

Univerzitet u Beogradu

Medicinski fakultet

**TERAPIJSKI ODGOVOR KARCINOMA
DOJKE NA CITOTOKSIČNE LEKOVE
ANALIZOM MARKERA APOPTOZE I
PROLIFERACIJE ĆELIJA**

Doktorska disertacija

Mr. sc. med. Dr Ksenija S. Kanjer

Beograd, 2013

University of Belgrade
School of Medicine

**Breast Cancer Response to Cytotoxic Drugs
by Analyzing Markers of Apoptosis and Cell
Proliferation**

Ph.D. thesis

Ksenija S. Kanjer, MD McS

Belgrade, 2013

Mentor

Prof. dr Svetislav Tatić, Univerzitet u Beogradu, Institut za patologiju Medicinskog fakulteta

Komentor

Dr sc. med Dragica Nikolić-Vukosavljević, NSav

Rukovodilac projekta Br. 175068 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja

Predsednik komisije

Prof.dr Marija Havelka-Đuković, Univerzitet u Beogradu, Institut za patologiju Medicinskog fakulteta

Članovi:

Doc. dr Tamara Kravić-Stevović, Univerzitet u Beogradu, Institut za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta

Dr sc. med. dr Zora Nešković-Konstantinović, NSav, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Medikalna onkologija

Ova doktorska teza urađena je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu. Želim da izrazim svoje poštovanje kolegama IORS-a na njihovom poštovanom radu u ovoj oblasti medicine kojim su doprineli izradi ovog rada. Na ovaj način se zahvaljujem sa željom za daljom saradnjom.

Posebno želim da se zahvalim:

Prof.dr Svetislavu Tatiću, svom mentoru

na saradnji, razumevanju i podršci tokom izrade doktorske teze

Dr sci med Dragici Nikolić – Vukosavljević, NSav svom komentoru

na svestranj podršci i korisnim savetima u ovoj oblasti istraživanja

Dr sci med dr Zori Nešković – Konstantinović, NSav

na vrednoj i značajnoj pomoći tokom izrade doktorske teze

Prof. dr Mariji Havelki – Đuković i Doc. dr Tamari Kravić – Stevović

na saradnji prilikom uobličavanja ovog rada

Dr sc fiz.hem. Milanu Markićeviću

na pomoći u toku tehničkog uobličavanja teze

Mr sc. Aleksandri Stefanović - Mirović, Prof. opšte književnosti sa teorijom i

savremenog srpskog jezika

na prijateljstvu, a u stručnom smislu na jezičkim ispravkama teksta

Aleksandri Popović, Silvani Rušiti i Ivani Radosavljević, laboratorijskim tehničarima

na izvrsnoj pomoći prilikom tehničke obrade materijala.

Ova doktorska teza je urađena u okviru Projekta Br. 175068 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Srbije, pod nazivom „*Molekularni biomarkeri karcinoma dojke i promena njihovog značaja u zavisnosti od perioda praćenja bolesti*“ čiji je rukovodilac NSav, Dragica Nikolić – Vukosavljević.

I na kraju, ne i najmanje, zahvaljujem se kolektivu Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju na saradnji i razumevanju tokom ovih godina zajedničkog rada.

Terapijski odgovor karcinoma dojke na citotoksične lekove analizom markera apoptoze i proliferacije ćelija

Rezime

Terapijski odgovor karcinoma dojke na delovanje citotoksičnih lekova se znatno razlikuje i samo će deo pacijentkinja odgovoriti na datu hemioterapiju usled pojave ili razvoja neosetljivosti tumora na primenjenu terapiju. Zbog toga je poželjno unapred znati verovatnoću odgovora tumora na terapiju koja se razmatra. Prediktivni marker se može definisati kao faktor koji ukazuje na osetljivost ili rezistenciju na određenu terapiju. Neoadjuvantni modalitet lečenja karcinoma dojke ili preoperativna (primarna) sistemska terapija predložena je kao optimalan *in vivo* model za istraživanje bioloških svojstava tumora koji mogu postati pouzdani markeri u proceni odgovora tumora na terapiju/ili značajni pokazatelji dugotrajnog toka bolesti. Osim toga, primena neoadjuvantne hemioterapije daje mogućnost provere kliničkog značaja obrasca izmene fenotipa ćelije koja je izazvana terapijom, pri čemu tumor ostaje *in situ* kao pouzdana *in vivo* mera terapijskog odgovora. Prediktivni markeri u okviru neoadjuvantnog modaliteta primene hemioterapije se procenjuju u odnosu na povezanost sa objektivnim odgovorom tumora, a na osnovu toga da je nastanak kompletne patološke regresije tumora dosledno povezan sa poboljšanim ishodom bolesti. To znači da se odgovor tumora procenjen na osnovu patoloških kriterijuma može smatrati pravim „surogat“ pokazateljem koji može pouzdano predvideti dejstvo terapije na krajnji klinički ishod.

Proces proliferisanja i apoptoza razmatraju se kao najznačajniji *in vivo* fenomeni koji su povezani sa dejstvom hemioterapije na nivou ćelija. Zahvaljujući saznanjima da mnogi antitumorski agensi sa raznovrsnim mehanizmom delovanja ostvaruju citotoksičnost, bar delimično, izazivanjem apoptoze nemogućnost da se izvrši apoptotski program smatra se značajnim faktorom za pojavu rezistencije na citotoksične lekove. Sa obzirom na to da je sklonost određene ćelije ka apoptozi određena balansom između stimulatornih i inhibitornih faktora koji su ispoljeni u takvoj ćeliji, izmenjena ekspresija ili mutacija ključnih gena čiji proteinski produkti doprinose poremećenoj apoptozi može biti značajna za razvoj primarne i stečene rezistencije na citotoksične lekove. Brojni citotoksični stimulusi i prenosni signalni molekuli koji pobuđuju proces apoptoze, sustiču se na nivou mitohondrija da bi izazvali promenu propustljivosti spoljašnje mitohondrijalne membrane i na taj način su povezani sa različitim ćelijskim

odgovorom. U malignim ćelijama većina antikancerskih agenasa izaziva apoptozu pokretanjem unutrašnjeg (mitohondrijalnog) puta aktivacije sa oslobađanjem apoptogenih faktora koji posreduju smrt ćelije. Unutrašnji apoptotski put je dominantno regulisan proteinima Bcl-2 familije koji moduliraju propustljivost membrane mitohondrija suprostativljenim dejstvom pro- i anti-apoptotskih članova ove familije čiji relativni odnos, u osnovi, kontroliše sklonost ili rezistenciju ćelije na apoptotski stimulus. U skladu sa svojom anti-apoptotskom funkcijom, bcl-2 protein sprečava oslobađanje ključnih apoptogenih molekula iz mitohondrija i na taj način održava ćelije živim. Stoga, nivo ekspresije bcl-2 može, na neki način doprineti pojavi rezistencije na citotoksične agense. Tumor supresorni p53 protein kao odgovor ćelije na oštećenje DNK ili druge stresne stimulse često aktivira “unutrašnji” apoptotski put koji se može posmatrati kao mehanizam zavisen od p53 proteina. U vezi sa tim da je p53 ključni molekul u indukciji apoptoze, a to je poželjan cilj različitih terapijskih modaliteta, smatra se da izmena funkcije TP53 gena modelira osetljivost tumora i može doprineti rezistenciji na citotoksične lekove. Ispoljavanje Ki-67 proteina tokom aktivnih faza ćelijskog ciklusa i odsustvo u ćelijama koje miruju čini da Ki-67 jeste operativni marker za određivanje frakcije rasta date ćelijske populacije. Sa obzirom na to da je process apoptoze glavni protivtežni činilac tumorskom rastu, indeks baziran na količniku proliferativnog (Ki-67) i apoptotskog (AI) indeksa (indeks rasta, IR) predložen je da bi se približno odredio doprinos koji ovi procesi mogu imati u rastu tumora. Indeks rasta dozvoljava procenu učestalosti pojave proliferacije u odnosu na apoptozu. Imajući u vidu da su izmenjena apoptoza i proliferisanje u osnovi uključeni u hemio – osetljivost, apoptotski fenomen i Ki-67 kao pokazatelj proliferativnosti, sa indeksom rasta razmatraju se od primarnog značaja, zajedno sa bcl-2 i p53 proteinom kao bazičnim markerima apoptoze.

Cilj ove studije bio je da se proceni povezanost proliferacije i apoptoze *in vivo*, kao i ekspresije p53 i bcl-2 u karcinomu dojke, pre primene hemioterapije i u rezidualnoj malignoj ćelijskoj populaciji koja preostaje nakon završetka lečenja. Glavni ciljevi ovog istraživanja bili su: 1) da se odredi da li postoji povezanost biomarkera koji se ispituju i da li se takva povezanost održava posle hemioterapije, 2) da se ustanovi koji od parametara daje preciznu procenu regresije karcinoma dojke, na osnovu patoloških

kriterijuma, na delovanje hemioterapije zasnovane na antraciklinskom agensu. Dodatno je procenjen obrazac izmene biomarkera nakon terapije.

Evaluirani su arhivirani tkivni uzorci, dobijeni incizionom biopsijom i iz resekovanog hiruškog materijala, 106 pacijentkinja sa lokalno uznapredovalim karcinomom dojke na neoadjuvantnom modalitetu antraciklinske hemioterapije. U ovoj grupi pacijentkinja, terapijski odgovor je bio 95 %, u osam (8 %) pacijentkinja je postignuta kompletna patološka regresija tumora (pKR) koja je definisana kao mikroskopski nalaz odsustva invazivnih malignih ćelija u tkivu dojke i aksilarnim limfnim čvorovima. U pet (5 %) pacijentkinja je potvrđena progresija/stabilna bolest (PB/SB). Ekspresija Ki-67 antigena, p53 i bcl-2 gena je procenjena imunohistohemijskom metodom. AI kao pokazatelj apoptoze u tumorskim uzorcima procenjen je na osnovu TUNEL analize. Indeks rasta tumora koji sumira suprostavljene efekte apoptoze i proliferacije ćelija dobijen je kao količnik Ki-67 indeksa i AI.

U neteretiranim uzorcima tumora, porast vrednosti p53 bio je povezan sa povišenim vrednostima Ki-67 indeksa ($p = 0.0001$) i AI ($p = 0.009$) koji su takođe uzajamno povezani ($p = 0.041$), dok je povišena ekspresija bcl-2 bila povezana sa nižim vrednostima AI ($p = 0.0001$). Povezanost između ekspresije bcl-2 i vrednosti p53, a i sa vrednostima Ki-67 nije nađena pre terapije. Kombinovane ekspresije bcl-2 i p53 gena koje mogu biti razmatrane kao „aberantne“ kombinacije, ukazujući na poremećenu regulaciju apoptoze, predominiraju u različitim kategorijama terapijskog odgovora. U netretiranim tumorima, „aberantne“ kombinacije ekspresije p53/bcl-2 gena su bile povezane sa smanjenom ekspresijom bcl-2 ($p < 0.001$) i sa višim vrednostima AI ($p = 0.009$) u poređenju sa „fiziološkom“ kombinacijom. Više vrednosti Ki-67 indeksa bile su povezane sa višim vrednostima AI ($p = 0.016$) i p53 ($p = 0.0001$), a sa nižim vrednostima bcl-2 ($p = 0.012$) u rezidualnim malignim ćelijama nakon izloženosti citotoksičnim lekovima. Povezanost apoptoze i proliferacije bila je još izrazitija, a i održava se i posle terapije ($p = 0.016$).

Viši osnovni (pre-terapijski) nivoi Ki-67 indeksa i indeksa rasta bili su povezani sa boljim terapijskim odgovorom ($p = 0.0001$ i $p = 0.008$), iako stepen korelacije terapijskog odgovora karcinoma dojke sa indeksom rasta, ipak, nije izrazitiji od povezanosti koja je dobijena ispitivanjem samo vrednosti Ki-67. Ki-67 indeks koji je niži od 1 % izrazito ukazuje na odsustvo terapijskog odgovora. Prediktivna vrednost Ki-

67 indeksa i indeksa rasta utvrđena je u situaciji snižene ekspresije (negativnog statusa) bcl-2 proteina pre terapije. Najniže preterapijske vrednosti Ki-67 indeksa (Med 0.70, IK range 0.46 – 4.13), nađene u pacijentkinja sa PB/SB nagoveštavaju da se ovi karcinomi dojke mogu tumačiti kao ekstremno rezistentni, za razliku od izrazito osetljivih tumora u pacijentkinja sa pKR u kojima su detektovane najviše vrednosti Ki-67 (Med 34.77, IK range, 18.24 – 4.13). Visoke vrednosti AI u tumorima sa suprotnom hemio-osetljivošću, pKR vs. PB/SB ($p = 0.72$) sugerišu da terapijski odgovor karcinoma dojke nije pod uticajem „prisustva“ i „odsustva“ apoptoze. Grafička distribucija vrednosti Ki-67 i indeksa rasta u tumorima dijametralno različite hemio-osetljivosti, pKR vs. PB/SB su sličnog izgleda, a to ukazuje da Ki-67 indeks ima izraženiji uticaj na vrednosti indeksa rasta. Izrazito niske vrednosti indeksa rasta u situaciji PB/SB (Med 0.37; IK opseg 0.28 – 1.75) u odnosu na visoke vrednosti u tumorima sa pKR (Med 14.84; IK opseg 8.25–28.84), $p = 0.002$, sugerišu da izrazito redak događaj proliferisanja ćelija u odnosu na apoptozu doprinosi pojavi rezistencije na citotoksične lekove. Prediktivna vrednost niske proliferativnosti je zbog toga još ubedljivija od pozitivne prediktivne vrednosti visoke proliferativnosti.

Rezidualne maligne ćelije mogu se smatrati kao relativno rezistentna populacija ćelija na citotoksično dejstvo hemioterapije koja omogućava procenu eventualnih izmena ćelijskog fenotipa pod uticajem terapije. Utvrđeno je značajno sniženje vrednosti Ki-67 ($p < 0.001$), AI ($p = 0.035$) i GI ($p = 0.008$) posle hemioterapije, pri čemu se p53 i bcl-2 imunodetekcija pojavljuje kao stabilan fenotip. Međutim, analiza relativno/procentualne promene vrednosti biomarkera u pojedinačnom slučaju, otkriva da u znatnom broju nastaje očigledan porast rezidualnih vrednosti, iako je dobijeno sniženje datog biomarkera u celini razmatrano. Više početne vrednosti Ki-67 su povezane sa znatnim sniženjem indeksa rasta posle terapije ($p = 0.015$), pri čemu je izrazitija apoptotska aktivnost (AI) pre terapije povezana sa porastom vrednosti indeksa rasta posle terapije ($p = 0.0001$). Takvo odstupanje pojedinog parametra koje je pokrenuto delovanjem hemioterapije može imati različiti uticaj na ishod bolesti.

