju tamoksifenom i manji procenat pojave metastaza (M+=25%) u poređenju sa VEGF-negativnim (M+=78%). Bolji odgovor pacijentkinja sa „pozitivnim” statusom VEGF može se objasniti regulacijom ekspresije ovoga proteina od strane ER. Samim tim visoke vrednosti ER dovele bi do povišenja ekspresije VEGF, dok bi tamoksifen uspešno delovao kod te grupe blokirajući ER i samim tim i VEGF. U studiji Coradini-ja i saradnika upravo je pokazano da pacijentkinje koje su imale niske nivoe ER i visoke VEGF odgovaraju na terapiju tamoksifenom veoma loše, dok u situaciji gde su visoki nivoi i ER i VEGF uspešnost terapije je mnogo veća (Coradini i sar, 2003).

Ipak daljim analizama u našoj grupi nisu pronađene razlike u ekspresiji VEGF prema „pozitivnom” ili „negativnom” statusu ER. Spajanjem statusa ER i VEGF i analizama verovatnoće DFI takođe nisu izdvojene podgrupe koje bi ukazale na povećani metastatski potencijal VEGF.

Her2 se karakteriše kao mogući faktor koji dovodi do povišenja ekspresije VEGF (Toi i sar, 2001). Analizom distribucije VEGF prema statusu amplifikacije Her2 gena pokazano je da se u Her2-negativnim tumorima nalaze znatno više koncentracije VEGF nego u Her2-pozitivnim ( $p=0.04$ ). To je dokaz da u našoj ispitivanoj grupi Her2 nema ulogu u regulaciji ekspresije VEGF. Analiza verovatnoće DFI takođe nije ukazala na povoljne i nepovoljne podgrupe pacijentkinja.

Odnosi biomarkera angiogeneze i invazije nisu proučavani u velikoj meri. Može se izdvojiti studija Eppenberger-a prema kojoj VEGF pozitivno koreliše sa uPA i PAI-1 (Eppenberger i sar, 1998). Prema ovim podacima dalje se predpostavlja da isti transkripcioni faktor reguliše ekspresiju ovih molekula (Mandriota i sar, 1995). Našim analizama nisu dobijene korelacije između VEGF i PAI-1, ali je dobijena pozitivna korelacija između VEGF i uPA. Analizama DFI prema podgrupama dobijenim spajanjem ovih biomarkera nisu izdvojene povoljne i nepovoljne podgrupe.

Prema rezultatima dobijenim kombinovanjem molekularnih biomarkera u našoj ispitivanoj grupi može se zaključiti da se regulacija ekspresije VEGF odvija pod uticajem nekog od drugih molekula kao što su ras, myc, src (Arbiser i sar, 1997), SP-1 i AP-1 (Milanini i sar, 1998), fosfolipaza C, MAPK, PI3-kinaza (Abedi i Zachary, 1997; Guo i sar, 1995) koje naknadno treba ispitati.

### **V.3.9. Prognostički značaj združenog statusa VEGF i kliničko-patoloških parametara**

VEGF spada u grupu angiogeneznih faktora koji takođe deluju kao važni mitogeni. Njegovo delovanje prvenstveno je povezano sa inicijalnim rastom tumora, ali nije neophodno za kontinuirani rast nakon što je tumor dostigao određenu veličinu. Takođe je dokazano da supresija VEGF nije imala efekat na rast većih tumora (Linderholm i sar, 2000). U većini studija VEGF ne koreliše sa konvencionalnim prognostičkim faktorima (Gasparini i sar, 2000). Ipak, mogu se izdvojiti studije različitog trajanja u kojima je dokazana pozitivna veza VEGF sa veličinom tumora i histološkim gradusom (Linderholm i sar, 1998), dok u studiji Linderholm-a i saradnika VEGF nije povezan sa statusom limfnih čvorova, a izvestan trend je dobijen sa povećavajućom veličinom tumora (Linderholm i sar, 2000).

Povezujući veličinu tumora sa statusom VEGF dobijena je razlika između podgrupa VEGF+pT1 i VEGF+pT2,3 ( $p=0.03$ ). U podgrupi pacijentkinja sa većim tumorima od 2 cm i pozitivnim statusom VEGF (VEGF+pT2,3) kod svih pacijentkinja dolazi do pojave udaljenih metastaza u periodu od 12 godina. Iz ovih rezultata se može zaključiti da bez obzira na pozitivan status VEGF, koji prema našim rezultatima predstavlja pozitivnu karakteristiku za primenu tamoksifena, kod velikih tumora prognoza je veoma nepovoljna.

Usled malog broja studija o adjuvantnoj endokrinoj terapiji kod starijih pacijentkinja, preko 65 godina, odnos VEGF i godina pacijentkinja nije precizno definisan (Coradini i sar, 2003; Castiglione i sar, 1990). Nisu pronađene razlike u ekspresiji VEGF kod pacijentkinja starijih i mlađih od 66 godina. Analizama verovatnoće DFI prema statusu VEGF i godina pacijentkinja razlika je dobijena u VEGF negativnoj podgrupi između mlađih i starijih od 66 godina ( $p=0.02$ ). Kao negativna je podgrupa VEGF-66 $\geq$  sa 91% slučajeva pojave udaljenih metastaza.

Razumevanje regulatora angiogeneze i njihovog odnosa sa steroidnim receptorima je neophodno da bi se poboljšale opcije vezane za terapiju, pronašle strategije prevencije i na kraju poboljšalo preživljavanje pacijentkinja. Važno je sagledati da tumorske i epitelijalne ćelije predstavljaju deo većeg entiteta, pre nego samostalne jedinice i da se aktivacija većeg broja faktora odvija na posttranslacionom nivou u ekstraćelijskom prostoru. Takođe, različite ćelije koje čine tumor mogu oslobađati više regulatora angiogeneze, tako da istovremeno može biti aktivno i više puteva angiogeneze. Dalja istraživanja moraju biti zasnovana na proučavanju odnosa između molekula, pre nego na jednom faktoru angiogeneze.

## VI. ZAKLJUČAK

### VI.1. PRAĆENJE BOLESTI PACIJENTKINJA TOKOM PRVIH 2.5 GODINA OD POČETKA PRIMANJA TERAPIJE TAMOKSIFENOM

- Analizama klasičnih patohistoloških parametara zaključeno je da veličina tumora predstavlja značajan prediktivni faktor, pri čemu je rizik od pojave udaljenih metastaza znatno veći kod pacijentkinja sa tumorima većim od 2 cm.
- ER je potvrđen kao najznačajniji prediktivni molekularni biomarker, čija pozitivna vrednost ( $5 \text{ fmol/mg} \geq$ ) ukazuje na povoljan klinički tok bolesti. PR-negativni ( $<5 \text{ fmol/mg}$ ) status u okviru ER-pozitivnih, kao i u okviru ER-negativnih tumora ukazuje na moguću pojavu *de novo* rezistencije. Visokorizične podgrupe pacijentkinja su određene pozitivnim statusom uPA ( $0.26 \text{ ng/mg} \geq$ ) ili negativnim statusom PAI-1 ( $<4.5 \text{ ng/mg}$ ). Združivanjem pozitivnog statusa ER i PAI-1 formiraju se povoljni fenotipovi, dok povezivanjem negativnog PR i negativnog uPA nastaju nepovoljni fenotipovi kao prediktivni pokazatelji.
- Kombinacijom ispitivanih patohistoloških parametara i molekularnih biomarkera izdvajaju se visokorizične podgrupe pacijentkinja sa: tumorima jednakim ili većim od 2cm združenim sa negativnim statusom ER ili PR, ili sa pozitivnim statusom PAI-1. Takođe i tumori sa najnepovoljnijim histološkim gradusom združenim sa negativnim statusom ER ili PR.
- Kombinacijom molekularnih biomarkera izdvojene su visokorizične podgrupe pacijentkinja za pojavu udaljenih metastaza sa: tumorima sa negativnim statusom ER i pozitivnim statusom uPA ili PAI-1, i negativnim statusom za PR i pozitivnim statusom za uPA.