Ključne reči: Karcinom dojke, Osetljivost na citotoksične lekove, Ki-67, AI, p53, bcl-2

Naučna oblast: Onkologija

Uža naučna oblast: Karcinom dojke (UDK broj 616 – 006.6)

Breast cancer response to cytotoxic drugs by analysing markers of apoptosis and proliferation

Summary

Breast cancers vary widely in their response to cytotoxic drugs and only a proportion of patients will respond to a particular chemotherapy, due to the emergence and development of tumor insensitivity to applied therapy. It is therefore desirable to know, in an advance, the likelihood of a tumor responding to the therapy under consideration. Predictive marker can be defined as a factor that indicates sensitivity or resistance to a specific treatment. Neoadjuvant clinical setting or preoperative (primary) systemic therapy of breast cancer has been proposed as an ideal *in vivo* model for studying the tumor biological features that might become reliable markers for the assessment of tumor response to therapy and/or valuable indices for long-term disease outcome. In addition, the use of neoadjuvant chemotherapy offers the opportunity to test clinical relevance of the pattern of modifications in the cell phenotype induced by therapy with the tumor remaining *in situ* throughout treatment as an *in vivo* measure of response. Predictive markers in the setting of neoadjuvant chemotherapy have been assessed in terms of correlation with objective tumor response, on the basis that the induction of pathological complete remission in particular, has been consistently found to be associated with improved disease outcome. This implies that pathological tumor response can be considered as a true surrogate indicator that can reliably predict the effect of a treatment on the final clinical outcome.

The proliferation kinetics and apoptosis pathway are considered as the most relevant phenomena that are associated with cellular effects induced *in vivo* by chemotherapy. Owing to the knowledge that many anticancer agents with differing modes of action achieve cytotoxic effects, at least partly, by inducing apoptosis the impossibility of performing an apoptotic program is considered as an important factor in the appearance of resistance to cytotoxic drugs. Considering that the susceptibility to apoptosis of a given cell is determined by the balance between stimulatory and inhibitory factors manifested in a particular cell, altered expression or mutation of key genes whose protein products contribute to disturbed apoptosis may be relevant in development of intrinsic and acquired resistance to cytotoxic drugs. Numerous cytotoxic stimuli and proapoptotic signal transducing molecules converge on

mitochondria to induce outer mitochondrial membrane permeabilization and thus are related to different cellular response. The majority of anticancer therapies induce apoptosis in cancer cells by triggering the intrinsic (mitochondrial) pathway with releasing of apoptogenic factors that mediate cell killing. The intrinsic apoptotic pathway is dominated by the Bcl-2 family proteins, which governs mitochondrial membrane permeabilisation by the opposing actions of pro- and apoptotic bcl-2 family members, the relative proportions of which ultimately control the sensitivity or resistance of cells to apoptotic stimuli. In line with its anti-apoptotic function, bcl-2 protein inhibit the release of key apoptogenic molecules from mitochondria, thus keeping cells alive. Therefore, the degree of bcl-2 expression may somehow contribute to the onset of resistance to cytotoxic agents. The intrinsic apoptotic pathway is often activated by tumor suppressor p53 in response to DNA damage or other cell stressors and can be viewed as a p53-dependent apoptotic pathway. Concerning that p53 is a key player in apoptosis induction, which is desirable goal of different treatment modalities, alteration of TP53 gene function is thought to modulate tumor responsiveness and may contribute to the resistance to cytotoxic drugs. Ki-67 protein expression throughout the cell cycle and its absence in quiescent cells seems to be an operational marker to determine the growth fraction of a given cell population. Given that apoptosis provides the major counterbalancing determinant of tumor growth, an index based on the Ki-67 – apoptosis ratio (growth index, GI) has been proposed to approximate the contribution that these two factors may make in tumor growth. Growth index allowing the measurement of frequency of an occurrence of proliferation relative to apoptosis. Considering that changes in apoptosis and proliferation are ultimately involved in the chemoresponsiveness, the apoptosis phenomena (AI) and Ki-67 as an indicator of proliferation, together with GI are considered of principal importance, in common with bcl-2 and p53 as prototype apoptotic markers.

The aim of this study was to assess the *in vivo* relationship of apoptosis to proliferation, as well as p53 and bcl-2 expression in breast cancers both prior to chemotherapy and in the residual malignant cell population remaining following the completion of treatment. The major aims of this study were: 1) To determine whether there is an association between biomarkers under investigation in breast cancers, and if this is maintained following chemotherapy, and 2) To determine which of the

parameters provides the accurate prediction of the pathological remission of breast cancer to anthracycline-based chemotherapy. In addition, the pattern of biomarkers' modifications following chemotherapy has been assessed.

Archival material of diagnostic biopsies and surgical specimens from 106 locally advanced breast cancer patients receiving neoadjuvant anthracycline based-chemotherapy were examined. Response rate to chemotherapy in this group was 95 %, eight patients (8 %) achieved a pathological complete remission (pCR), that was defined as the absence of histological evidence of invasive cancer cells in breast and axillary lymph nodes. Five (5 %) patients had clinically confirmed a progressive/stable disease (PD/SD). The expression of Ki-67 antigen, p53 and bcl-2 gene were evaluated using immunocytochemistry. AI as an indicator of apoptotic phenomena in tumor tissue was assessed by *in situ* DNA nick labeling (TUNEL) assay. Growth index (GI) which summarises the opposing effects of apoptosis and proliferation was calculated as the ratio of Ki-67 index and AI.

In untreated tumor samples, the increase of p53 values was associated with higher values of Ki-67 index ($p = 0.0001$) and AI ($p = 0.009$) whose were also associated mutually ($p = 0.041$), while the increased expression of bcl-2 was associated with lower AI value ($p = 0.0001$). However, the association between bcl-2 expression and p53 values as with the values of Ki-67 was not found prior to therapy. Combined bcl-2 and p53 gene expression whose might be considered as the „aberant“ combinations suggesting dysregulated control of apoptosis, were prevalent in different response categories. In untreated tumors, „aberant“ combinations of bcl-2 and p53 expression were associated with lower bcl-2 expression ($p < 0.001$) and higher values of AI ($p = 0.009$) compared to the „physiologic“ combination. Higher values of Ki-67 index were associated with higher values of AI ($p = 0.016$) and p53 protein ($p = 0.0001$) and with lower values of bcl-2 ($p = 0.012$) in residual malignant cell population after exposure to cytotoxic drugs. The balance between apoptosis and proliferation was even more pronounced and maintained after chemotherapy ($p = 0.016$).

Higher baseline level of Ki-67 index and GI were associated with an improved pathological response ($p = 0.0001$ and $p = 0.008$), but the degree of correlation with GI was no greater than that with Ki-67 alone. Ki-67 below 1 % highly indicated a lack of tumor response. Predictive relevance of Ki-67 index and GI was found in a situation of

a decreased bcl-2 expression (negative status) at a baseline. The lowest baseline values of Ki-67 (Med 0.70, IQ range 0.46 – 4.13) found in patients with PD/SD imply that their tumors could be construed as extremely chemo – resistant breast cancers as opposed to highly chemo-sensitive tumors with partial pathological response (pCR) in whom the highest values of Ki-67 (Med 34.77, IQ range, 18.24 – 4.13) were detected. High AI which characterised the opposite chemo-sensitive tumors, pCR vs. PD/SD ($p = 0.72$) implied that treatment response was not influenced by the „presence“ or „absence“ of apoptosis. The graphical distribution of GI and Ki-67 values that correspond to tumors with opposed chemoresponsiveness i.e. pCR vs. PD/SD, are of a similar appearance, suggesting that the Ki-67 values have a more marked influence on values of GI. A very low values of GI in a situation of a PD/SD (Med 0.37; IK opseg 0.28 – 1.75) compared to higher values for tumors with pCR , (Med14.84; IK opseg 8.25-28.84), $p = 0.002$, suggest that rather rare occurrence of malignant cell proliferation relative to apoptosis contributes to the occurrence of breast cancer resistance to cytotoxic drugs. The negative predictive value of low proliferation was thus even more convincing, than the positive predictive value of high proliferation.

Residual malignant cells can be considered as a relatively resistant population of cells to the cytotoxic effects of chemotherapy, allowing the assessment of possible variations of cell phenotype elicited by therapy. A significant decrease in Ki-67 ($p < 0.001$), AI ($p = 0.035$) and GI ($p = 0.008$) was found following chemotherapy, while p53 and bcl-2 immunostaining appeared as a stable phenotype. However, relative/percentage change analysis in biomarkers of individual patient revealed an apparent increase in residual values in a number of cases, although an overall statistically significant reduction of a given biomarker after chemotherapy was obtained. Higher Ki-67 values at a baseline was associated with profound reduction of GI after therapy ($p = 0.015$), while higher apoptotic activity (AI) in tumors before treatment was associated with raising value of tumor GI after treatment ($p = 0.0001$). Such a variance of a given parameter elicited by chemotherapy may have various impact on disease outcome.

Key words: Breast cancer, Chemoresponsiveness, Ki-67, AI, p53 and bcl-2 protein

Research area: Oncology

Research focus: Breast cancer (UDK 616 – 006.6)

Sadržaj

I UVOD	1
I.1. Odgovor tumora na delovanje citotoksičnih lekova	1
I.1.1. Opšti obrazac (princip) osetljivosti ili rezistencije na citotoksične lekove	1
I.1.2. Dominantni koncept izučavanja <i>in vivo</i> procesa povezanih sa osetljivošću / rezistencijom na citotoksične lekove	2
I.2. Neoadjuvantni hemioterapijski pristup kao <i>in vivo</i> model za izučavanje osetljivosti/rezistencije na citotoksične lekove	3
I.2.1. Prednosti neoadjuvantnog modela u istraživanju delovanja citotoksičnih lekova	4
I.3. Apoptoza - programirana smrt ćelije	6
I.3.1. Apoptoza i delotvornost citotoksičnih lekova	8
I.4. Modulatori apoptoze	10
I.4.1. Bcl-2 familija proteina	10
I.4.1.1. Bcl-2 protein, anti-apoptotski protein	11
I.4.2. P53 tumor - supresorni protein	12
I.4.2.1. Struktura TP53 gena	12
I.4.2.2. Funkcionalna shema aktivnosti p53 proteina	13
I.4.2.3. Zastoj ćelijskog ciklusa posredovan p53 proteinom	14
I.4.2.4. Apoptoza posredovana p53 proteinom	15
I.4.2.5. Mutacije TP53 gena	17
I.4.2.6. Polimorfizam kodona 72 unutar TP53 gena	18
I.4.2.7. Uloga p53 u osetljivosti / rezistenciji na dejstvo citotoksičnih lekova	19
I.5. Proliferativna aktivnost ćelija – ekspresija Ki-67 antigena	20
I.5.1. Indeks rasta tumora	21
I.6. Biomarkeri kao pokazatelji terapijskog odgovora karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova u okviru neoadjuvantnog modela: pregled literature o značaju apoptoze, Ki-67 indeksa, bcl-2 i p53 proteina	22
II CILJ RADA	25
II.1. Radna hipoteza	25

III MATERIJAL I METODE	26
III.1 Pacijentkinje	26
III.2. Primarna (neoadjuvantna) hemioterapija	29
III.3. Procena terapijskog odgovora karcinoma dojke na delovanje hemioterapije	29
III.4. Detekcija ekspresije bcl-2 i p53 proteina i Ki-67 antigena na morfološkom nivou – imunohistohemijska metoda (IHC)	31
III.4.1. Princip imunohistohemijske metode	31
III.4.2. Postupak indirektno streptavidin-peroksidazne imunohistohemijske tehnike.	32
III.5. Detekcija programirane ćelijske smrti (apoptoze) na nivou pojedinačnih ćelija u okviru morfološkog konteksta (<i>in situ</i>) – TUNEL metoda.	34
III.5.1. Princip metode	34
III.5.2. Proceduralni postupak	35
III.6. Procena ekspresije bcl-2 i p53 proteina, Ki-67 antigena i apoptoznih ćelija u malignim ćelijama karcinoma dojke (<i>eng. scoring</i>).	36
III.7. Statističke metode	37
IV REZULTATI	39
IV.1. Kvantitativna analiza – analiza vrednosti biomarkera u grupi pacijentkinja u celini	39
IV.2. Povezanost biomarkera (Spearman-ov test rang korelacije)	41
IV.3. Povezanost biomarkera sa terapijskim odgovorom karcinoma dojke na delovanje hemioterapije (<i>Spearman-ov test rang korelacije</i>)	49
IV.4. Analiza varijabilnosti (heterogenosti) vrednosti biomarkera između (pod)grupa pacijentkinja sa različitim odgovorom karcinoma dojke na hemioterapiju (<i>Mann – Whitney’s U Test, test sume rangova</i>)	52
IV.5. Analiza promene vrednosti biomarkera na delovanje hemioterapije	55
IV.5.I. Analiza varijabilnosti (promene) vrednosti biomarkera pod uticajem hemioterapije (<i>Wilcoxon-ov signed rank test/test ekvivalentnih parova</i>)	55

IV.5.II. Analiza varijabilnosti biomarkera pod uticajem hemioterapije, označena kao procentualna ili relativna promena vrednosti	58
IV.6. Kvalitativna analiza - analiza biomarkera u okviru statusa : pozitivan (+)/negativan (-)	65
IV.7. Analiza biomarkera u okviru kombinovane ekspresije p53 i bcl-2 gena – dihotomnog fenotipa p53/bcl-2 proteina	71
IV.8. Sažetak rezultata	83
<i>V DISKUSIJA</i>	94
V.1. Patološka regresija tumora - terapijski odgovor karcinoma dojke na delovanje citotoksičnih lekova	94
V.2. Povezanost biomarkera - Ki-67 indeksa, AI, indeksa rasta, a i p53 i bcl-2 proteina pre primene hemioterapije, kao i njihov značaj za terapijski odgovor karcinoma dojke (prediktivna vrednost)	99
V.2.1. Značaj „dihotomnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina.	118
V.3. Promena fenotipa malignih ćelija, okarakterisana profilom biomarkera proliferisanja i apoptoze (Ki-67, AI i indeks rasta, a i p53 i bcl-2 proteina) pod uticajem hemioterapije	120
V.3.1. Povezanost biomarkera u okviru rezidualne populacije malignih ćelija (pPR)	132
V.4. Pokazatelji osetljivosti/rezistencije na citotoksične lekove novije generacije	133
<i>VI ZAKLJUČAK</i>	140
<i>VII LITERATURA</i>	145

I UVOD

I.1. Odgovor tumora na delovanje citotoksičnih lekova

I.1.1. Opšti obrazac (princip) osetljivosti ili rezistencije na citotoksične lekove

Primena citotoksičnih lekova kao sistemske terapije čini osnovu delotvornog lečenja malignih bolesti uključujući solidne tumore kao što je karcinom dojke. Međutim, odgovor tumora na citotoksične lekove je različit i terapijski neuspeh je učestao usled pojave neosetljivosti - rezistencije tumora na primenjenu terapiju. Pojava ili razvoj rezistencije tumora na citotoksične lekove jeste osnovna prepreka za uspešan terapijski ishod jer dovodi do progresije tumora/bolesti i smrtnog ishoda.

Rezistencija tumora se može ispoljiti na inicijalnu hemioterapiju usled „urođene“ ili konstitutivne neosetljivosti tumora označene kao *de novo* (eng. *intrinsic*) rezistencija. Češće je da uprkos činjenici da tumor kao karcinom dojke ispolji osetljivost na inicijalnu terapiju, maligne ćelije tokom vremena stiču svojstva za preživljavanje i rezistenciju na naknadno primenjenu terapiju. Nastanak fenotipski mnogo agresivnijih varijanti malignih ćelija sa sklonošću ka metastaziranju tokom procesa progresije tumora, sa pojavom neosetljivosti na dejstvo naknadnih citotoksičnih lekova, označava stečenu ili prilagođenu (eng. *acquired*) rezistenciju (Morrow CS et. Cowan KH. 2000). Klinički ispoljenu neosetljivost tumora na hemioterapiju, a koja može nastati na više različitih nivoa, uključuju kompleksni procesi: a) promene na nivou ciljnog mesta dejstva citotoksičnih agenasa u smislu modifikacija intraćelijskih struktura kao kvantitativne i/ili kvalitativne (mutacije) izmene, ili izmenjenost procesa interakcije leka sa ciljnim molekulima; b) promene, ushodno od ovih interakcija na nivou metabolizma leka ili mehanizama transporta leka u ćeliju (ispoljavanje zaštitnih ili detoksikacionih mehanizama na nivou pojedinačnih malignih ćelija). Rezistencija malignih ćelija na citotoksične lekove može nastati usled izmenjenosti nishodnih procesa, od interakcije agenasa i kritičnog ciljnog mesta u datoj ćeliji, u smislu promene modela kojim ćelija odgovori odnosno odreaguje na nastale specifične lezije pod uticajem citotoksičnih agenasa (lezije DNK). Pojava međusobne povezanosti, ali i istovremenog prisustva različitih mehanizama rezistencije u okviru populacije malignih ćelija istog tumora,

može doprineti razvoju različitog stepena rezistencije tumora. Pretpostavlja se da isti mehanizmi mogu biti odgovorni i za *de novo* i za stečenu rezistenciju tumora, ali je verovatno da razvoj rezistencije predstavlja spontani fenomen u malignoj ćeliji tokom procesa ubrzanog i agresivnog tumorskog rasta usled genomske nestabilnosti (Johnstone *et al.* 2002).

I.1.2. Dominantni koncept izučavanja *in vivo* procesa povezanih sa osetljivošću / rezistencijom na citotoksične lekove

Nedostatak održavanja balansa u broju ćelija čini osnovu neoplazije. Apoptoza je protivteža proliferisanju i na taj način defektna apoptoza i do određenog stepena neodgovarajuća proliferativna aktivnost ćelija čine osnovu procesa tumorogeneze (Johnstone *et al.* 2002, Evan GI *et* Vousden KH. 2001, Lundberg *et al.* 1999). Ravnoteža između smrti ćelija, bar delimično, putem apoptoze i proliferativne aktivnosti ćelija, čini ključni fenomen dinamike rasta tumora. U načelu, izmena u odnosu između apoptoze i proliferisanja označena kao „faktor ćelijskog gubitka“, može imati presudan uticaj na rast i regresiju tumora (Lowe SW. *et* Lin AW. 2000). Klasičan pristup delovanja citotoksičnih lekova zasniva se na interakciji leka i „ciljnog mesta“ na nivou ćelije, a i povezanost ovog procesa sa različitim fazama ćelijskog ciklusa (Calabresi P. *et* Chabner BA. 2001). Sa tim u vezi je zapažanje da mnogi citotoksični lekovi ispoljavaju izrazitije dejstvo na aktivno proliferišuće ćelije (Shackney *et al.* 1978). Eksperimentalna istraživanja pokazuju da mnogi antitumorski agensi sa raznovrsnim mehanizmom dejstva, bar delimično, ostvaruju citotoksičnost izazivanjem apoptotskog procesa (Zhivotovsky B. *et* Orenius S. 2003; Pomier *et al.* 2004). Zbog toga, delotvornost citotoksičnih lekova ne mora samo odražavati sklonost da uzrokuju oštećenje ćelije, već i sposobnost ćelije da detektuje to oštećenje i srazmerno odreaguje. Klasični pristup dejstva citotoksičnog leka se zasniva na interakciji leka i ciljne strukture u odgovarajućoj fazi ćelijskog ciklusa. Apoptoza je fenomen koji čini vezu između sklonosti delovanja citotoksičnog leka u određenoj fazi ćelijskog ciklusa i programirane smrti ćelije koji je pokrenut na kritičnim tačkama kontrole ćelijskog ciklusa, a usled nastalog DNK oštećenja (Uvod I.4.2.5.). U situaciji intaktnih kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, smrt ćelije koja je podstaknuta delovanjem citotoksičnih

lekova se može shvatiti kao odgovor kontrole ćelijskog ciklusa na kontrolnim tačkama; smrt ćelije je posledica regulatornih mehanizama ćelijskog ciklusa na nastalo DNK oštećenje (Schmitt CA. *et* Lowe SW. 1999). Iz tog razloga izmenjenost komponenti procesa apoptoze i/ili proliferacije koje doprinose disbalansu ovih fenomena presudno određuje sveukupni rast ili regresiju tumora u odgovoru na citotoksičnu terapiju (Tamm *et al.* 2001).

Intrigantni model savremenog koncepta izučavanja fenomena osetljivosti/rezistencije na citotoksične lekove razmatra molekularne mehanizme procesa koji dovode do apoptotske i proliferativne aktivnosti malignih ćelija, kao biološki, najznačajnije *in vivo* fenomene povezane sa dejstvom hemioterapije (Schmitt CA. *et* Lowe SW. 1999; Zhivotovsky B. *et* Orenius S. 2003; Pomier *et al.* 2004). Analiza biomarkera koji povezuju biohemijske puteve fenomena koji su relevantni za odgovor tumora na citotoksične lekove, apoptozu i proliferativnost, doprinosi poznavanju molekularnih efekata terapije u *in vivo* uslovima. Utvrđivanje relevantnih biomarkera dodatno omogućava definisanje "surogat" bioloških pokazatelja terapijskog odgovora (predikcija), a koji istovremeno mogu biti i korisni pokazatelji daljeg toka bolesti (prognoza).

I.2. Neoadjuvantni hemioterapijski pristup kao *in vivo* model za izučavanje osetljivosti/rezistencije na citotoksične lekove

Nakon izloženosti ćelija citotoksičnom leku u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, pojedinačna ćelija umire ili preživljava (sa ili bez prolaznog zastoja u rastu). To dovodi do zaključka da su fenomeni osetljivosti i rezistencije uzajamno isključiva stanja. Međutim, heterogenost populacija malignih ćelija *in vivo* utiče da primena citotoksičnog agensa može dovesti do različitog smanjenja, neizmenjenosti ili kontinuiranog rasta tumora, a u zavisnosti od odnosa osetljivih i rezistentnih ćelija u okviru heterogene populacije malignih ćelija (Lønning PE. 2003). Istraživanja koja potvrđuju heterogenost karcinoma dojke na molekularnom nivou (Sorlie *et al.* 2001) ukazuju na bitnu različitost *in vivo* situacije, klinički ispoljenog odgovora karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova.

Neoadjuvantni modalitet lečenja karcinoma dojke predložen je kao *in vivo* model za procenu terapijskog odgovora tumora (Forrest *et al.* 1986). Ovaj klinički modalitet primene sistemske terapije označen je kao optimalni *in vivo* model za istraživanje bioloških svojstava tumora pod uticajem terapije, sa obzirom na to da tumor ostaje *in situ* za sve vreme primene terapije kao pouzdana *in vivo* mera terapijskog odgovora. Neoadjuvantna terapija označava primenu citotoksičnih lekova pre lokoregionalnog hiruškog lečenja. Preoperativna primena citotoksičnih lekova, označena i kao primarna / indukciona terapija karcinoma dojke, inicijalno je osmišljena i primenjena u cilju smanjenja tumorske mase pacijentkinja kojima primarna hiruška terapija nije preporučljiva (lokalno uznapredovala bolest), da bi se omogućilo hiruško lečenje i uz poštedu tkiva dojke u što većoj meri. Sa aspekta bazičnog istraživanja se ovaj terapijski model razmatra kao jedinstven klinički pristup evaluacije bioloških svojstava tumora ili fenotipa malignih ćelija koje su okarakterisane profilom biomarkera na delovanje primenjene terapije. Utvrđivanje biomarkera *in vivo* koji mogu imati vrednost u proceni odgovora tumora na primenjenu terapiju (prediktivni značaj) i/ili biti pokazatelji daljeg toka bolesti (prognostički značaj) jeste jedinstvena prednost neoadjuvantnih kliničkih studija (Lønning PE. 2003).

I.2.1. Prednosti neoadjuvantnog modela u istraživanju delovanja citotoksičnih lekova

Koje su prednosti ovog modela izučavanja terapijskog odgovora karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova? Prvo, odgovor tumora na citotoksičnu terapiju može biti objektivno procenjen na osnovu dobro definisanih kriterijuma kliničke (Therasse *et al.* 2000), a posebno patološke regresije tumora posle hiruškog lečenja (Kurosimi M. 2006, Penault-Llorka *et al.* 2008). Potrebno je ukazati na to da je ključni dugoročni cilj preoperativne terapije postizanje objektivnog odgovora tumora kao kratkotrajnog „surogat“ pokazatelja dugotrajnog ishoda bolesti (Jones RL. *et* Smith IE. 2006). Pokazano je da su u okviru neoadjuvantnog modaliteta lečenja pacijentkinje sa kompletnom regresijom tumora imale povoljniji tok bolesti, bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa parcijalnom regresijom tumora, a posebno u odnosu na pacijentkinje sa stabilnom ili progresivnom bolešću (Kuerer *et al.* 1999). Sa teorijskog stanovišta, preoperativna hemioterapija može eliminisati udaljene, klinički

nedetektabilne (mikro)metasaze i time sprečiti razvoj rezistentnih klonova malignih ćelija (Schabel Jr FM. 1975, Goldie JH. *et* Coldman AJ. 1979). Uspostavljena je hipoteza da je odgovor primarnog tumora u dojci analogan terapijskom odgovoru udaljenih mikrometastaza i da u tom smislu može biti upotrebljen kao „surogat pokazatelj“ kliničkog ishoda daljeg toka bolesti. U cilju objašnjenja pojma „surogat pokazatelj“, dalje u tekstu naveden je okvirni postupak za procenu njegove moguće upotrebljivosti; specifični, „intermedijarni“ završni događaj (*eng. end-point*), npr. objektivni tumorski odgovor u ovom slučaju (ili biomarker-i) može biti razmatran kao surogat pokazatelj drugog događaja od kliničkog značaja (verovatnoća pojave metastaza ili smrtnog ishoda) u situaciji kada uticaj terapije na „surogat“ pouzdano predviđa uticaj terapije na izabrani, klinički događaj od značaja (Prentice RL. 1989, Bruzzi *et al.* 2005). Kompletna patološka regresija karcinoma dojke pod uticajem hemioterapije se pojavljuje kao jasan pokazatelj povoljnijeg kliničkog toka bolesti (Kaufmann *et al.* 2005, Shannon C. *et* Smith I. 2003) i može biti iskorišćena kao intermedijarni, „surogat“ pokazatelj efikasnosti hemioterapije. Molekularni biomarker ili više njih koji pouzdano predviđaju kompletnu patološku regresiju tumora na dejstvo citotoksičnog leka mogu biti razmatrani kao validni „surogat“ pokazatelji kliničkog toka i ishoda bolesti. Ograničavajuća okolnost iskoristljivosti kompletne patološke regresije tumora pod uticajem hemioterapije i kao „surogat-a“ u praksi, jeste njegova retka pojava sa učestalošću od 3 - 26 %, kako je navedeno u većini objavljenih studija.

Posebna prednost neoadjuvantnog modela istraživanja jeste mogućnost procene terapijskog odgovora makroskopskog tumora na nivou ćelija. Radi se o izboru molekularnih biomarkera koji karakterišu biološka svojstva tumora u svrhu evaluacije značaja njihove ekspresije u odnosu na terapijski odgovor tumora ili stepen objektivne regresije tumora pod uticajem terapije. Sa obzirom na dostupnost tumorskih uzoraka pre i posle terapije, poređenje bioloških karakteristika tumora ili ispitivanje eventualnih izmena fenotipa malignih ćelija pod uticajem hemioterapije je moguće (Lønning PE. 2003). Šta je prednost analize biomarkera u odnosu na terapijski odgovor tumora - objektivno procenjeni stepen regresije tumora pod uticajem hemioterapije? Tumorski odgovor na dejstvo citotoksičnih lekova koji je procenjen na osnovu kliničko/patoloških kriterijuma je neprecizan i relativno kasni pokazatelj kliničkog ishoda bolesti. Osnovni potencijal neoadjuvantne terapije je u ispitivanju vrednosti bioloških markera kojima se

može unapred, na početku bolesti, predvideti dugotrajni klinički ishod. Osnovna prednost je utvrđivanje kratkoročnih (*eng. short-term*) biomarkera tumorskog odgovora na preoperativnu hemioterapiju koji mogu biti „surogat“ pokazatelji dugotrajnog kliničkog ishoda (*eng. long-term outcomes*) (Shannon C. *et* Smith I. 2003). To mogu biti biomarkeri koji ukazuju na osetljivost ili rezistenciju tumora na citotoksični agens(e) i/ili su pokazatelji sveukupnog terapijskog odgovora, relevantnih za dalji klinički tok bolesti.

Po definiciji biomarkeri koji su povezani sa relativnom osetljivošću i/ili rezistencijom na specifični antitumorski agens imaju prediktivnu vrednost, a prognostički markeri ukazuju na potencijal rasta primarnog tumora kao i sklonost prema metastaziranju. Isti biomarker, u različitom opsegu, može ispoljiti i prediktivnu i prognostičku vrednost. (Hayes *et al.* 1998). Važno je istaći da utvrđivanje biomarkera kao pokazatelja odgovora tumora na citotoksične lekove, sa analizom izmene njihovog statusa *in vivo* pod uticajem terapije, daje mogućnost biološkog uvida u oba mehanizma - rast tumora i osetljivost / rezistenciju na dati hemioterapijski pristup (Fisher B. *et* Mamounas E. 1995).