### VI.2. TOK BOLESTI U PERIODU PRAĆENJA IZMEĐU 2.5 i 5 GODINA TERAPIJE TAMOKSIFENOM

Tokom ovog perioda prate se pacijentkinje koje u prvih 2.5 godina terapije tamoksifenom nisu imale pojavu udaljenih metastaza.

- U periodu između 2.5 i 5 godina terapije patohistološki parametri i ispitivani molekularni biomarkeri nisu pokazali prediktivni značaj. Time se zaključuje da pacijentkinje koje tokom prve 2.5 godine nisu imale pojavu metastaza, u periodu od 2.5-5 godine terapije nisu pokazale značajnost za pojavu udaljenih metastaza od klasičnih patohistoloških parametara i molekularnih biomarkera.
- Status Her2 samostalno ne pokazuje značaj, ali u kombinaciji sa veličinom tumora izdvajaju se podgrupe koje imaju značajnost u ovom periodu praćenja. Izrazito visokorizična je podgrupa sa amplifikacijom Her2 gena ispoljena u tumorima jednakim ili većim od 2cm. Kod pacijentkinja sa tumorima koji imaju ove karakteristike može se govoriti o pojavi stečene ili kasne rezistencije.



### VI.3. TOK BOLESTI U PERIODU PRAĆENJA PACIJENTKINJA OD 12 GODINA

Tokom perioda praćenja od 12 godina možemo govoriti o dugoročnom efektu terapije tamoksifenom, odnosno prognostičkom značaju kliničko-patoloških parametara i molekularnih biomarkera karcinoma dojke.

- Od kliničko-patoloških parametara samo godine pacijentkinja u trenutku operacije imaju prognostički značaj. Pacijentkinje sa ili preko 66 godina imaju znatno povećan rizik od pojave udaljenih metastaza u periodu od 12 godina, što ukazuje na drugačiju biološku agresivnost tumora ovih pacijentkinja.
- Pojedinačni pozitivni statusi ER ( $5 \text{ fmol/mg} \geq$ ), VEGF ( $571.8 \text{ pg/mg} \geq$ ) i PAI-1 ( $2.11 \text{ ng/mg} \geq$ ) pokazatelji su bolje prognoze pacijentkinja.
- Pacijentkinje sa ili starije od 66 godina uvek imaju lošiju prognozu bez obzira na veličinu tumora, kao i u okviru najpovoljnijeg histološkog gradusa.
- Povezivanjem ispitivanih molekularnih biomarkera i kliničko-patoloških parametara izdvojene su nepovoljne podgrupe pacijentkinja sa: tumorima jednakim i većim od 2cm bilo sa negativnim statusom ER, pozitivnim statusom VEGF ili sa amplifikacijom Her2. U okviru grupe pacijentkinja jednakih ili starijih od 66 godina to su podgrupe sa tumorima sa negativnim statusom ER ili VEGF, zatim pozitivnim statusom PAI-1 ili sa amplifikacijom Her2 gena.
- Kombinacijom molekularnih biomarkera izdvojena je visokorizična podgrupa pacijentkinja sa negativnim statusom ER i VEGF.

## VII. LITERATURA

- Aamdal S, Børner O, Jørgensen O, Høst H, Eliassen G, Kaalhus O, Pihl A. Estrogen receptors and long-term prognosis in breast cancer. *Cancer*. 1984;53:2525-9.
- Abedi H and Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem*. 1997;272:15442-51.
- Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Mongr*. 1994;16:35-42.
- Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57:25-40.
- Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer*. 1997;72:1-22.
- Antoniotti S, Maggiora P, Dati C, De Bortoli M. Tamoxifen up-regulates c-erbB-2 expression in oestrogen-responsive breast cancer cells in vitro. *Eur J Cancer*. 1992;28:318-21.
- Antoniotti S, Taverna D, Maggiora P, Sapei ML, Hynes NE, De Bortoli M. Oestrogen and epidermal growth factor down-regulate erbB-2 oncogene protein expression in breast cancer cells by different mechanisms. *Br J Cancer*. 1994;70:1095-101.
- Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, Ghiso N, Cao Y, Klauber N, Frank D, Brownlee M, Flynn E, Parangi S, Byers HR, Folkman J. Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:861-6.
- Argiris A, Wang CX, Whalen SG, DiGiovanna MP. Synergistic interactions between tamoxifen and trastuzumab (Herceptin). *Clin Cancer Res*. 2004;10:1409-20.
- Arteaga CL, Osborne CK. Growth factors as mediators of estrogen/antiestrogen action in human breast cancer cells. In: Lippman ME, Dickson RB, eds. *Regulatory mechanisms in breast cancer: advances in cellular and molecular biology of breast cancer*. Boston: Kluwer Academic. 1991;289-304.
- Arriagada R, Le MG, Dunant A, Tubiana M, Contesso G. Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma: correlation between clinicopathologic factors and the risk of death in each 5-year period. *Cancer*. 2006;106:743-50.
- Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in 2 large breast cancer databases. *J Clin Oncol*. 2003;21:1973-9.
- Baum M, Buzdar A, Cuzick J, Forbes J, Houghton J, Howell A, Sahmoud T; ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) Trialists' Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer*. 2003;98:1802-10.
- Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JG, Sahmoud T; ATAC Trialists' Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet*. 2002;359:2131-9.

- Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, Shepard HM, Osborne CK. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat.* 1992;24:85-95.
- Beresford MJ, Wilson GD, Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res.* 2006;8:216.
- Bianco AR, De Laurentiis M, Carlomagno C: 20 year update of the Naples GUN trial of adjuvant breast cancer therapy: Evidence of interaction between c-erbB-2 expression and tamoxifen efficacy. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 1998;17:97.
- Berney CR, Yang J, Fisher RJ, Russell PJ and Crowe PJ. Correlates of urokinase-type plasminogen activator in colorectal cancer: positive relationship with nm23 and c-erbB-2 protein expression. *Oncol Res.* 1998;10:47-54.
- Bittner JJ. The causes and control of mammary cancer in mice. *Harvey Lect.* 1947;42:221.
- Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957;11:359-77.
- Bloom ND, Tobin EH, Schreibman B, Degenshein GA. The role of progesterone receptors in the management of advanced breast cancer. *Cancer.* 1980;45:2992-7.
- Boccardo F, Rubagotti A, Amoroso D, Mesiti M, Romeo D, Caroti C, Farris A, Cruciani G, Villa E, Schieppati G, Mustacchi G. Italian Breast Cancer Cooperative Group Sequential tamoxifen and aminoglutethimide versus tamoxifen alone in the adjuvant treatment of postmenopausal breast cancer patients: results of an Italian cooperative study. *J Clin Oncol.* 2001;19:4209-15.
- Borg A, Baldetorp B, Fernö M, Killander D, Olsson H, Rydén S, Sigurdsson H. ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer. *Cancer Lett.* 1994;81:137-44.
- Borg A, Tandon AK, Siggurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SAW, Killander D and McGuire WL. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.* 1990;50:4332-7.
- Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group, Thürlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Rabaglio M, Smith I, Wardley A, Price KN, Goldhirsch A. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:2747-57.
- Brisken C, Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2002; 7:39-48.
- Brooks SC, Saunders DE, Singhakowinta A, Vaitkevicius VK. Relation of tumor content of estrogen and progesterone receptors with response of patients to endocrine therapy. *Cancer.* 1980;46:2775-8.
- Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology.* 2002;40:2-11.
- Buckley MM-T, Goa KL. Tamoxifen: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use. *Drugs.* 1989;37:451-90.
- Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBOJ.* 1996;15:2174-83.
- Busso N, Masur SK, Lazega D, Waxman S and Ossowski L. Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor: possible mechanisms for signal transduction in human epithelial cells. *J Cell Biol.* 1994;126:259-70.

- Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem.* 2001;276:9817–24.
- Carraway KL 3rd, Sliwkowski MX, Akita R, Platko JV, Guy PM, Nuijens A, Diamonti AJ, Vandlen RL, Cantley LC, Cerione RA. The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem.* 1994;269:14303-6.
- Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S. CerbB2 overexpression decreases the benefit of adjuvant Tamoxifen in early-stage breast cancer without ancillary lymph node metastases. *J Clin Oncol.* 1996;14:2702-8.
- Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev.* 1990;11:201-20.
- Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F, Collen D. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinase during aneurysm formation. *Nat Gen.* 1997;17:439–44.
- Castiglione M, Gelber RD, Goldhirsch A. Adjuvant systemic therapy for breast cancer in the elderly: competing causes of mortality. International Breast Cancer Study Group *J Clin Oncol.* 1990;8:519–26.
- Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J.* 2001;20:6050-9.
- Cerillo G, Rees A, Manchanda N, Reilly C, Brogan I, White A, Needham M. The oestrogen receptor regulates NFkappaB and AP-1 activity in a cell-specific manner. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998;67:79–88.
- Chambrud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Balieu EE. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem.* 1990;265:20686–91.
- Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1002-15.
- Chung YL, Sheu ML, Yang SC, Lin CH, Yen SH. Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between Her2/ neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer. *Int J Cancer.* 2002;97:306-12.
- Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist.* 2004; 9:606-16. Ciatto S, Cecchini S, Grazzini G, Iossa A, Bartoli D, Rasponi A. Tumor size and prognosis of breast cancer with negative axillary nodes. *Neoplasma.* 1990;37:179-84.
- Clarke RB., Laidlaw IJ, Jones LJ, Howell A. and Anderson E. Effect of tamoxifen on Ki67 labelling index in human breast tumours and its relationship to oestrogen and progesterone receptor status. *Brit J Cancer.* 1993;67:606–11.
- Clark GM, McGuire WL. Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.* 1991;51:944-8.
- Clark R, Skaor T, Bauman T. Hormonal carcinogenesis in breast cancer: cellular and molecular studies of malignant progression. *Breast cancer Res Treat.* 1994;31:237-48.
- Conneely OM, Jericevic BM, Lydon JP. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003;8:205-14.

- Coradini D, Biganzoli E, Pellizzaro C, Veneroni S, Oriana S, Ambrogi F, Erdas R, Boracchi P, Daidone MG, Marubini E. Vascular endothelial growth factor in node-positive breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Br J Cancer*. 2003;89:268-70.
- Crowe JP Jr, Gordon NH, Shenk RR, Zollinger RM Jr, Brumberg DJ, Shuck JM. Age does not predict breast cancer outcome. *Arch Surg*. 1994;129:483-7.
- Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol*. 2005;23:7721-35.
- Cuzick J, Sasieni P, Howell A. Should aromatase inhibitors be used as initial adjuvant treatment or sequenced after tamoxifen? *Br J Cancer*. 2006;94:460-4.
- Dabrosin C. Sex steroid regulation of angiogenesis in breast tissue. *Angiogenesis*. 2005;8:127-36.
- D'Amato G, Patarca R. General biological aspects of oncogenesis. *Crit Rev Oncog*. 1998;9:275-373.
- Dankort D, Land Muller WJ. Signal transduction in mammary tumorigenesis: a transgenic perspective. *Oncogene*. 2000;19:1038-44.
- Davis MD, Buder WB and Brooks SC. Induction of tissue plasminogen activator mRNA and activity by structurally altered estrogens. *Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;52:421-30.
- Daxenbichler G, Forsthuber EP, Marth C, Kemmler G, Wiegele J, Margreiter R, Müller L, Hausmaninger H, Manfreda D, Dapunt O. Steroid hormone receptors and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1988;12:267-73.
- Dhingra K. Antiestrogens--tamoxifen, SERMs and beyond. *Invest New Drugs*. 1999;17:285-311.
- Debled M, MacGrogan G, Brouste V, Mathoulin-Pelissier S, Durand M, Mauriac L. Prognostic factors of early distant recurrence in hormone receptor-positive, postmenopausal breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy: results of a retrospective analysis. *Cancer*. 2007;109:2197-204.
- Dexter DL, Spremulli EN, Fligel Z, Barbosa JA, Vogel R, VanVoorhees A, Calabresi P. Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *Am J Med*. 1981;71:949-56.
- DiGiovanna MP, Carter D, Flynn SD, Stern DF. Functional assay for HER-2/neu demonstrates active signalling in a minority of HER-2/neu-overexpressing invasive human breast tumours. *Br J Cancer*. 1996;74:802-6.
- Donegan WL. Prognostic factors: Stage and receptor status in breast cancer *Cancer*. 1992;15:1755-64.
- Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, Tubbs RR, Skacel M, Grogan T, Roche P, Hicks DG. The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: a fluorescent in situ hybridization, immunohistochemical, and isotopic mRNA in situ hybridization study. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:1221-7.
- Dowsett M, on behalf of the ATAC trialists group: Analysis of time to recurrence in the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial according to estrogen receptor and progesterone receptor status. *Breast Cancer Res Treat*. 2003;82:7.
- Dowsett M, Cooke T, Ellis I, Gullick WJ, Gusterson B, Mallon E and Walker R. Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? *European Journal of Cancer*. 2000;36:170-6.
- Dowsett M, Cuzick J, Wale C, Howell T, Houghton J, Baum M. Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: an hypothesis-generating study. *J Clin Oncol*. 2005;23:7512-7.