I.3. Apoptoza - programirana smrt ćelije

Genetski, aktivno regulisani proces smrti pojedinačne ćelije je kao morfološki fenomen nazvan apoptoza. Apoptozna telašca, prisutna u normalnim tkivima ili u kancerima, raspoznaju se na osnovu dobro definisanih obeležja (Kerr *et al.* 1994). Morfološki jasno raspoznatljive karakteristike uključuju: a.) zaokruživanje ćelija (okruglih i glatkih ivica, odvojene od obližnjih ćelija), smanjenje ćelijskog volumena - *pynosis* (skupljanje citoplazme, ćelije su manje, eozinofilnije citoplazme); b.) kondenzacija hromatina (hiperbazofilne boje, iregularnog oblika); c.) fragmentacija jedra – *karyorhexis* (jedan ili više hromatinskih delova, okruglog oblika, različite veličine); c.) odsustvo ili neznatne ultrastrukturne promene citoplazmatskih organela; d.) bubrenje ćelijske-plazma membrane i održanje celovitosti, intaktnosti plazma membrane do kasnih stadijuma procesa, kao i polje neinfiltrovano zapaljenskim ćelijama (Kroemer G *et al.* 2005). Apoptozna telašca su prisutna pojedinačno ili u grupicama, između invazivnih malignih ćelija, karakteristično odvojena jasnim svetlim

prostorom (*eng. halo*). Tokom ovog procesa, celovitost membrane ćelije se održava i ne dolazi do oslobađanja ćelijskog sadržaja ili do uticaja na ponašanje susednih ćelija. Osnovno svojstvo apoptoze je da apoptotske ćelije, nastali krajnji fragmenti ćelije - apoptozna telašca, bivaju brzo odstranjeni (fagocitovani) ćelijama retikulo-fagocitnog sistema i ne pokreću zapaljenski odgovor. Proces apoptoze je praćen biohemijskim promenama koje shematski u okviru apoptotskog puta uključuju: molekule kao senzor koji detektuje signal za smrt ćelije, mrežu signalnog prenosa i izvršni mehanizam koji aktivno dovodi do procesa smrti ćelije.

Intracelularne promene koje uključuju fragmentaciju DNK i destrukciju jedra su na biohemijskom nivou posredovane kaskadnim procesom aktivacije cistein proteaza ili endonukleaza – kaspaza (Nicholson DW. 1999.). Kaspaze su podeljene u inicijatorne kaspaze koje se aktiviraju vezivanjem za tkz. adaptorne molekule, a nakon čega aktiviraju grupu efektnih kaspaza. Dva izdvojena signalna puta aktivacije kaspaza i na osnovu toga i mehanizma apoptoze koji se sastaju na nivou efektnih kaspaza, shematski su opisani kao „spoljašnji“, receptorima posredovani put i „unutrašnji“ ili mitohondrijalni put (Pomier *et al.* 2004, Fulda S. *et* Debatin KM. 2006). Između navedenih aktivacionih puteva procesa apoptoze je prisutna značajna komunikacija. Mehanizam aktivacije receptorima posredovanog puta apoptoze uključuje inicijatorne kaspaze -8 i -10, a mitohondrijalnog puta inicijatorne kaspaze -9 (i -2). Oba apoptotska puta dele zajedničke efektorne kaspaze (-3, -6 i -7) koje izvide apoptotski program. Regulatorne molekule, kao što su c-FLIP (*eng. cellular FLIP inhibitory proteins*) koji inhibira inicijatorne kaspaze i IAPs (*eng. inhibitor of apoptosis proteins*) koji utiče i na inicijatorne i na efektorne kaspaze (-3, -7, -9) su samo neki od molekula kompleksne regulatorne mreže koja utiče na dinamičku ravnotežu između stimulatornih (pro-apoptotskih) i inhibitornih (anti-apoptotskih) faktora u određenoj ćeliji, a koja konačno određuje prag osetljivosti ćelije za nastanak apoptoze.

Vezivanje odgovarajućeg liganda koji pripadaju familiji TNF (*eng. tumor necrosis factor*)– FasL (*eng. Fas Ligand*) i TRAIL (*eng. TNF related apoptosis-inducing ligand*) za tkz. receptore smrti (*eng. death receptors*) koji pripadaju familiji TNFR (*eng. tumor necrosis factor receptor*), kao što je CD95 (Apo-1/Fas), TNF receptori 1, 3, 4 (DR4), 5 (DR5) na nivou membrane ćelija, dovodi do aktivacije adaptornog molekula FADD (*eng. Fas-associated death domain*) / ili TRADD (*eng.*

Trail associated death domain). To dalje utiče na aktivaciju kaspaze -8 i sledstvenu aktivaciju efektnih kaspaza u okviru „spoljašnjeg“, receptorima posredovanog mehanizma apoptoze. Prisustvo receptora ovog aktivacionog puta apoptoze pokazuje tkivnu specifičnost (Fulda *et al.* 2001).

Istraživanja ukazuju da mitohondrijalni put aktivacije kaspaza, kao intraćelijski put aktivacije apoptoze, predstavlja predominantni mehanizam apoptoze pokrenute delovanjem citotoksičnih lekova, posebno u odgovoru na oštećenja DNK (Simstein *et al.* 2003, Pomier *et al.* 2004, Fulda *et al.* 2006; Johnstone *et al.* 2002). „Unutrašnji“ put je povezan sa promenom permeabiliteta membrane mitohondrija. Propustljivost spoljašnjeg sloja mitohondrijalne membrane je povezana sa preraspodelom pro-apoptotskih molekula koji iz intermembranskog prostora mitohondrija prelaze u citosol ćelije, sa sledstvenim pokretanjem apoptotskog mehanizma (Ravagnan *et al.* 2002). Pro-apoptotski molekuli uključuju citohrom c, Smac/Diablo (*eng. second mitochondrial derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis protein IAP-binding protein with low PI*), serin-proteazu HtrA2, AIF (*apoptosis inducing factor*) i endonukleazu G. AIF i endonukleaza G direktno izazivaju modifikaciju jedra. Citohrom c u prisustvu adaptornog molekula Apaf-1 (*eng. Apoptotic protease activating factor*) i ATP, unutar nastalog kompleksa apoptozoma aktivira kaspazu -9 i time pokreće aktivaciju efektnih kaspaza. Oslobađanje mitohondrijalnih proteina Smac/DIABLO i HtrA2 sprečava inhibitorski efekat IAPs na kaspaze (-3, -7, -9) i time pospešuju apoptozu (Pomier *et al.* 2004).

I.3.1. Apoptoza i delotvornost citotoksičnih lekova

Apoptoza je očigledan opšti obrazac smrti za tumorske ćelije podvrgnute klinički delotvornim dozama citotoksičnih lekova, odnosno klinički relevantan mehanizam tumorskog odgovora na dejstvo citotoksičnih lekova (Zunino *et al.* 1997). Osnovna pretpostavka je da biohemijske promene koje maligne ćelije čine više ili manje sklonim apoptozi, iako proistekla uglavnom iz *in vitro* istraživanja, mogu biti kritična odrednica osetljivosti/rezistencije ćelija na dejstvo citotoksičnih agenasa. Promene koje snižavaju mogućnost aktivacije apoptoznog mehanizma mogu biti od značaja u pojavi

rezistencije tumorskih ćelija na citotoksične lekove različitog mehanizma dejstva (Kaufmann SH. *et Earnshaw* WC. 2000).

Tokom početnih faza razvoja tumora, paradoksalno, nastaje aktivacija procesa apoptotske smrti ćelija, u najvećoj meri zbog ćelijskih mehanizama koji povezuju prekomernu proliferaciju ćelija sa apoptozom (Schmitt CA *et Lowe* SW. 1999). Aktivacija procesa apoptoze (npr. aktivacijom onkogeni) može funkcionisati kao mehanizam sigurnosti ćelija koji ograničava razvoj tumora. Obrnuto, jedno od osnovnih obeležja maligniteta jeste sposobnost ćelija da izbegnu apoptozu (Hanahan D. *et Weinberg* RA. 2000). Značajno je da iste genetske promene koje utiču na apoptotsku sposobnost ćelija tokom razvoja tumora, takođe mogu menjati osetljivost/rezistenciju tumora na citotoksične lekove (Johnstone *et al.* 2002). Izmenjena ekspresija ili mutacija gena odnosno ključnih proteina mehanizma apoptoze, može obezbediti malignim ćelijama ne samo konstitutivnu prednost za opstanak, već i konstitutivnu rezistenciju na citotoksične lekove. Takav koncept apoptoze predstavlja bitnu kariku međusobne povezanosti procesa progresije tumora i faktora koji utiču na terapijski odgovor tumora. Ova povezanost može objasniti fenomen *de novo* konstitutivne rezistencije u uznapredovalom stadijumu solidnih tumora; selekcija protiv apoptoze tokom maligne progresije može istovremeno dovesti do rezistencije na citotoksične lekove (Schmitt CA. *et Lowe* SW. 1999, Fulda *et al.* 2006, Johnstone *et al.* 2002). Otuda proizilazi biološka osnova uticaja genotipa malignih ćelija na terapijski ishod. S tim u vezi je i opšte prihvaćeno saznanje da citotoksičnim lekovima indukovana apoptozna smrt ćelija ne predstavlja samo sposobnost date ćelije da pokrene apoptotski odgovor, već je smrt ćelije uslovljena i ćelijskim kontekstom. Ovaj pojam obuhvata kompleksno uzajamno dejstvo ćelije i leka, odnosno tip tkiva, obim i tip nastalog oštećenja (DNK lezije) i njegovu lokalizaciju unutar genoma, a i genetski „*background*“, prisustvo potencijalno reverzibilnih mehanizama na nivou DNK u smislu sposobnosti same ćelije da prepozna i ispravi nastalu leziju DNK (Zunino *et al.* 1997, Schmitt CA. *et Lowe* SW. 1999, Pomier *et al.* 2004). Intenzitet i obim nastalog oštećenja DNK ne zavisi samo od interakcije citotoksičnog leka i ciljnih struktura, već i od doze i sheme primene citotoksičnog agensa. Tako i nastanak apoptoze može biti dozno zavisno: niske doze mogu rezultirati u minornim, reparabilnim oštećenjima koji mogu usporiti progresiju

ćelijskog ciklusa, a više doze dovode do izrazitih DNK oštećenja koji iniciraju apoptozu ili čak nekrozu ćelije (Schmitt CA. *et* Lowe SW. 1999).

I.4. Modulatori apoptoze

I.4.1. Bcl-2 familija proteina

„Unutrašnji“ put aktivacije apoptoze je dominantno regulisan proteinima Bcl-2 familije koji moduliraju propustljivost mitohondrijalne membrane i time regulišu oslobađanje pro-apoptotskih faktora iz intermembranskog prostora u citoplazmu (Adams JM. *et* Cory S. 1998, Tsujimoto Y. 2003). Svojstvo međusobne fizičke interakcije ovih proteina, preko stvaranja mreže homo- i hetero-dimera određuje njihov relativni odnos koji dalje presudno određuje sklonost ili rezistenciju ćelije na apoptotski stimulus, efekat regulisanog oslobađanja pro-apoptotskih faktora iz mitohondrija.

Članovi humane Bcl-2 familije uključuju više od 20 proteina koji se karakterišu prisustvom jednog od četiri bcl-2 homolognog domena (BH) sa glavnim BH3 domenom koji je neophodan za svojstvo heterodimerizacije između različitih proteina i minimalni je strukturalni domen potreban za pro-apoptotsku funkciju. Shodno tome, Bcl-2 familija uključuje anti-apoptotske proteine koji poseduju sličnost u okviru tri domena (bcl-2, bcl-x₁, bcl-w, BAG-1, Mcl-1, Bfl-1, Boo), i koji su prvenstveno lokalizovani na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani gde sprečavaju oslobađanje pro-apoptotskih molekula. Pro-apoptotska klasa Bcl-2 familije je podeljena u dve grupe: multi(više)domenska grupa (Bax, Bak, Mtd-Bok i bcl-2-Rambo), i proteini sa samo BH3 domenom (*eng.* „BH3-only“)(Bid, Noxa, Puma, Bad, Bik, Hrk, Blk...) koji dele sličnost u homologiji BH3 domena. Pro-apoptotski proteini su lokalizovani izvan mitohondrijalnog prostora i dejstvuju kao detektori ćelijskog oštećenja i pokreću time proces smrti ćelije. Bax i Bak, u funkcionalnom smislu, deluju kao proteini koji povezuju različite apoptotske signale. Ključni molekuli koji pokreću njihovu aktivaciju su Bcl-2 proteini sa samo BH3 domenom. Sugerisano je da Bcl-2 proteini sa samo BH3 domenom, mogu biti podeljeni u aktivatore Bax/Bak proteina i u inhibitorne molekule (Bad) koji inaktiviraju anti-apoptotske proteine (prvenstveno bcl-2 i bcl-x₁). Dakle, Bcl-2 proteini sa samo BH3 domenom indukuju propustljivost mitohondrijalne membrane

ili inhibicijom anti-apoptotske grupe proteina ili aktivacijom pro-apoptotskih proteina Bax/Bak klase (Tsujimoto Y. 2003, Coultas L. *et* Strasser A. 2003). Aberantna ekspresija gena Bcl-2 familije je uglavnom regulisana na transkripcionom i post-transkripcionom nivou (Fulda S. *et* Debatin KM. 2006).

1.4.1.1. Bcl-2 protein, anti-apoptotski protein

Bcl-2 protein je prototip anti-apoptotskog proteina i prvi otkriveni protein Bcl-2 familije. Bcl-2 protein se vezuje stvaranjem heterodimera i sa multi-domenskom grupom i sa Bcl-2 proteinima sa samo BH3 domenom koji ispoljavaju pro-apoptotsku funkciju. Sa obzirom na konstitutivnu lokalizaciju na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, bcl-2 (zajedno sa bcl-X₁) poseduje kritično protektivno dejstvo i to, procesom stabilizacije spoljašnje membrane u smislu inhibicije oslobađanja apoptogenih faktora. Pretpostavlja se da reaguje sa „aktiviranim formama“ pro-apoptotskih proteina. Interakcijom sa Bax inhibira njegovu translokaciju u mitohondrije i time, direktno ili indirektno bcl-2 sprečava dejstvo Bax na membranske kanale mitohondrija (*eng. permeability transition pores*) (Antonsson B. *et* Martinou J-C. 2000). Čini se da je osnovna uloga bcl-2 proteina da vezivanjem za aktivirane Bcl-2 proteine sa samo BH3 domenom zaustavlja njihovo pro-apoptosko dejstvo. Nezavisno od heterodimerizacije i reakcije sa proteinima Bcl-2 familije, pokazana je njegoa direktna uloga u procesu inhibicije propustljivosti mitohondrijalne membrane koja je posredovana jonom Ca⁺, regulatorna stabilizacija integriteta membrane mitohondrija (Tsujimoto Y. 2003, Coultas L. *et* Strasser A. 2003).