- Dressler LG, Thor AD. HER2 testing: laboratory, technical and clinical considerations. *Breast Dis.* 2000;11:77-87.
- Duffy MJ. Do proteases play a role in cancer invasion and metastasis? *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1987;23:583-9.
- Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem.* 2002;48:1194-7.
- Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem.* 2005;51:494-503.
- Duffy MJ, Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem.* 2004;37:541-8.
- Duffy MJ, Maguire TM, McDermott EW, O'Higgins N. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg Oncol.* 1999;71:130-5.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Treatment of early breast cancer: worldwide evidence 1985-1990, vol 1 Oxford:Oxford University Press, 1990.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 1998;351:1451-67.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;365:1687-1717.
- Elledge RM, Green S, Ciocca D, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, Ravdin P, O'Sullivan J, Martino S, Osborne CK. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group study. *Clin Cancer Res.* 1998;4:7-12.
- Ellis PA, Saccani-Jotti G, Clarke R, Johnston SR, Anderson E, Howell A, A'Hern R, Salter J, Detre S, Nicholson R, Robertson J, Smith IE, Dowsett M. Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int J Cancer.* 1997;72:608-13.
- 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.* 2002;41:151-2.
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M and Gustafsson J.-Å. Human estrogen receptor-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:4258-65.
- EORTC Breast Cancer Cooperative Group. Revision of the standard for the assessment of hormone receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer.* 1980;9:1513-5.
- Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H, Matter A, Zuber M, Luescher K, Litschgi M, Schmitt M, Foekens JA, Eppenberger-Castori S. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 1998;16:3129-36.
- Ferguson DJ, Anderson TJ. Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the "resting" human breast. *Br J Cancer.* 1981;44:177-81.
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 2007;18:581-92.

- Ferno MN, Bendahl PO, Borg A, Bmdell J, Hischberg L, Olsson H and Killander D. Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer. analyzed in steroid receptor cytosols with a IMMetric immunoassay. *Eur J Cancer*. 1996;32:793-801.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18:4-25.
- Ferrero-Pois M, Hacène K, Bouchet C, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Spyratos F. Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res*. 2000;6:4745-54.
- Fidler IJ. Review: biologic heterogeneity of cancer metastases. *Breast Cancer Res Treat*. 1987;9:17-26.
- Fisher B. Some thoughts concerning the primary therapy of breast cancer. *Recent Results Cancer Res*. 1976;57:150-63.
- Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, TanChiu E, Ford L, Wolmark N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:1371-88.
- Fisher ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers: protocol no.4. *Cancer*. 1984;53:712-23.
- Fisher CJ, Egan MK, Smith P, Wicks K, Millis RR, Fentiman IS. Histopathology of breast cancer in relation to age. *Br J Cancer*. 1997;75:593-6.
- Fleming FJ, Myers E, Kelly G, Crotty TB, McDermott EW, O'Higgins NJ, Hill AD, Young LS. Expression of SRC-1, AIB1, and PEA3 in HER2 mediated endocrine resistant breast cancer; a predictive role for SRC-1. *J Clin Pathol*. 2004;57:1069-74.
- Foekens J, Look MP, Peters HA, van Putten WLJ, Portengen H, Klijn JGM. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:751-6.
- Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, Peters HA, Bontenbal M, Janicke F and Klijn JG. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res*. 1992;52:6101-5.
- Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, Peters HA, Kramer MD, Jänicke F, Klijn JG. Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 1994;12:1648-58.
- Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol*. 1992;3:65-71.
- Fowble BL, Schultz DJ, Overmoyer B, Solin LJ, Fox K, Jardines L, Orel S, Glick JH. The influence of young age on outcome in early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994;30:23-33.
- Fox SB, Generali DG, Harris AL. Breast tumour angiogenesis. *Breast Cancer Res*. 2007;9:216.
- Fuqua SAW. Estrogen, estrogen receptors and selective estrogen receptor modulators in human breast cancer. *J Woman's Cancer*. 2000;2:21-32.
- Gapinski PV, Donegan WL. Estrogen receptors and breastcancer: prognostic and therapeutic implications. *Surgery*. 1980;88:386-93.
- Garvin S, Dabrosin C. Tamoxifen inhibits secretion of vascular endothelial growth factor in breast cancer in vivo. *Cancer Res*. 2003;63:8742-8.

- Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist*. 2000;5:37-44.
- Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI. Phosphorylation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to antihormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer. *Int J Cancer*. 2001;95:247-54.
- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991;138:867-73.
- Gordon NH, Silverman P, Lasheen W, Meinert J, Siminoff LA. Thirty-year follow-up of chemo/hormonal therapy in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;102:301-12.
- Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS and Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*. 1995;270:6729-33.
- Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK, Dowsett M.. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol*. 2005;23:2469-76.
- Hähnel R, Woodings T, Vivian AB. Prognostic value of estrogen receptors in primary breast cancer. *Cancer*. 1979;44:671-5.
- Harbeck N, Kates R, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors uPA and PAI-I for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncology*. 2002;20:1000-9.
- Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates R, Hofler H, Janicke F, Graeff H and Schmitt M. Riskgroup discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up. *Br J Cancer*. 1999;80:419-26.
- Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost*. 2004;91:450-6.
- Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JG, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and and plasminogen activator inhibitor type 1 (n=3424). *Cancer Res*. 2002;62:4617-22.
- Harper-Wynne CL, Sacks NP, Shenton K, MacNeill FA, Sauven P, Laidlaw IJ, Rayter Z, Miall S, Howes A, Salter J, Hills MJ, Lowe FM, A'Hern R, Nasiri N, Doody D, Iqbal J, Dowsett M. Comparison of the systemic and intratumoral effects of tamoxifen and the aromatase inhibitor vorozole in postmenopausal patients with primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:1026-35.
- Harris JR and Henderson IC. Natural history and staging of breast cancer. In: Harris JR, Hellman S, Henderson IC, Kinne DW, editors. *Breast diseases*. Philadelphia : JB Lippincot comp; 1987. p. 233-58.
- Hayes DF, Thor AD. c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. *Semin Oncol*. 2002;29:231-45.
- Hayes DF, Trock B, Harris AL, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52:305-19.
- Heather LL, Jeffrey MR. Minireview: Hormones and mammary cell fate-what will I become when I grow up? *Endocrinology*. 2008;149:4317-21.



- Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA and Howard PL. Amplification of the c-erbB-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 1990;114:160-3.
- Henderson BE, Ross RK, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res.* 1988;48:246–53.
- Hennighausen L, Robinson GW. Signaling pathways in mammary gland development. *Dev Cell.* 2001;4:67–75.
- Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 1984;44:2259-65.
- Herlyn M, Clark WH, Rodeck U, Mancianti ML, Jambrosic J, Koprowski H. Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest.* 1987;56:461-74.
- Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;52:227-37.
- Holland JF, Frei E, Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Wechselbaum RR. In: Holland JF, Frei E, Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Wechselbaum RR. *Cancer Medicine.* Hamilton: B.C.Decker Inc.; 2000. p. 195-7.
- Holloway JN, Murthy S, El-Ashry D. A cytoplasmic substrate of mitogen-activated protein kinase is responsible for estrogen receptor-alpha down-regulation in breast cancer cells: the role of nuclear factor-kappa B. *Molecular Endocrinology.* 2004;18:1396–410.
- Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science.* 1992;256:1205-10.
- Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB, Fuqua SA. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res.* 2004;10:2751-60.
- Hortobagyi G. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med.* 1998;339:974–84.
- Hortobagyi GN. Overview of treatment results with trastuzumab (Herceptin) in metastatic breast cancer. *Semin Oncol.* 2001;28:43-7.
- Høst H, Lund E. Age as a prognostic factor in breast cancer. *Cancer.* 1986;57:2217-21.
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 1992;267:26031-7.
- Houghton J, ATAC Trialists' Group. Using anastrozole as initial adjuvant treatment prevents early and reduces adverse events: updated data from the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial. *J Clin Oncol.* 2005;23:4.
- Houghton J, ATAC Trialists' Group. Initial adjuvant therapy with anastrozole (S) reduced rates of early breast cancer recurrent and adverse events compared with tamoxifen (T)—data reported on behalf of the ATAC ('Arimidex', Tamoxifen, Alone or in Combination) Trialists' group. *Ann Oncol.* 2006;17:94.
- Hyder SM, Huang JC, Nawaz Z, Boettger-Tong H, Makela S, Chiappetta C, Stancel GM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. *Environ Health Perspect.* 2000;108:785–90.
- Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Stancel GM. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2000;60:3183-90.

- Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB. The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol.* 1997;11:693–705.
- Ignatoski KM, Maehama T, Markwart SM, Dixon JE, Livant DL and Ethier SP. ERBB-2 overexpression confers PI 3 kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br J Cancer.* 2000;82:666–74.
- Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA, Hortobagyi GN. Use of tamoxifen for breast cancer: Twenty-eight years later. *J Clin Oncol.* 1995;13:513–29.
- Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M. For the German Chemo No Study Group. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:913–20.
- Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Höfler H, Graeff H. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong, independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1993;24:195-208.
- Jänicke F, Schmitt M, Graeff H. Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer. *Sem Thromb Hemost.* 1991;17:303-12.
- Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee KH, Skaar T, Storniolo AM, Li L, Araba A, Blanchard R, Nguyen A, Ullmer L, Hayden J, Lemler S, Weinshilboum RM, Rae JM, Hayes DF, Flockhart DA. CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *JNCI.* 2005;97:30-9.
- Jirström K, Rydén L, Anagnostaki L, Nordenskjöld B, Stål O, Thorstenson S, Chebil G, Jönsson P-E, Fernö M, Landberg G. Pathology parameters and adjuvant tamoxifen response in a randomised premenopausal breast cancer trial *J Clin Pathol.* 2005;58:1135-42.
- Johnston SR, Saccani-Jotti G, Smith IE, Salter J, Newby J, Coppen M, Ebbs SR, Dowsett M. Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer. *Cancer Res.* 1995;55:3331–8.
- Jordan VC, O'Malley BW. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:5815-24.
- Judd HL, Judd GE, Lucas WE, Yen SSC. Endocrine function of the postmenopausal ovary: concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral vein blood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1974;39:1020–4.
- Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem.* 2000;275:18447-53.
- Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBOJ.* 1996;15:254-64.
- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science.* 1995;270:1491-4.
- Kendal WS, Frost P. Genetic instability and tumor progression. *Pathol Immunopathol Res.* 1986;5:455-67.

- Kennecke H, McArthur H, Olivotto IA, Speers C, Bajdik C, Chia SK, Ellard S, Norris B, Hayes M, Barnett J, Gelmon KA. Risk of early recurrence among postmenopausal women with estrogen receptor-positive early breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. *Cancer*. 2008;112:1437-44.
- Kennecke HF, Olivotto IA, Speers C, Norris B, Chia SK, Bryce C, Gelmon KA. Late risk of relapse and mortality among postmenopausal women with estrogen responsive early breast cancer after 5 years of tamoxifen. *Ann Oncol*. 2007;18:45-51.
- Khoshnoud MR, Fornander T, Johansson H, Rutqvist LE. Long-term pattern of disease recurrence among patients with early-stage breast cancer according to estrogen receptor status and use of adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;107:71-8.
- Kirschner MA, Schneider G, Ertel NH, Worton E. Obesity, androgens, estrogens, and cancer risk [abstract]. *Cancer Res*. 1982;42:3218.
- Klauning JE and Randall JR. Biology of disease. Role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab Invest*. 1990;62:135-46.
- Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato ACB. A 13bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:647-64.
- Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:2905-19.
- Knight WA, Osborne CK, McGuire WL. Hormone receptors in primary and advanced breast cancer. *Clin Endocrinol Metab*. 1980;9:361-8.
- Knight WA 111, Livingston RB, Gregory EJ, McGuire WL. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res*. 1977;37:4669-71.
- Knoop AS, Bentzen SM, Nielsen MM, Rasmussen BB, Rose C. Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53, and steroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2001;19:3376-84.
- Knowlden JM, Hutcheson IR, Jones HE, Madden T, Gee JM, Harper ME, Barrow D, Wakeling AE and Nicholson RI. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology*. 2003;144:1032-44.
- Kohail HM, Elias EG, el-Nowiem SA, Bashirelahi N, Didolkar MS, Reed WP. A multifactorial analysis of steroid hormone receptors in stages I and II breast cancer. *Ann Surg*. 1985;201:611-7.
- Konakova M, Hucho F and Schleuning WD. Downstream targets of urokinase-type plasminogen-activator-mediated signal transduction. *Eur J Biochem*. 1998;253:421-9.
- Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:142-53.
- Konecny G, Untch M, Arboleda J, Wilson C, Kahlert S, Boettcher B, Felber M, Beryt M, Lude S, Hepp H, Slamon D, Pegram M. Her-2/neu and urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2448-57.
- Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol*. 1993;7:1603-16.

- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson J.-Å. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor. *Endocrinology*. 1998;139:4252–63.
- Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*. 1988;51:941–51.
- Kurebayashi J. Resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005;56:39-46.
- Kurebayashi J, Otsuki T, Moriya T, Sonoo H. Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Jpn J Cancer Res*. 2001;92:1093–101.
- Langan Fahey SM, Jordan VC, Fritz NF, Robinson SP, Waters D, Tormey DC. Clinical pharmacology and endocrinology of long-term tamoxifen therapy. In: Jordan VC, editor. *Long-term tamoxifen treatment for breast cancer*. Madison: The University of Wisconsin Press; 1994.
- Lapidus RG, Nass SJ, Butash KA, Parl FF, Weitzman SA, Graff JG, Herman JG, Davidson NE. Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 1998;58:2515–9.
- Lapidus RG, Nass SJ, Davidson NE. The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1998;3:85-94.
- Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:2920–5.
- Levin ER: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol*. 2001;91:1860-7.
- Lengyel E, Gum R, Stepp E, Juarez J, Wang H, Boyd D. Regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by an ERK1-dependent signaling pathway in a squamous cell carcinoma cell line. *J Cell Biochem*. 1996;61:430-8.
- Levenson AS, Kwaan HC, Svoboda KM, Weiss IM, Sakurai S, Jordan VC. Oestradiol regulation of the components of the plasminogen-plasmin system in MDA-MB-231 human breast cancer cells stably expressing the oestrogen receptor. *Br J Cancer*. 1998;78:88-95.
- Levin ER. Cellular functions of the plasma membrane estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 1999;10:374-7.
- Lee H, Bai W. Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2002;22:5835-45.
- Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS. Phosphorylation of the human estrogen receptor: Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem*. 1994;269:4458-66.
- Li L, Haynes MP, Bender JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:4807-12.
- Li X, Lonard DM, O'Malley BW: A contemporary understanding of progesterone receptor function. *Mech Ageing Dev*. 2004;125:669-78.
- Lien EA, Solheim E, Ueland PM. Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. *Cancer Res*. 1991;51:4837-44.

- Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R. Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol.* 2000;18:1423-31.
- Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol.* 1998;16:3121-8.
- Lipton A, Leitzel K, Ali SM, Demers L, Harvey HA, Chaudri-Ross HA, Evans D, Lang R, Hackl W, Hamer P, Carney W. Serum HER-2/neu conversion to positive at the time of disease progression in patients with breast carcinoma on hormone therapy. *Cancer.* 2005;104:257-63.
- Liu S, Edgerton SM, Moore DH 2nd, Thor AD. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1716-23.
- Langan Fahey SM, Jordan VC, Fritz NF, Robinson SP, Waters D, Tormey DC. In: Jordan VC, editor. Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. Madison: University of Wisconsin Press, 1994; p. 27-56.
- Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brünner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broët P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA. Pooled analysis of prognostic impact of tumor biological factors uPA and PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:116-28.
- Love RR, Mazess RB, Barden HS, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, Carbone PP, DeMets DL. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med.* 1992;326:852-6.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM, O'Malley BW. Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996;56:67-77.
- Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, Span PN, Sweep CG. Vascular endothelial growth factor is associated with the efficacy of endocrine therapy in patients with advanced breast carcinoma. *Cancer.* 2003;98:2125-32.
- Manders P, Tjan-Heijnen VC, Span PN, Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot AJ, van Tienoven DT, Beex LV, Sweep FC. The complex between urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-I) independently predicts response to first-line endocrine therapy in advanced breast cancer. *Thromb Haemost.* 2004;91:514-21.
- Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazziere R, Mignatti P, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270:9709-16.
- Mansell J, Monypenny IJ, Skene AJ, Abram P, Carpenter R, Gattuso JM, Wilson CR, Angerson WJ, Doughty JC. Patterns and predictors of early recurrence in postmenopausal women with estrogen receptor-positive early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;117:91-8.
- Martelli G, Miceli R, Costa A, Coradini D, Zurrida S, Piromalli D, Vetrella G, Greco M. Elderly breast cancer patients treated by conservative surgery alone plus adjuvant tamoxifen: fifteen-year results of a prospective study. *Cancer.* 2008;112:481-8.
- Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, Qin L, Tsimelzon A, Huang S, Weiss H, Rimawi M, Schiff R. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res.* 2008;68:826-33.

- Massarweh S, Schiff R. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13:15-24.
- Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*. 2003;3:281-92.
- Mauriac L, Keshaviah A, Debled M, Mauriac L, Keshaviah A, Debled M, Mouridsen H, Forbes JF, Thürlimann B, Paridaens R, Monnier A, Láng I, Wardley A, Nogaret JM, Gelber RD, Castiglione-Gertsch M, Price KN, Coates AS, Smith I, Viale G, Rabaglio M, Zabaznyi N, Goldhirsch A; BIG 1-98 Collaborative Group; International Breast Cancer Study Group. Predictors of early relapse in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer in the BIG 1-98 trial. *Ann Oncol*. 2007;18:859-67.
- Mazumdar S, Adam L, Boyd D, Kumar R. Heregulin regulation of urokinase plasminogen activator and its receptor: human breast epithelial cell invasion. *Cancer Res*. 2001;61:400-5.
- McDonald I. Proceedings of 3rd National Cancer Congress. Philadelphia: Lippincott. 1957. p. 87.
- McGuire WL. Prognostic factors in primary breast cancer. *Cancer Surveys*. 1986;5:527-36.
- McGuire WL. Steroid hormone receptors in breast cancer treatment strategy. *Rec Prog Hormone Res*. 1980;36:135-56.
- McGuire WL, Carbone PP, Sears ME, Escher GC. Estrogen receptors in human breast cancer: an overview. In: McGuire WL, Carbone PP, Vollner EP, editors. *Estrogen receptors in human breast cancer*. New York: Raven Press; 1975. p. 1-8.
- McGuire WL, Clarke GM, Dressler LG, Owens MA. Role of steroid hormone receptors as prognostic factor in primary breast cancer. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1986;1:19-23.
- McGuire WL, Pearson OH, Segaloff A. Predicting hormone responsiveness in human breast cancer. In: McGuire WL, Carbone PP, Vollmer ED, editors. *Estrogen receptors in human breast cancer*. New York: Raven; 1975. p. 17-30.
- McGuire WL, Vollmer EP, Carbone PP. (eds). In: McGuire WL, Vollmer EP, Carbone PP, editors. *Estrogen receptors in human breast cancers*. New York: Raven Press; 1975.
- McKenna N, Lanz R, O'Malley B. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*. 1999;20:321-44.
- Medappa N, Srivastava VK. Estrogen and breast cancer. *ICMR Bulletin*. 2003;33:2.
- Meijer-van Gelder ME, Peters HA, Look MP. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) system in advanced breast cancer: associations with response to tamoxifen therapy. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 2003;44:751.
- Meijer-van Gelder ME, Look MP, Peters HA, Schmitt M, Brünner N, Harbeck N, Klijn JG, Foekens JA. Urokinase-type plasminogen activator system in breast cancer: association with tamoxifen therapy in recurrent disease. *Cancer Res*. 2004;64:4563-8.
- Mercer RJ, Bryan RM, Bennett RC, Rennie GC, Lie TH, Morgan FJ. The prognostic value of oestrogen receptors in breast cancer. *Aust N Z J Surg*. 1984;54:7-10.
- Milanini J, Viñals F, Pouyssegur J, Pagès G. p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem*. 1998;273:18165-72.
- Miller, W.R. Oestrogens and breast cancer: Biological considerations. *Br Med Bull*. 1990;47: 470.

- Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol.* 1995;9:814–25.
- Morris C, Wakeling A. Fulvestrant (Faslodex)—a new treatment option for patients progressing on prior endocrine therapy. *Endocr Relat Cancer.* 2002;9:267–76.
- Morse-Gaudio M, Connolly JM, Rose DP. Protein kinase C and its isoforms in human breast cancer cells: relationship to the invasive phenotype. *Int J Oncol.* 1998;12:1349-54.
- Nakamura J, Lu Q, Aberdeen G, Albrecht E, Brodie A. The effect of estrogen on aromatase and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in the normal nonhuman primate mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1432–7.
- Nemere I, Pietras RJ, Blackmore PF. Membrane receptors for steroid hormones: Signal transduction and physiological significance. *J Cell Biochem.* 2003;88:438-45.
- Nemoto T, Natarajan N, Bedwani R et al. Breast cancer in the medial half; results of the 1978 national survey of the American College of Surgeons. *Cancer.* 1983;51:1333-8.
- Nerlov C, Rorth P, Blasi F, Johnsen M. Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene.* 1991;6:1583-93.
- Nerlov C, Rorth P, Blasi F, Johnsen M. Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene.* 1991;6:1583-93.
- Newby JC, Johnston SRD, Smith IE, Dowsett M. Expression of epidermal growth factor receptor and C-erb B2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1997;3:1643-51.
- Nevassari K, Heikkinein U, Taskinen PJ: Tamoxifen and thrombosis. *Lancet.* 1978; 946-7.
- Nicholson GL. Tumor cell instability, diversification and progression to the metastatic phenotype: from oncogen to oncophetal expression. *Cancer Res.* 1987;47:1473-87.
- Nicholson RI, McClelland RA, Robertson JF and Gee JM. Involvement of steroid hormone and growth factor cross-talk in endocrine response in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 1999;6:373–87.
- Nixon AJ, Neuberger D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, Abner A, Recht A, Vicini F, Harris JR. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol.* 1994;12:888-94.
- Norris JD, Fan D, Kerner SA. Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol.* 1997; 11:747–54.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194:23-8.
- Nykjaer A, Petersen CM, Moller B, Jensen PH, Moestrup SK, Holtet TL, Etzerodt M, Thøgersen HC, Munch M, Andreasen PA. Purified alpha2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes. *J Biol Chem.* 1992;267:14543–6.
- Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;51:227-38.
- Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Wong J, Allred DC, Clark GM, Schiff R. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:353–61.