In vitro nalazi prikazuju da ekspresija bcl-2 proteina doprinosi rezistenciji na različite stresne stimulse, uključujući citotoksične lekove i zračenje (Reed JC. 1999). Činjenica da se nalaz povišene ekspresije bcl-2 detektuje i u 80 % karcinoma dojke, a to je paradoksalno povezano sa povoljnijim kliničkim tokom bolesti, ukazuje na kompleksnost značaja ekspresije bcl-2 u solidnim tumorima, kao što je karcinom dojke. *In vitro* istraživanja na ćelijskim kulturama karcinoma dojke iznose oprečne zaključke o značaju povišene ekspresije bcl-2 za efikasnost citotoksičnih lekova; bcl-2 može doprineti rezistenciji malignih ćelija na dejstvo citotoksičnih lekova, (Yang *et al.* 2000, Davis JM. *et al.* 2003) ili suprotno, povećanoj osetljivosti (Bufalo *et al.* 2002).

Dodatno, estrogen potpomaže rezistenciju malignih ćelija karcinoma dojke na citotoksične lekove, a koje su osetljive na delovanje estrogena, saglasno funkcionalnom dejstvu estrogena u smislu stimulacije ekspresije bcl-2 gena (Teixeira *et al.* 1995, Huang *et al.* 1997). Značajna su *in vitro* istraživanja koja ukazuju na povišenu ekspresiju bcl-2 u G1 fazi ćelijskog ciklusa, sa posledičnim odlaganjem prelaska ćelija iz G1 u S fazu (Gao G. *et Dou* P. 2000). To može doprineti chemo-rezistenciji ako ćelije čine predominantnu G1 populaciju. Pored toga, pokazano je da bcl-2 produžava trajanje ćelijskog ciklusa i snižava frakciju ćelija u S-fazi (Knowlton *et al.* 1998) i odlaže ulazak ćelija u aktivne faze ćelijskog ciklusa potpomaganjem trajanja G₀ - faze mirovanja ćelija (Vairo *et al.* 2000).

I.4.2. P53 tumor - supresorni protein

I.4.2.1. Struktura TP53 gena

Protein p53 je jedarni fosfo-protein koji je kodiran genom TP53, a koji sadrži 11 egzona i nalazi se na hromozomu 17 (na poziciji 17p13) (Bai L. *et Zhu* W-g. 2006, Lacroix *et al.* 2006). Wt p53 protein ima 393 aminokiseline i sastoji se od tri regiona i više domena koji imaju specifične funkcije: * *Amino terminalni region* (aminokiseline 1-101, u okviru egzona 2 - 4) čiji deo je transaktivacioni domen (aminokiseline 1 - 42) koji uspostavlja interakcije sa komponentama transkripcione mašinerije i region bogat prolinom (aminokiseline 61-94) koji stupa u interakcije sa elementima puteva signalne transdukcije i ima važnu ulogu u apoptozi posredovanoj p53 proteinom; * *Centralni region* (kodiran egzonima 5 - 8) odgovara DNK-vezujućem domenu (am. 102-292) koji se vezuje za specifične sekvence DNK; * *Karboksi terminalni region* (aminokiseline 293-393, kodiran egzonima 9-11) uključen u regulaciju aktivnosti p53, preko oligomerizacionog domena putem kojeg p53 formira funkcionalne tetramere i negativnog regulatornog domena koji intereaguje sa centralnim regionom p53 i time održava tetramer u neaktivnoj konformaciji. Protein p53 pokazuje visok stepen homologije sa članovima p53 genske familije, kao što su p63 i p73 (Kaelin WG Jr. 1999).

1.4.2.2. Funkcionalna shema aktivnosti p53 proteina

P53 protein ispoljava svoju multifunkcionalnu aktivnost prevashodno kao regulator transkripcije, u smislu aktivacije ili represije ciljnih efekturnih gena i preko interakcije sa drugim proteinima (Prives C. *et al.* Hall PA. 1999, Vogelstein *et al.* 2000, Bai L. *et al.* Zhu W-g. 2006). Funkcionalni krug dejstva ovog molekula uključuje ushodne medijatore koji prepoznaju i prenose stresne signale p53 proteinu, komponente centralnog regulatornog jezgra i nishodne efekturne molekule koji pokreću program ćelijskog odgovora (Shenggan J. *et al.* Levine AJ. 2001). Centralni regulatorni deo čini osnovu održavanja i regulacije nivoa i aktivnosti p53 proteina u ćeliji. Neki aspekti ovog centralnog jezgra su defektni u svim malignitetima, od kojih su učestale strukturne promene na nivou samog TP53 gena.

Kvalitativne i kvantitativne izmene aktivnosti p53 proteina zavise od integriteta TP53 gena i od kvantiteta i specifičnih post-translacionih modifikacija p53 proteina koje su pokrenute različitim signalnim putevima, a uslovljene su vrstom stresa. Osim biohemijskih modifikacija na post-translacionom nivou, brojni različiti proteini od kojih neki pokazuju tkivnu specifičnost, mogu intereagovati sa p53 i modelirati njegovu aktivnost (Soussi T. *et al.* Wiman KG. 2007). Mdm-2 protein predstavlja glavni regulator nivoa p53 u smislu represije, inhibicije aktivnosti p53 proteina na dva načina; vezivanjem za određene regione p53 proteina omogućava njegovu razgradnju, a direktno blokira i transkripcionu aktivnost ovog molekula (Oren *et al.* 2002, Ringshausen *et al.* 2006). Sa druge strane, p53 protein aktivira transkripciju MDM2 gena što čini autoregulatornu petlju koja u situaciji delovanja stresogenih stimulusa biva narušena; ili nastaje blokiranje aktivnosti Mdm-2 proteina i/ili post-translaciona modifikacija p53 proteina. Svi ovi regulatorni mehanizmi omogućavaju integraciju različitih stresogenih signala.

Kao tumor-supresorni protein, p53 deluje u odgovoru ćelije na različite stresogene faktore koji se mogu označiti kao genotoksični (DNK oštećenja usled jonizujućeg zračenja, citotoksičnih lekova, kancerogena), ili negenotoksični (hipoksija, aktivacija onkogeni, uklanjanje ribonukleotida, mikrotubularna oštećenja). Funkcionalno dejstvo p53 proteina je usmereno u smeru posredovanja procesa koji

sprečavaju neadekvatnu proliferaciju ćelija i održanja integriteta genoma (Vousden KH. *et* Lu X. 2002, Royads JA *et* Iacopetta B. 2006). U normalnim ćelijama koje nisu izložene stresu, aktivnost p53 je izrazito niska. Pod uticajem stresnih signala dolazi do njegove aktivacije putem post-translacione modifikacije i stabilizacije sa produženjem poluživota p53 proteina; nivo p53 je povišen sa sledstvenom akumulacijom u jedrima ćelija izloženih stresu (Bai L. *et* Zhu W-g. 2006).

Funkcionalna kompleksnost p53 proteina ogleda se u dramatičnim promenama sudbine ćelije usled njegove aktivacije koje čine opseg od reverzibilnog zastoja ćelijskog ciklusa, trajnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa („*eng. senescence*“), autofagije, do smrti ćelije u formi apoptoze. Aktivirani p53 može pomagati proces ispravke oštećenja DNK, a i inhibirati angiogenezu (Prievs C. *et* Hall PA. 1999, Vogelstein *et al* 2000). Ovi procesi se mogu sumirati kao antiproliferativno dejstvo saglasno funkciji p53 da sprečava proliferaciju ćelija sa oštećenom DNK ili potencijalom za daljom transformacijom, a to čini osnovu tumor-supresornog efekta. Sa obzirom na to da ćelije sa mutacijom TP53 gena često ispoljavaju inaktivaciju i gubitak funkcije p53 proteina, pretpostavljena proliferativna nadmoć ovih ćelija, a posebno defekti u apoptotskom programu mogu doprineti rezistenciji tumora na dejstvo citotoksičnih lekova (Weller M. 1998, Ferreira *et al.* 1999).

1.4.2.3. Zastoj ćelijskog ciklusa posredovan p53 proteinom

Ćelije na oštećenje DNK reaguju zastojem ćelijskog ciklusa u cilju popravke oštećenja, ili podležu različitim tipovima ćelijske smrti; pre svega apoptoze, ali i ireverzibilnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa (*eng. "senescence"*, Shay JW *et* Roninson IB. 2004), mitotske katastrofe (Castedo *et al.* 2004), autofagije (Gozuacik D. *et* Kimchi A. 2004) i nekroze. Ukoliko oštećenja DNK nisu ispravljena, u situaciji kada ih ćelija toleriše, imaju za posledicu nakupljanje genomskih promena i osnova su maligne transformacije odnosno genomske nestabilnosti malignih ćelija. Dakle, kontrolne tačke ćelijskog ciklusa daju priliku ćeliji za oporavak i čine obrazac održanja integriteta genoma. Pravilno funkcionisanje kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa sprečava progresiju ćelije u narednu fazu ćelijskog ciklusa dok se ne izvrši popravak DNK oštećenja, a putem različitih reparacionih mehanizama.

Kompleksi specifičnih ciklin - zavisnih proteinskih kinaza (*eng. cyclin-dependent protein kinase – CDK*) i ciklina omogućavaju odvijanje ćelijskog ciklusa u smeru korektnog prelaza iz jedne u drugu fazu, putem fosforilacije odgovarajućih proteina. Koncept ćelijskog ciklusa se odigrava kroz definisan proces u kojem su prepoznate različite faze (Tannock *et al.* 2000): usled odgovarajućeg stimulusa iz mirujuće faze (Go), ćelije ulaze u G1 fazu („*eng. G- gap phase*“). U G1 fazi se ćelija priprema za narednu sintetičku (S) fazu u kojoj se odigrava sinteza DNK i udvostručenje genoma. Sledi G2 faza u kojoj se ćelija priprema za razdvajanje hromatida u toku naredne mitotičke (M) faze. U okviru ćelijskog ciklusa postoje tri osnovne kontrolne tačke: na kraju G1 faze pre ulaska u S fazu, u G2 fazi pre ulaska u mitozu i u metafazi mitoze (M).

Različiti stresogeni faktori aktiviraju različite proteinske kinaze koje kao ushodni medijatori funkcionalnog kruga p53, prepoznaju i prenose stresne signale p53 molekulu (Bullock AN *et Fersht* AR. 2001). Citotoksični lekovi i ultravioletno zračenje aktiviraju ATR (*eng. ataxia telangiectasiae related*) kinazu koja zatim, aktivira kazein kinazu II, a koja dalje fosforiliše aminoterminalni kraj p53 proteina i onemogućava njegovo vezivanje za inhibitorni mdm-2 protein. Sa druge strane, aberantni signali rasta (onkogeno ekspresija *RAS* i *MYC*) indukuju p14^{ARF} protein koji se vezuje za mdm-2 i inhibiraju njegovu aktivnost. Sledstveno nastaje povećanje nivoa p53 proteina i aktivacija transkripcije ciljnih gena.

P53 protein je uključen u G1 zastoj posredstvom p21^{waf1-cip1} koji inhibira ciklin D-CDK4/6 i ciklin E-CDK2 komplekse, i PCNA (*eng. proliferating cell nuclear antigen*). Na nivou G2 faze ćelijskog ciklusa p53 dovodi do zastoja posredstvom GADD45 (*eng. growth arrest and DNA-damage inducible protein 45*) koji intereaguje sa PCNA, p21, ciklin B-CDK2, a i sa 14-3-3δ genom čiji proteinski produkti reaguju sa ciklin B-CDK1 kompleksom (Vogelstein *et al.* 2000, Bai L. *et Zhu* W-g. 2006).

1.4.2.4. Apoptoza posredovana p53 proteinom

Protein p53 posreduje apoptozu prevashodno preko mitohondrijalnog puta, kao ključni inicijator i regulator apoptotskog mehanizma pokrenutog oštećenjem DNK (Schuler M. *et Green* DR. 2001, Johnstone *et al.* 2002, Haupt *et al.* 2003, Fulda S. *et*

Debatin KM. 2006). U tom kontekstu se p53 može razmatrati kao funkcionalni antagonist bcl-2 molekula (Chiarugi V. *et* Ruggiero M. 1995). Ključni geni Bcl-2 familije proteina su ciljna mesta transkripcione aktivnosti p53 proteina, pro-apoptotskih Bax i Bcl-2 proteina sa samo BH3 domenom (Noxa, Puma, Bid, Bik). Ekspresija Bax gena predstavlja ne samo direktni cilj aktivnosti p53, već i indirektni regulatorni put; preko indukcije ekspresije Puma – gena, sa nastankom PUMA proteina koji aktivira mitohondrijalnu relokaciju i multimerizaciju Bax molekula, sa sledstvenom promenom permeabiliteta mitohondrijalne membrane i oslobađanjem apoptogenih faktora (Yu J. *et* Zhang L. 2003). P53 protein može posredovati transkripcionu inhibiciju anti-apoptotskih gena – bcl-2 i IAPs. Pro-apoptotski Bid protein poseduje jedinstvenu sposobnost povezivanja p53 i AKT puta u okviru funkcionalnog ushodnog regulatornog kruga, a time i određivanje opstanka ili apoptoze ćelije (Oren *et al.* 2002). Indukcija Bid može pospešiti komunikaciju „unutrašnjeg“ i „spoljašnjeg“ apoptotskog puta (Fulda S. *et* Debatin KM. 2001). Pored kontrole funkcije spomenutih molekula koji dejstvuju ushodno od mitohondrija, p53 može aktivirati neke komponente efektornog mehanizma apoptoze, indukcijom ekspresije gena za Apaf-1 i kaspazu 6.

P53 protein, na nezavisan način od regulacije genske ekspresije, može pokrenuti apoptotski proces preko dva različita mehanizma koji se mogu pripisati specifičnoj lokalizaciji p53 proteina - u citosolu ili direktno na nivou mitohondrija, tako da oba puta iniciraju propustljivost spoljašnje mitohondrijalne membrane preko aktivacije pro-apoptotskih Bax ili Bak (Moll *et al.* 2006). U odgovoru na raznovrsne apoptotske stimulse, frakcija wt p53 proteina premešta se u mitohondrije sa akumulacijom i lokalizacijom na spoljašnjoj strani membrane, tkz. mitohondrijalna p53 koja autonomno pokreće apoptozu direktno iz mitohondrija – mitohondrijalni program ćelijske smrti. Mitohondrijalna p53 angažovana je u formiranju inhibitornog kompleksa sa anti-apoptotskim proteinima (bcl-2 i bcl- xl) i utiče na destabilizaciju membrane mitohondrija sa sledstvenim oslobađanjem pro-apoptotskih faktora. Ovu funkciju ispoljava samo fiziološki wt p53, ali ne i izmenjene, mutirane forme p53 u tumorskim ćelijama. Specifični DNK vezujući domen p53 proteina ispoljava u funkcionalnom smislu dvojnu ulogu u regulaciji apoptoze: posreduje i trans-aktivirajuće transkripciono dejstvo i direktnu mitohondrijalnu pro-apoptotsku aktivnost. Drugi cilj interakcije mitohondrijalne p53 je Bak, mehanizmom oslobađanja ovog pro-apoptotskog proteina

iz kompleksa sa anti-apoptotskim Mcl-1 ili bcl-x_l. Dodatno, druga ekstranuklearna funkcionalna uloga p53 proteina čini sposobnost citosolne frakcije p53 da direktno aktivira pro-apoptotski Bax protein.

Mitohondrijalni program apoptoze nastaje u osetljivim organima *in vivo* i pokreće brzi prvi talas apoptoze koji je nezavisan od transkripcije. Potom, sledi sporiji i efikasniji talas apoptoze posredovan dejstvom p53 koji je uslovljen transkripcionom aktivnošću ovog molekula (Moll *et al.* 2006). „Spoljašnji“, receptorima posredovani put je takođe pod uticajem p53 proteina. Stimulacija ekspresije gena čiji produkti čine pojedine receptore (Fas/CD95, DR5) ili vezujuće ligande za receptore (Fas ligand), direktni su ciljnjni geni transkripcione aktivacije p53 proteina (Haupt *et al.* 2003, Fulda S. *et* Debatin KM. 2006).

Kompleksna, negativna povratna regulatorna mreža (*eng.* „*feedback*“) prisutna između multiplih regulatornih funkcija na nivou gena ima za posledicu krajnji biološki ishod, odgovarajući odgovor ćelije na DNK leziju.

1.4.2.5. Mutacije TP53 gena

U malignim ćelijama funkcija p53 može biti kompromitovana različitim mehanizmima: mutacijama TP53 gena, izmenom regulatornih molekula p53 i izmenama ciljnjih gena.

Mutacije u TP53 genu su većinom somatskog porekla, prisutne u 20 - 40 % karcinoma dojke i predstavljaju glavni mehanizam inaktivacije p53 (Lacroix *et al.* 2006). Približno 80 % mutacija u ovom genu su mutacije koje imaju za posledicu ugradnju druge aminokiseline (*eng.* *point missense*) i vode sintezi stabilnog proteina koji se akumulira u jedrima tumorskih ćelija. Smatra se da je ova nuklearna akumulacija posledica nemogućnosti mutiranog p53 proteina da indukuje ekspresiju MDM2 gena odnosno sintezu mdm-2 proteina neophodnog za sopstvenu razgradnju. Imunohistohemijska detekcija količine jedarnog p53 se uzima kao pokazatelj izmenjenosti p53 proteina, prisustva mutacija TP53 gena.

Akumulacija mutiranog p53 ima sledeće posledice: (i) heterodimerizaciju i inhibiciju wt p53 koji je ekspimiran sa drugog genskog alela, a dominantno-negativnim efektom sa umanjenom transkripcionom aktivnošću (Willis *et al.* 2004) i (II) sticanje

novih funkcija mutiranog p53 koje ga transformišu u dominantni onkogen, „*eng. gain of function*“ (Soussi T. *et* Wiman KG. 2007). Ispoljenost svakog od 53 mutiranog proteina može biti pod uticajem raličitih faktora, kao što su normalna genetska osnova, prisustvo drugih genetskih izmena u ćeliji, tkivna specifičnost (Soussi T. 2007). Mutacije su nejednako raspoređene duž TP53 gena: skoro 95 % mutacija u TP53 genu je locirano u regijama koje kodiraju DNK-vezujući domen ključan za funkcionisanje p53 kao transkripcionog faktora (Bullock AN. *et* Fersht AR. 2001). Centralni region p53 ima glavnu ulogu u regulaciji apoptotske funkcije i čini vezujuće mesto za ko-faktore (ASPP1 i ASPP2) koji su bitni za trans-aktivirajuću funkciju p53 u odnosu na gene koji su povezani sa apoptozom.

I.4.2.6. Polimorfizam kodona 72 unutar TP53 gena

Pojam genetičkog polimorfizma odnosi se na prisustvo više alela na jednom genskom lokusu, u populaciji, koje čine sekvencu DNK svake osobe jedinstvenom i mogu uticati na razvoj nekih obolenja, odgovor na patogene, lekove itd. Za kodon 72 (egzon 4, unutar regiona bogatog prolinom) TP53 gena pokazan je polimorfizam aminokiselina arginin/prolin (Arg/Pro). Polimorfne varijante ispoljavaju različitost u odnosu na sposobnost vezivanja komponenti transkripcione mašinerije, aktivaciji transkripcije i indukciji apoptoze (Thomas *et al.* 1999). Varijanta p53 proteina sa Arg 72 je efikasnija u indukciji apoptoze od Pro/Pro varijante koji indukuje viši nivo G1 zastoja (Pim D. *et* Banks L. 2004). Viši apoptotski potencijal Arg72 u odnosu na Pro72 varijantu p53 proteina može se delimično objasniti efikasnijom trans-aktivacijom PUMA i NOXA i efikasnijem prenosu p53 iz jedra u mitohondrije, a to vodi pojačanom oslobađanju citohroma c. Takođe varijanta Arg72 efikasnija je u supresiji MDR1 (*eng. multiple drug resistance gene*) i indukciji pro-apoptotskog gena BAX, dok je varijanta Pro72 p53 proteina efikasnija u izazivanju zastoja ćelijskog ciklusa i popravke DNK oštećenja putem indukcije p21 i GADD45. Mutantne forme p53 proteina koje ne vezuju i ne inhibiraju p73 mogu da izazovu rezistenciju na neke antikancerske lekove što sugerise da Arg72 TP53 mutanti verovatno poseduju druge mehanizme narušavanja apoptoze koja je pokrenuta hemioterapijom (Vikhanskaya *et al.* 2005, Bergamaschi *et al.* 2003).

I.4.2.7. Uloga p53 u osetljivosti / rezistenciji na dejstvo citotoksičnih lekova

Čini se da različiti stresni događaji u ćelijama različitih tkiva regulišu različite transkripcione programe u smislu različite aktivacije pojedinih ciljnih gena i njihovih proteinskih produkata. U tome je suština predviđanja posledica gubitka normalne funkcije p53 proteina, razumevanja dominantnog odgovora pojedine ćelije, a koji je povezan sa aktivacijom p53, uključujući i odgovor na dejstvo citotoksičnog agensa. Osim uloge u indukciji apoptoze, sa sledstvenom regresijom tumora na dejstvo citotoksičnih lekova, u drugoj situaciji wt p53 protein može prevashodno indukovati zastoj ćelijskog ciklusa i doprineti rezistenciji na terapiju (Bertheau *et al.* 2008). U situaciji, kada aktivacija wt p53 proteina predominantno dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa sa ispravljanjem nastale greške genoma, može se očekivati da gubitak funkcionalnosti p53 doprinosi većoj osetljivosti ćelije na oštećenje genoma uzrokovano dejstvom citotoksičnog leka. Obrnuto, za ćelije u kojima aktivacija wt p53 prevashodno dovodi do apoptoze, gubitak funkcije može doprineti relativnoj rezistenciji ćelije na primenjenu terapiju (McGill G. *et Fisher* DE. 1999). Utvrđeno je i usvojeno gledište da ishod aktivacije p53 u datoj ćeliji uključuje kompleksnu povezanost brojnih različitih faktora: specifično DNK oštećenje (Gatti *et al.* 2002) i određeni ćelijski *milliae* u smislu faze ćelijskog ciklusa, stanja diferentovanosti i prisusustva ostalih molekularnih aberacija u ćeliji (Megha *et al.* 2002, Prives C. *et Hall* PA. 1999, Haupt *et al.* 2003). To može imati za posledicu da se jedan ili više puteva apoptotskog programa mogu isticati u određenom tipu ćelija, ili u različitim stadijumima progresije tumora (Fridman JS. *et Lowe* SW. 2003). Prihvaćeni stav jeste da p53 može modelirati kvalitet odgovora tumora na hemioterapiju (Weller M. 1998, Ferreira *et al.* 1999). Brojna klinička istraživanja prediktivne vrednosti p53 su inicijalno sugerisana na osnovu *in vitro* nalaza koja ukazuju da poremećaj p53 može činiti različite humane tumorske ćelije osetljivijim ili rezistentnim na dejstvo različitih citotoksičnih lekova (O'Connor *et al.* 1997, Bunz *et al.* 1999). Rezultati *in vitro* istraživanja Bunz-a i sar. 1999. pokazuju da se terapijski odgovor ćelija karcinoma debelog creva, sa defektnim p53, razlikuje u zavisnosti od primenjenog citotoksičnog leka; moguće je da deficijencija p53 čini maligne ćelije osetljivije na apoptozu na dejstvo doxorubicina (oštećenje DNK), ali neosetljive na

apoptotski efekat izazvan dejstvom 5-fluororacila (antimetabolit), pri čemu njegova citotoksičnost ne zavisi od funkcije p53. U okviru kliničkih *in vivo* studija, kada su raznovrsni citotoksični načini lečenja primenjeni u okviru heterogenih „podtipova“ karcinoma dojke, ishod terapijskog odgovora tumora jeste posebno kompleksan (Lacroix *et al.* 2006, Bertheau *et al.* 2008).

I.5. Proliferativna aktivnost ćelija – ekspresija Ki-67 antigena

Bazična saznanja ukazuju na povezanost koncepta ćelijskog ciklusa i koncepta apoptoze (Lundberg AS. *et* Weinberg RA. 1999). Kritični procesi koji se međusobno sustiču, neprilagođeno proliferisanje ćelija ujedno sa suzbijenom apoptozom, čine minimalnu zajedničku platformu za nastanak i progresiju neoplastičnog procesa. Neodgovarajući procesi proliferisanja i apoptoze ćelija povezuju dva osnovna cilja delovanja svih terapijskih intervencija (Evan GI. *et* Vousden KH. 2001). Jednostavnije rečeno, citotoksični lekovi interferiraju, upliću se i sukobljavaju sa bazičnim mehanizmima sinteze DNK i deobe ćelija.

Posle M faze, svaka nova „ćerka“ ćelija može stupiti u Go – mirujuću fazu ili ponoviti G1 fazu sa ponavljanjem ćelijskog ciklusa. Interfaza koju čini G1, S i G2 faza, predstavlja najduži deo ćelijskog ciklusa, ali su ćelije u tim fazama morfološki nerazpoznatljive. Ćelije u M fazi se mogu lako identifikovati usled karakterističnog izgleda hromozomskog seta (u toku pojedinih podfaza) što čini osnovu mikroskopskog „brojanja“ mitotskih figura, kao najstarijeg postupka za procenu proliferativne aktivnosti ćelija. Međutim, trajanje mitotske faze je različito i broj mitozna nije linearno povezan sa stepenom proliferisanja ćelija.

Optimalna procena proliferativne aktivnosti tumora (*eng. proliferation rate*) uključuje merenje frakcije rasta ćelija sa poznavanjem dužine trajanja ćelijskog ciklusa (van Diest *et al.* 2004). Trajanje ćelijskog ciklusa je teško za procenu, dok procena frakcije rasta ćelija daje informaciju o proliferativnom statusu populacije ćelija. Ekspresija Ki-67 antigena je prisutna u jedru ćelija u G1, S, i G2 fazi ćelijskog ciklusa, kao i u mitozu, dok mirujuće ćelije (u Go fazi) ne ispoljavaju prisustvo Ki-67 antigena. Prema tome, ekspresija Ki-67 antigena je povezana sa aktivnim fazama ćelijskog ciklusa. Ispoljavanje Ki-67 proteina se detektuje sa različitim intenzitetom tokom

pojedinih faza ćelijskog ciklusa; pojavljuje se sa niskim nivoima u kasnoj G1 fazi i tokom rane S faze, i progresivno raste tokom S i G2 faze sa najizrazitijim intenzitetom u metafazi tokom faze mitoze (M). Ne samo nivo ekspresije već i detekcija lokalizacije Ki-67 proteina tokom ćelijskog ciklusa je neujednačena (Schmidt *etal.* 2003). Uprkos poznavanju strukture i kompleksne lokalizacije u nukleusu odnosno nukleolusu, a i saznanjima o neophodnosti ovog ne-histonskog proteina koji je integrisan u regulatornu mrežu ćelijske deobe, još uvek je nedovoljno poznata njegova funkcija. Sugerisano je da može imati ulogu u dezintegraciji i ponovnom formiranju nukleolusa, a u kontekstu nastanka i izlaska ćelije iz M-faze i time je pretpostavljen indirektan uticaj Ki-67 proteina na ćelijski ciklus. Utvrđeno je da prisustvo ove strukture predstavlja pokazatelj frakcije proliferativne kategorije ćelija u okviru frakcije rasta date ćelijske populacije. S tim u vezi, predstavlja efikasan marker proliferativnosti ćelija koji se validno može odrediti imunohistohemijskom metodom (Scholzen T. *et Gerdes J.* 2000).

I.5.1. Indeks rasta tumora

Poteškoća u primeni proliferativnih pokazatelja, kao pojedinačnih biomarkera terapijskog odgovora tumora jeste to da apoptoza doprinosi dinamici rasta tumora. Indeks baziran na odnosu proliferisanja i apoptoze, kao odnos/količnik proliferativnog (Ki-67) i apoptotskog (AI) indeksa, u okviru populacije normalnih epitelnih ćelija dojke, a u uslovima fiziološkog menstrualnog ciklusa, može biti označen kao indeks ćelijskog obnavljanja, *eng. „cell turnover“* (Navarrete *et al.* 2005). Značajno je napomenuti i da izolovana komparacija pokazatelja proliferativnosti i apoptoze ima izvesna ograničenja, zato što svaki indeks odražava i broj događaja u jedinici vremena, a i proporciju ćelija u okviru date populacije koje mogu proći dati događaj. Zato, razmatranje indeksa rasta dozvoljava procenu učestalosti pojave proliferacije u odnosu na apoptozu. Tako se redukuje ili eliminiše efekat heterogenosti tkiva između različitih uzoraka; ćelije koje ne prolaze proces proliferacije ili apoptoze ne doprinose izračunavanju ćelijskog obnavljanja.