- Osborne CK, Elledge RM, Fuqua SAW. Estrogen receptors in breast cancer therapy. *Sci Med*. 1996;3:32-41.
- Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. J Clin Oncol*. 2005;23:1616-22.
- Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res*. 2001;7:4338-42.
- Osborne CK, Shou J, Massarweh S, Schiff R. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:865-70.
- Oxford overview, Chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer:effect on recurrence and 15-year survival in an overview of the randomised trials by Early breast cancer trialists' collaborative group (EBCTCG) 2004.
- Pappas TC, Gametchu B, Watson CS. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J*. 1995;9:404-10.
- Parl FF, Dupont WD. A retrospective cohort study of Histologic risk factors in breast cancer patients. *Cancer*. 1982;50:2410-6.
- Parl FF, Schmidt BP, Dupont WD, Wagner RK. Prognostic significance of estrogen receptor status in breast cancer in relation to tumor stage, axillary node metastasis, and histopathologic grading. *Cancer*. 1984;54:2237-42.
- Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ*. 2001;322:1528-32.
- Peles E, Bacus SS, Koski RA, Lu HS, Wen D, Ogden SG, Levy RB, Yarden Y. Isolation of the Neu/HER2 stimulatory ligand: a 44kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell*. 1992;69:205-16.
- Peters GA, Khan SA. Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Mol Endocrinol*. 1999;13:286-96.
- Peto R, Boreham J, Clarke M, Davies C, Beral V. 2000 UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet*. 2000;355:1822.
- Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Nardulli AM. Fos and Jun inhibit estrogen-induced transcription of the human progesterone receptor gene through an activator protein-1 site. *Mol Endocrinol*. 2004;18:521-32.
- Picard D, Yamamoto KR. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J*. 1987;6:3333-40.
- Pierce L, Fowble B, Solin LJ, Schultz DJ, Rosser C, Goodman RL. Conservative surgery and radiation therapy in black women with early stage breast cancer. Patterns of failure and analysis of outcome. *Cancer*. 1992;69:2831-41.
- Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engström O, Ljunggren J, Gustafsson JA, Carlquist M. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J*. 1999;18:4608-18.
- Plowman GD, Green JM, Culouscou JM, Carlton GW, Rothwell VM, Buckley S. Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature*. 1993;366:473-5.



- Ponzzone R, Montemurro F, Maggiorotto F, Robba C, Gregori D, Jacomuzzi ME, Kubatzki F, Marengo D, Dominguez A, Biglia N, Sismondi P. Clinical outcome of adjuvant endocrine treatment according to PR and HER-2 status in early breast cancer. *Ann Oncol.* 2006;17:1631-6.
- Porter W, Saville B, Hoivik D, Safe S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol.* 1997;11:1569-80.
- Price JT, Bonovich MT, Kohn EC. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Bio.* 1997;32:175-253.
- Punglia RS, Kuntz KM, Winer EP, Weeks JC, Burstein HJ. Optimizing adjuvant endocrine therapy in postmenopausal women with early-stage breast cancer: a decision analysis. *J Clin Oncol.* 2005;23:5178-87.
- Razandi M, Pedram A, Greene GL, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: Studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol.* 1999;13:307-19.
- Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17:2941-53.
- Resnati M, Guttinger M, Valcamonica S, Sidenius N, Blasi F and Fazioli F. Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J.* 1996;15:1572-82.
- Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med.* 1995;46:443-53.
- Rifkin DB. Cross-talk among proteases and matrix in the control of growth factor action. *Fibrinolysis Proteolysis.* 1997;11:3-9.
- Roberti NE. The role of histologic grading in the prognosis of patients with carcinoma of the breast: is this a neglected opportunity? *Cancer.* 1997;80:1708-16.
- Roodi N, Bailey LR, Kao WY, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, Parl FF. Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:446-51.
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist.* 2003;8:307-25.
- Russell KS, Hung MC: Transcriptional repression of the neu protooncogene by estrogen stimulated estrogen receptor. *Cancer Res.* 1992;52:6624-9.
- Russo J, Frederick J, Ownby HE. Predictors of recurrence and survival of patients with breast cancer. *Oncol Club.* 1988;1:2-12.
- Rutqvist LE, Wallgren A. Influence of age on outcome in breast carcinoma. *Acta Radiol Oncol.* 1983;22:289-94.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM and Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002;288:321-33.
- Rydén L, Stendahl M, Jonsson H, Emdin S, Bengtsson NO, Landberg G. Tumor-specific VEGF-A and VEGFR2 in postmenopausal breast cancer patients with long-term follow-up. Implication of a link between VEGF pathway and tamoxifen response. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;89:135-43.

- Saez S, Cheix F, Asselain B. Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1983;3:345-53.
- Saez RA, McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol.* 1989;5:102-10.
- Sainsbury JRC, Anderson TJ, Morgan DAL, Dixon JM. ABC of Breast Diseases: Breast Cancer *BMJ.* 1994;309:1150-1153.
- Santen RJ. Determinants of tissue oestradiol levels in human breast cancer. *Cancer Surv.* 1986;5:597-616.
- Santen RJ, Leszczynski D, Tilson-Mallet N, et al. Enzymatic control of estrogen production in human breast cancer: relative significance of aromatase vs. sulfatase pathways. In: Angeli A, Bradlow HL, editors. *Endocrinology of the breast: basic and clinical aspects.* New York, NY: Academic; 1986;126.
- Saphner T, Tormey DC, Gray R. Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J Clin Oncol.* 1996;14:2738-46.
- Scarf RF, Torloni H. Histological typing of breast tumors. In: *International Histological Classification of Tumors, II*, World Health Organization, WHO, Geneva, 19, 1968.
- Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Arpino G, Rimawi M, Osborne CK. Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance: implicated role of growth factor signaling and estrogen receptor coregulators. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;1:10-20.
- Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res.* 2004;10:331-6.
- Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Höfler H, Jänicke F, Graeff H. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemostasis.* 1997;78:285-96.
- Schnipper L. Clinical implications of tumor-cell heterogeneity. *N Engl J Med.* 1986;314:1423-31.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS and Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983;219:983-5.
- Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1993;11:1936-42.
- Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R. Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:926-35.
- Shubik P. Progression and promotion. *J Natl Cancer Inst.* 1984;73:1005-11.
- Shyamala G, Yang X, Cardiff RD, Dale E. Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:3044-49.
- Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Role of co-activators and corepressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res.* 1997;52:141-64.
- Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R. Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-HER-2/neu cross-talk in ER/HER-2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:926-35.

- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3- OH kinase. *Nature*. 2000;407:538-41.
- Sizemore N, Larner N, Dombrowski N, Sakurai H, Stark GR. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of NF- $\kappa$ B p65/rela subunit. *Mol Cell Biol*. 1999;19:4798-805.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244:707-12.
- Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: a field in transit. *Nature reviews Cancer*. 2003;3:832-44.
- Smith CL. Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod*. 1998;58:627-32.
- Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Blohmer JU, Ashley SE, Francis S, Boeddinghaus I, Walsh G; IMPACT Trialists Group. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol*. 2005;23:5108-16.
- Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol*. 1997;11:657-66.
- Solin LJ, Fowble B, Schultz DJ, Goodman RL. Age as a prognostic factor for patients treated with definitive irradiation for early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989;16:373-81.
- Sommer S, Fuqua SAW. Estrogen receptor and breast cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2001;11:339-52.
- Sonoo H, Kurebayashi J, Iino Y, Inaji H, Watanabe T, Toi M, Kobayashi S, Sato B, Yoshimoto M. Current status and controversial issues concerning endocrine therapy for patients with recurrent breast cancer in Japan. *Breast Cancer*. 1999;6:344-50.
- Span PN, Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot J. EORTC Receptor and biomarker study report. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for vascular endothelial growth factor in blood and tumor tissue extracts. *Int J Biol Markers*. 2000;15:184-91.
- Stenkvist B. Histopathology and cytometry in prognosis. In: Stoll BA, editors. *Breast cancer treatment and prognosis*. London: Blackwell scientific Publications; 1986 p.132-139.
- Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA. P185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol*. 1986;6:1729-40.
- Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation*. 2006;74:365-81.
- Stewart JF, Rubens RD, Millis RR, King RJ, Hayward JL. Steroid receptors and prognosis in operable (stage I and II) breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1983;19:381-7.
- Stoica A, Saceda M, Doraiswamy VL, Coleman C, Martin MB. Regulation of estrogen receptor $\alpha$  gene expression by epidermal growth factor. *Journal of Endocrinology*. 2000;165:371-8.

- Stoica A, Saceda M, Fakhro A, Joyner M, Martin MB. Role of insulin-like growth factor-I in regulating estrogen receptor- $\alpha$  gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2000;76:605–14.
- Stoica A, Saceda M, Fakhro A, Solomon H, Fenster B, Martin M. The role of transforming growth factor $\beta$  in the regulation of estrogen receptor expression in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocrinology*. 1997;138:1498–505.
- Stoll BA. Pointers to prognosis. In: Stoll BA, editor. *Breast cancer treatment and prognosis*. London: Blackwell scientific Publications; 1986; p. 115-137.
- Stoner M, Saville B, Wormke M, Dean D, Burghardt R, Safe S. Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor  $\alpha$  in ZR-75 breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2002;16:2231–42.
- Sunderland MC, Osborne CK. Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: a review. *J Clin Oncol*. 1991;9:1283-97.
- Suzuki T, Moriya T, Ishida T, Kimura M, Ohuchi N and Sasano, H. In situ production of estrogens in human breast carcinoma. *Breast Cancer*. 2002;9:296.
- Tamm I, Schriever F, Dorken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol*. 2001;2:33-42.
- Tang H, Kerins DM, Hao Q, Inagami T and Vaughan DE. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998;273:18268–72.
- Terashima I, Suzuki N, Shibutani S. Mutagenic potential of a-(N2 deoxyguanosinyl) tamoxifen lesions, the major DNA adducts detected in endometrial tissues of patients treated with tamoxifen. *Cancer Res*. 1999;59:2091–95.
- Terman BI, Stoletov KV. VEGF and Tumor Angiogenesis. *Einstein Quart. J Biol and Med*. 2001;18:59-66.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA.. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991;266:11947-54.
- Tiwari RK, Borgen PI, Wong GY, Cordon-Cardo C, Osborne MP. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res*. 1992;12:419-25.
- Toi M, Matsumoto T and Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol*. 2001;2:667–73.
- Tomlinson IP, Nicolai H, Solomon E, Bodmer WF. The frequency and mechanism of loss of heterozygosity on chromosome 11q in breast cancer. *J Pathol*. 1996;180:38-43.
- Tovey S, Dunne B, Witton CJ, Forsyth A, Cooke TG, Bartlett JM. Can molecular markers predict when to implement treatment with aromatase inhibitors in invasive breast cancer? *Clin Cancer Res*. 2005;11:4835-42.
- Tsuchiya A, Abe R, Kanno M, Ohtake T, Fukushima T, Nomizu T, Kimijima I. Role of age as a prognostic factor in breast cancer. *Surg Today*. 1997;27:213-6.
- Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol*. 2001;19:2714-21.
- UICC: TNM Classification of malignant tumors. 4th Ed New York: Springer Verlag, 1987.

- Uehara T, Kaneko Y, Kanda N, Yamamoto T, Higashi Y, Nomoto C, Izumo T, Takayama S and Sakurai M. c-erbB-2 and c-erftA-1 (ear<sup>-</sup>) gene amplification and c-erbB-2 protein expression in Japanese breast cancers: their relationship to the histology and other disease parameters. *Jpn J Cancer Res.* 1990;81:620-24.
- Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol.* 1994;14:8356-64.
- Weterman MA, van Muijen GN, Bloemers HP, Ruitter DJ. Molecular markers of melanocytic tumor progression. *Lab Invest.* 1994;70:593-608.
- White R, Sjoberg M, Kalkhoven E, Parker MG. Ligand-independent activation of the oestrogen receptor by mutation of a conserved tyrosine. *EMBO J.* 1997;16:1427-35.
- Williams JK, Wagner JD, Li Z, Golden DL, Adams MR. Tamoxifen inhibits arterial accumulation of LDL degradation products and progression of coronary artery atherosclerosis in monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:403-8.
- Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Chlebowski RT, Ingle JN, Edge SB, Mamounas EP, Gralow J, Goldstein LJ, Pritchard KI, Braun S, Cobleigh MA, Langer AS, Perotti J, Powles TJ, Whelan TJ, Browman GP. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2002. *J Clin Oncol.* 2002;20:3317-27.
- Winqvist R, Hampton GM, Mannermaa A, Blanco G, Alavaikko M, Kiviniemi H, Taskinen PJ, Evans GA, Wright FA, Newsham I. Loss of heterozygosity for chromosome 11 in primary human breast tumors is associated with poor survival after metastasis. *Cancer Res.* 1995;55:2660-4.
- Witowski J, Abell A, Johnson NL, Johnson GL, Cuevas BD. MEKK1 is required for inducible urokinase-type plasminogen activator expression. *J Biol Chem.* 2003;278:5941-6.
- Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, Cairns J, Gullick WJ, Kelly P, Harris AL, Horne CH. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res.* 1989;49:2087-90.
- Xiaojiang Cui, Rachel Schiff, Grazia Arpino, C. Kent Osborne, Adrian V. Lee Biology of Progesterone Receptor Loss in Breast Cancer and Its Implications for Endocrine Therapy *Journal of Clinical Oncology.* 2005;23:7721-35.
- Xu FJ, Stack S, Boyer C, O' Briant K, Whitaker R, Mills GB, Yu YH and Bast RCJr. Heregulin and agonistic anti p185(c-erbB2) antibodies inhibit proliferation but increase invasiveness of breast cancer cells that overexpress p185(c-erbB2): increased invasiveness may contribute to poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 1997;3:1629-34.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A and Press MF. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989;244:707-12.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:127-37.
- Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res.* 1996;56:2013-6.
- Yuspa SH and Morgan DL. Mouse skin resistant to terminal differentiation associated with initiation of carcinogenesis. *Nature.* 1981;293:72-4.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

**Značaj biološke heterogenosti karcinoma dojke za odgovor na terapiju antiestrogenima**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, \_\_\_\_\_ 11.12.2013. \_\_\_\_\_

Ken Koki Zeki

Прилог 2.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Značaj biološke heterogenosti karcinoma dojke za odgovor na terapiju antiestrogenima

која је моје ауторско дело.

Сагласан сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис

Stevan Kocić Zaki

У Београду, \_\_\_\_ 11.12.2013. \_\_\_\_\_