Apoptoza jeste glavni protivtežni proces proliferisanju u dinamici rasta tumora. Brzina tumorskog rasta bar delimično, uslovljena je prekomernom proliferativnošću u odnosu na apoptozu (Liu *et al.* 2001). Analogno tome, indeks baziran na odnosu

proliferisanja i apoptoze, kao količnik proliferativnog (Ki-67) i apoptotskog (AI) indeksa se može označiti kao indeks rasta tumora. Indeks rasta tumora je predložen u cilju aproksimacije udela koji ovi procesi, proliferativna i apoptotska aktivnost malignih ćelija, mogu imati u procesu rasta tumora (Urruticoechen *et al.* 2005). Indeks rasta sumira suprostavljene efekte proliferativnosti i apoptoze (Archer *et al.* 2003). Iako je jasno da ovaj indeks ne može precizno odraziti dinamiku rasta tumora, indeks rasta daje informaciju o sveukupnoj izmeni rasta tumora pod uticajem citotoksičnih lekova i može ispoljiti vrednost kao rani pokazatelj terapijskog odgovora na dejstvo primarne hemioterapije u pacijentkinja sa karcinomom dojke (Cleator *et al.* 2002).

I.6. Biomarkeri kao pokazatelji terapijskog odgovora karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova u okviru neoadjuvantnog modela: pregled literature o značaju apoptoze, Ki-67 indeksa, bcl-2 i p53 proteina

Dosadašnji literaturni podaci o značaju ovih biomarkera kao relevantnih pokazatelja osetljivosti/rezistencije karcinoma dojke na različite hemioterapijske pristupe i njihove promene pod uticajem terapije su doveli do neusaglašenog stava. Objavljene studije iznose rezultate u smislu značajnog porasta (Frassoldati *et al.* 1997, Shao *et al.* 1999, Takada *et al.* 2004, Tiezzi *et al.* 2006) ili sniženja (Ellis *et al.* 1998) vrednosti apoptotskog indeksa (AI) u rezidualnim uzorcima karcinoma dojke posle hemioterapije, a u poređenju sa vrednostima pre terapije. Dosadašnji rezultati ukazuju na izmenjenu apoptotsku aktivnost malignih ćelija karcinoma dojke pod uticajem citotoksične terapije, češće u smeru porasta vrednosti AI u rezidualnim tumorskim uzorcima. Neusaglašenost objavljenih rezultata je prisutna i u odnosu na značajnost AI kao prediktivnog pokazatelja, biomarkera za procenu osetljivosti/rezistencije karcinoma dojke na citotoksične lekove. Izmena vrednosti AI sa višim post-terapijskim, rezidualnim vrednostima, povezana je sa objektivnom regresijom tumora (Frassoldati *et al.* 1997, Shao *et al.* 1999, Takada *et al.* 2004, Tiezzi *et al.* 2006), nasuprot nalazu sniženih rezidualnih vrednosti AI koji su povezani sa kliničkom regresijom tumora (Ellis *et al.* 1998). Nije utvrđen značaj preterapijskih, „bazičnih“ vrednosti AI za predviđanje terapijskog odgovora karcinoma dojke na dejstvo hemioterapije (Tiezzi *et al.* 2006, Frassoldati *et al.* 1997).

Među objavljenim rezultatima o značaju ekspresije Ki-67 proteina, mogu se naći oprečni zaključci. Različiti autori iznose rezultate o značajno sniženim rezidualnim vrednostima Ki-67 indeksa u odnosu na početne vrednosti (Aas *et al.* 2005, Bottini *et al.* 2001, Burcombe *et al.* 2005, Colleoni *et al.* 1999, Ellis *et al.* 1998, Faneyte *et al.* 2003, Vincent-Salomon *et al.* 2004), ali sa različitim značajem u proceni osetljivosti tumora na dejstvo citotoksičnih lekova. U većini radova iznose se rezultati da su visoke, početne vrednosti Ki-67 u uzorcima tumora pre hemioterapije povezane sa većom terapijskom osetljivošću tumora, sa većom verovatnoćom pojave patološke (Vincent-Salomon *et al.* 2005, Faneyte *et al.* 2003) ili kliničke (Colleoni *et al.* 1999) regresije tumora. Objavljen je i suprotan nalaz - odsustvo povezanosti visokih, početnih vrednosti proliferativne aktivnosti malignih ćelija i kliničke regresije karcinoma dojke (Aas *et al.* 2005). Prikazano je da su niske vrednosti Ki-67 u rezidualnom tumoru posle hemioterapije povezane sa kompletnom kliničkom regresijom tumora, dok preterapijske vrednosti Ki-67 nemaju prediktivni značaj (Bottini *et al.* 2001). Posebno se ističu rezultati da je sniženje Ki-67 indeksa za više od 50% ili 75% u odnosu na početne vrednosti povezano sa kliničkom odnosno patološkom regresijom tumora (Burcombe *et al.* 2005, Colleoni *et al.* 1999). Pojedini autori su utvrdili da sniženje vrednosti početnog statusa Ki-67 nema prediktivni značaj (Ellis *et al.* 1998), ili da se u rezidualnom tumoru posle hemioterapije detektuje porast ekspresije Ki-67 (Penault-Lorca *et al.* 2003). Drugi autori prikazuju da nema značajne promene statusa Ki-67 pod uticajem hemioterapije u neoadjuvantnom pristupu lečenja karcinoma dojke (Frassoldati *et al.* 1997, Pohl *et al.* 2003, Arens *et al.* 2005).

Evaluacijom značajnosti ekspresije bcl-2 gena u okviru neoadjuvantnog modaliteta primene citotoksičnih lekova može se ustanoviti relativna neusaglašenost objavljenih rezultata. Većina autora navodi da nema značajne izmene statusa bcl-2 u uzorcima karcinoma dojke pod uticajem hemioterapije (Faneyte *et al.* 1999, Colleoni *et al.* 1999, Bottini *et al.* 2001, Tiezzi *et al.* 2006, Pusztai *et al.* 2004) i da utvrđeni nivoi ekspresije bcl-2 nisu od značaja za objektivnu regresiju tumora (Faneyte *et al.* 1999, Colleoni *et al.* 1999, Bottini *et al.* 2001, Tiezzi *et al.* 2006). Međutim, odsustvo ekspresije bcl-2 u uzorcima tumora pre terapije može biti povezano sa kompletnom patološkom regresijom tumora (Pusztai *et al.* 2004). Prema stavu nekih autora, nađen je porast nivoa ekspresije bcl-2 posle primarne hemioterapije u poređenju sa pre-

terapijskim vrednostima, ali bez značaja za procenu terapijskog odgovora karcinoma dojke (Frassoldati *et al.* 1997, Ellis *et al.* 1998).

Dosadašnje studijske analize terapijskog uticaja p53 proteina, analize značaja gubitka funkcionalnosti ovog molekula za osetljivost/rezistenciju karcinoma dojke, nisu dovele do pouzdanog odgovora na pitanje da li status p53 pokazuje prediktivnu vrednost na dejstvo citotoksičnih lekova. Moguće je da ne postoji jednoznačan odgovor na to pitanje, s obzirom da mnogo faktora intereaguje u okviru funkcionalnog kruga p53 molekula (Wallace-Brouder RR. *et* Lowe SW. 1999). Manji broj studija, koje status funkcionalnosti p53 proteina određuju imunohistohemijskom metodom, ukazuje na povezanost neizmenjenog p53 sa objektivnom regresijom karcinoma dojke na citotoksične lekove (Faneyte *et al.* 1999, Colleoni *et al.* 1999, Bottini *et al.* 2000, Tiezzi *et al.* 2006, Anneli *et al.* 2003), uprkos tome što većina studija to ne čini. U pogledu istraživanja promene ovog biomarkera pod uticajem hemioterapije, pojedinačni rezultati ukazuju na porast (Arens *et al.* 2005, Bottini *et al.* 2000, Pohl *et al.* 2003), odnosno, sniženje (Tiezzi *et al.* 2006) ekspresije imunoreaktivnosti p53 proteina, dok preovlađuje stav da ne dolazi do značajne promene statusa p53 pod uticajem citotoksičnih lekova (Faneyte *et al.* 1999, Colleoni *etal.* 1999, Bottini *et al.* 2001, Arens *et al.* 2005, Stearns *et al.* 2003).

Navodi se da je kontradiktornost rezultata u objavljenim studijama, koje razmatraju ulogu biomarkera za procenu odgovora karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova (predikcija), posledica analize pacijentkinja sa tumorima različito uznapređovalog lokalno proširenog obolenja (stadijuma bolesti) u kojih su primenjeni raznovrsni citotoksični pristupi lečenja. Pregled literature neoadjuvantnog modaliteta hemioterapije ukazuje da nijedan od navedenih bioloških markera nije dovoljno pouzdan da bi se na osnovu njega donela odluka za validnu procenu tumorskog odgovora na delovanje citotoksičnih lekova.

II CILJ RADA

Primarni cilj ove studije je da ispita uticaj citotoksičnih lekova na proliferisanje i smrt malignih ćelija karcinoma dojke *in vivo* u okviru neoadjuvantnog kliničkog modaliteta primene hemioterapije.

Analiza obuhvata:

- Određivanje povezanosti proliferativne (Ki-67 indeks) i apoptotske aktivnosti (AI) malignih ćelija karcinoma dojke, sa analizom odnosa ovih vrednosti (Ki-67 indeks/AI) koji označava indeks rasta tumora i procenu povezanosti ovih biomarkera sa ekspresijom bcl-2 i p53 proteina; u netretiranim tumorima pre terapije i u rezidualnoj populaciji malignih ćelija posle delovanja hemioterapije;
- Utvrđivanje promene fenotipa malignih ćelija pod uticajem hemioterapije koji je okarakterisan profilom biomarkera - AI, Ki-67 indeks, indeksa rasta, bcl-2 i p53 proteina, a poređenjem nivoa njihove ekspresije pre i posle hemioterapije;
- Procenu prediktivne vrednosti AI, Ki-67, indeksa rasta tumora, bcl-2 i p53 proteina - analiza povezanosti biomarkera sa stepenom patološke regresije karcinoma dojke na delovanje citotoksičnih lekova.

II.1. Radna hipoteza

Terapijski odgovor karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova dovodi do promene proliferativne i apoptotske aktivnosti malignih ćelija.

III MATERIJAL I METODE

Ova studija odnosi se na evaluaciju arhiviranog materijala tkivnih uzoraka dobijenih tokom procesa standardne dijagnostičke procedure u pacijentkinja sa karcinomom dojke na neoadjuvantnom modalitetu hemioterapije, a koje su klinički prospektivno praćene.

III.1 Pacijentkinje

Kriterijumi za izbor pacijentkinja koje su analizirane u ovoj studiji su sledeći:

- Patohistološki potvrđen nalaz invazivnog karcinoma dojke biopsijom primarnog tumora;
- Pacijentkinje sa primarnim karcinomom dojke koji prethodno nije lećen;
- Pacijentkinje u kojih je pre hemioterapije, na osnovu kliničkih kriterijuma, utvrđen stepen lokalno proširene bolesti („stažiranje“) koja nije striktno operabilna. Pojam lokalno proširenog karcinoma dojke uključuje merljivu bolest (mamografski ili ultrazvučno) sa tumorom većih dimenzija, ili tumorom koji lokalno zahvata kožu ili površne delove grudnog koša; ili procenjen stepen zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova pazušne jame (N₂) koji ukazuje na prisustvo velikog pojedinačnog limfnog čvora ili povezanost više limfnih čvorova u smislu konglomerata, ili fiksiranost tumorske mase za zidove pazušne jame (T ≥ 2 cm, kliničkog stadijuma II i IIIa, IIIb);
- Dostupan i dovoljan uzorak tumorskog tkiva za preciznu analizu biomarkera, sačuvan u parafinskom bloku i u situaciji utvrđivanja inicijalne dijagnoze i u situaciji evaluacije resekovanog hiruškog materijala;

Analizirane su pacijentkinje u kojima je u celini sprovedena primarna hemioterapija sa praćenjem kliničkog statusa, a i hiruško lećenje od strane stručnjaka IORS-a. Pacijentkinje sa obostranim (bilateralnim) karcinomom dojke, kao i sa metastatskom bolešću u visceralnim organima, nisu uključene u analizu. Po završetku primarne hemioterapije, a u saglasnosti sa odlukom multidisciplinarnog tima stručnjaka IORS-a, izvršena je definitivna hiruška intervencija - kompletna ili poštedna operacija dojke sa disekcijom limfnih čvorova istostrane aksile (nivo I i II) u skladu sa standardnim protokolom.

Podatak o godinama starosti, kao i vreme poslednjeg menstrualnog ciklusa, dobijeni su na osnovu podataka unesenih u istoriju bolesti. Menopauzalni status je određen na osnovu menopauze ili poslednjeg menstrualnog ciklusa koji označava izostanak redovnog menstrualnog krvarenja u toku šest meseci nastalog bez specifično poznatog uzroka. Peri-menopauza obuhvata interval od pet godina po nastupanju menopauze. Pre-menopauza obuhvata pacijentkinje sa redovnim menstrualnim ciklusom, pre nastupanja menopauze. Post-menopauza obuhvata pacijentkinje koje su izašle iz perioda peri-menopauze.

Tabela III.1.1. Podaci o pacijentkinjama koje su analizirane i karakteristike tumora

	<u>Broj uzoraka (%)</u>
<i>Broj pacijenata</i>	106 (100)
<i>Životna dob (godine)</i>	
Medijana	49
IK opseg*	31-69
<i>Menopauzni status</i>	
Premenopauza	54 (50.94)
Perimenopauza	13 (12.26)
Postmenopauza	39 (36.79)
<i>T-veličina tumora</i>	
T0	2 (1.89)
T1	4 (3.77)
T2	43 (40.57)
T3	13 (12.26)
T4	7 (6.60)
T4b	32 (30.19)
T4d	2 (1.89)
nepoznat	3 (2.83)
<i>N-status reg. axill.</i>	
limfnih čvorova	
N0	6 (5.66)
N1	19 (17.92)
N2	77 (72.64)
N3	1 (0.94)
N4	1 (0.94)
nepoznat	2 (1.89)

Klinički stadijum bolesti - lokalno uznapredovali karcinom dojke: klinička procena veličine tumora (T) i stepena zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova pazušne jame (N) i odsustvo metastatske bolesti (M0), a na osnovu TNM klasifikacije.

* IK opseg; interkvartilni 25 %-75% opseg

Od 163 pacijentkinje koje su lečene po tipu neoadjuvantnog modaliteta na IORS-u, u periodu od Sept. 1999. do Sept. 2003, 106 pacijentkinja je ispunjavalo uslove za ulazak u studiju (dostupni arhivirani parafinski blokovi).

Tabela III.1.2. Karakteristike tumora.

	<i>Broj uzoraka (%)</i>	
<i>Broj pacijenata</i>	106 (100)	
<i>Histološki tip tumora</i>		
IDC	36 (34)	
ILC	27 (25)	
Med	1 (1)	
Muc	1 (1)	
Infiltrativni (neklasifikovani)	25 (24)	
Nepoznat	16 (15)	
<i>Histološki (SBR) gradus tumora</i>		
I	3 (3)	
II	46 (43)	
III	16 (15)	
Neklasifikovan	25 (24)	
Nepodesan za primenu	16 (15)	
<i>Status ER</i>	91	
Biohemijska (DCC) metoda	84	
IHC metoda	7	
Pozitivan	47 (52)	
Negativan	44 (48)	
<i>Nepoznat status ER</i>	15 (14)	
<i>Status PR</i>	91	
Biohemijska (DCC) metoda	84	
IHC metoda	7	
Pozitivan	24 (26)	
Negativan	67 (74)	
<i>Nepoznat status PR</i>	15 (14)	

Patohistološki parametri tumora – histološki tip i gradus tumora (SBR), određeni su na uzorcima tumorskog tkiva pri inicijalnom utvrđivanju dijagnoze.

Sadržaj steroidnih receptora u tkivu karcinoma dojke – receptora za estrogen (ER α) i receptora za progesteron (PR) određen je klasičnom biohemijskom (DCC) metodom u 84 pacijentkinje, a imunohistohemijskom metodom u 7 uzoraka (ukupno u 91 pacijentkinje).

III.2. Primarna (neoadjuvantna) hemioterapija

Hemioterapija obuhvata standardno, kliničko neoadjuvantno lečenje prema važećem protokolu IORS-a iz tog vremenskog perioda. Neoadjuvantni pristup primene hemioterapije je uključivao primenu 3 - 4 ciklusa kombinovanog antraciklinskog (FAC) pristupa (5-fluorouracil 500 mg/m², doxorubicin 50 mg/m² i cyclophosphamid 500 mg/m², i.v., u intervalu od 21 dana) pre operativnog zahvata. Nakon kliničke procene terapijskog odgovora tumora po završetku III ciklusa, terapija se nastavlja do IV ciklusa, osim ako nije procenjeno da je došlo do progresije bolesti (ili neizmenjenosti inicijalnog nalaza/stabilna bolest) u toku primene terapije.

III.3. Procena terapijskog odgovora karcinoma dojke na delovanje hemioterapije

Principijelni ishod (*eng. "end-point"*) delovanja citotoksične terapije na karcinom dojke predstavlja stepen objektivnog, patološkog odgovora tumora. Stepen regresije tumora pod uticajem hemioterapije je objektivno procenjen na osnovu patoloških kriterijuma koji uključuju makro/mikroskopski pregled resekovanog hirušskog materijala, a u skladu sa standardnom procedurom. Kompletni patološki odgovor definiše se kao odsustvo rezidualne invazivne bolesti (invazivnih malignih ćelija) u tkivu dojke i u limfnim čvorovima koji uključuje prisustvo *in situ* lezija, a na osnovu preporuka *International Expert Panel* (Kaufmann *et al*, 2006). Svi ostali slučajevi podrazumevaju rezidualnu bolest; minimalna rezidualna bolest se definiše kao invazivni tumori veličine < 1cm³ u dojci ili mikroskopski fokusi invazivnih malignih ćelija u isečcima tkiva dojke, sa odsustvom metastatskih malignih ćelija u regionalnim limfnim čvorovima. Invazivni tumori veličine > 1³ cm u tkivu dojke, kao i zahvaćenost limfnih čvorova aksile nezavisno od veličine rezidualne bolesti u dojci, predstavljaju ekstenzivnu (opsežnu) rezidualnu bolest. Rezidualni tumori, kao što su mikroskopski fokusi invazivnog karcinoma i tumori manji od 1 cm u najvećem dijametru, povezani su sa povoljnijim ishodom bolesti (Kuerer 1999 *et al*, Fisher *et al*. 2002)

U skladu sa navedenim, stepen odgovora karcinoma dojke na dejstvo primarne hemioterapije, podeljen je u četiri kategorije: kompletan patološki odgovor (kompletna regresija bolesti) - pKR (kateg.1), minimalna rezidualna bolest (kateg.2), ekstenzivna

rezidualna bolest (kateg.3) i klinički dokaz progresije (stabilne) bolesti u toku terapije - PB(SB) (kateg.4). Poslednja kategorija je izdvojena sa obzirom na to da pacijentkinje sa progresijom (stabilnom) bolešću, **(PB/SB)** ne moraju biti podesne za hiruško lečenje (Kuerer *et al.* 1999).

Sa obzirom na nalaz minimalne rezidualne bolesti u samo 3 (2.8 %) pacijentkinje, kategorije 2. i 3. tumorskog odgovora na hemioterapiju analizirane su zajedno kao (pod)grupa, parcijalna (delimična) patološka regresija bolesti – **pPR**.

Patološki kriterijumi za procenu terapijskog efekta citotoksičnih lekova na nivou resekovanog hiruškog materijala u skladu su sa klasifikacijom većine objavljenih studija; kompletna patološka regresija (**pKR**) podrazumeva odsustvo histološkog dokaza invazivnih malignih ćelija, dok histološki utvrđena rezidualna, invazivna bolest ma kog stepena (u dojci i/ili limfnim čvorovima) obuhvata slučajeve sa parcijalnom regresijom bolesti (Kaufmann *et al.*, 2006, Sneige *et al.* 2001).

U okviru analizirane grupe od 106 pacijentkinja utvrđena je parcijalna patološka regresija bolesti u 93 (87 %) slučajeva, u 8 (8 %) pacijentkinja je utvrđena kompletna patološka regresija bolesti, a u 5 (5 %) bolesnica je pod uticajem hemioterapije klinički potvrđena progresija/stabilna bolest.

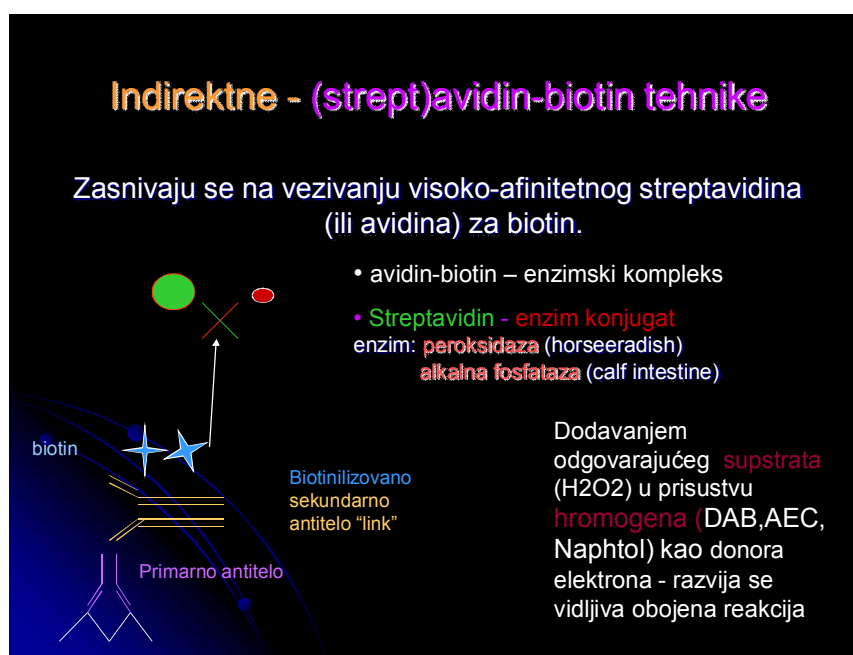
Tabela III.3. Učestalost patološkog odgovora tumora u grupi analiziranih pacijentkinja.

(Pod)grupe pacijentkinja	Br.pacijentkinja (%)	
Ukupan broj pacijentkinja	106 (100)	
Pacijentkinje sa minimalnom rezidualnom bolešću	3 (2.8)	
Pacijentkinje sa ekstenzivnom rezidualnom bolešću	90 (85)	
Pacijentkinje sa parcijalnom regresijom bolesti	pPR	93 (87)
Pacijentkinje sa kompletnom regresijom bolesti	pKR	8 (8)
Pacijentkinje sa progresijom/stabilnom bolešću	PB/SB	5 (5)

III.4. Detekcija ekspresije bcl-2 i p53 proteina i Ki-67 antigena na morfološkom nivou – imunohistohemijska metoda (IHC)

III.4.1. Princip imunohistohemijske metode

Tehnike detekcije proteinskih produkata ciljnih molekula na morfološkom nivou, u smislu mikroskopske vizualizacije bimolekula na histološkim preparatima (tkivni presek, citološki razmaz), označavaju se kao imunohisto(cito)hemijska metoda. Osnovu ovih tehnika čini postupak imunodetekcije, odnosno primena specifičnih antitela usmerenih na ciljne molekule (antigene determinante), pri čemu se nastala reakcija vizualizuje razvojem obojenog krajnjeg produkta. Tehnike u kojima se za vizuelizaciju osnovne reakcije (specifično antitelo~ tkivni antigen), primenjuje reakcija „enzim~supstrat“, u cilju nastanka vidljivog krajnjeg obojenog jedinjenja, nazivaju se imuno-enzimskim metodama.



Slika III.1. Postupak indirektne imuno-enzimske detekcije ciljnih proteina zasnovan na primeni streptavidin-peroksidazne tehnike.

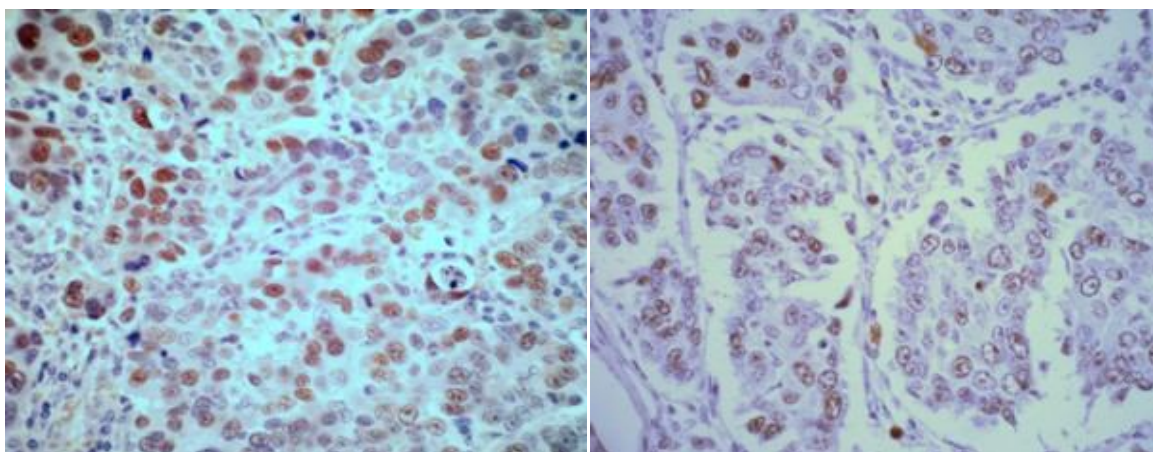
Indirektne imuno-enzimske metode podrazumevaju reakcioni sled koji obuhvata vezivanje primarnog - specifičnog antitela (ne konjugovano) za ciljni tkivni antigen,

potom primena sekundarnog antitela (usmerenog na primarno antitelo) za koje je vezan enzim i zatim dodavanjem supstrata (u prisustvu hromogena) nastaje obojena (vidljiva) reakcija. Pojam indirektna, imuno-enzimske metode odnosi se na reakcioni sled koji je primenjen za vizuelizaciju osnovne reakcije u cilju veće senzitivnosti metode, detekcije biomolekula pomoću nastanka intenzivnijeg - vidljivijeg krajnjeg, obojenog produkta. Pojam „amplifikacija signala“ koji predstavlja osnovu indirektnih detekcionih metoda, u proceduralnom smislu podrazumeva primenu više „slojeva“ reakcionih solucija u cilju bolje vizualizacije inicijalnog ciljnjeg molekula, odnosno, nastanka intenzivnije obojenog krajnjeg produkta (Boenisch T. 2001.). „Troslojni“ reakcioni sled sastoji se u primeni specifičnog, primarnog antitela koje se vezuje za tkivni antigen i primeni sekundarnog antitela za koje je „vezan“ biotin – (biotinilizovano II At); dodavanjem streptavidin-peroksidaznog konjugata (streptavidin kao supstanca koja se sa visokim afinitetom vezuje za biotin i enzima – peroksidaze), a potom primenom supstrata (H₂O₂) u prisustvu hromogena (donor elektrona) razvija se vidljiv obojeni produkt.

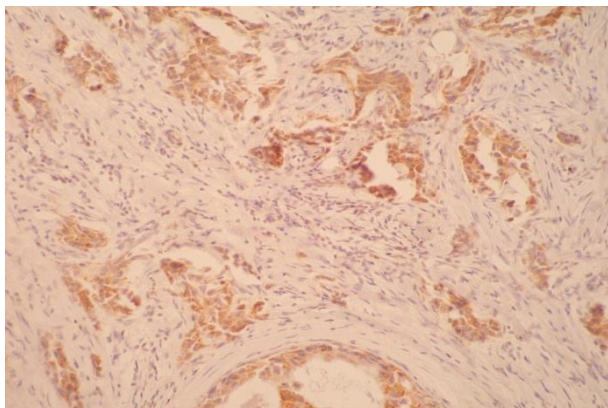
III.4.2. Postupak indirektna streptavidin-peroksidazna imunohistohemijске tehnike.

Tkivni preseci karcinoma dojke (arhiviranih uzoraka u parafinskom kalupu), obojeni na H&E tokom standardne dijagnostičke procedure (*iz tkiva dobijenog incizionom biopsijom, prevashodno, za inicijalnu dg. odnosno, iz resekovanog hiruškog materijala posle neoadjuvantne hemioterapije*), pregledani su u cilju izbora reprezentativnog tkivnog uzorka (odgovarajućeg parafinskog kalupa) za imunohistohemijšku analizu. Tkivni preseci iz reprezentativnih parafinskih kalupa su isečeni 1 - 3 dana pre imuno-obojenja. Tkivni preseci debljine 4 – 5 μm naneti na poly-L-lysine prekrivenim (SuperFrostUltraPlus®) mikroskopskim pločicama su deparafinisani u xylol-u i rehidratirani kroz postepeno sniženu koncentraciju etanola i tretirani sa 3 % H₂O₂ tokom 10 min, u cilju neutralizacije endogene peroksidazne aktivnosti. Postupak demaskiranja epitopa (antigenih determinanti) ciljnih antigena uključuje mikrotalasni pretretman (400 W), zagrevanje tkivnih preseka u 10 mM citratnom puferu ph = 6.0 u trajanju od 12 – 15 min (p53, Ki-67), ili u Target retrieval solution, High pH 9.9 (Dako, S 3307) tokom 12 min (bcl-2). TBS pufer, ph = 7.6 je primenjen za razblaživanje primarnog antitela i za ispiranje između proceduralnih

postupaka (radni puffer). Preseci su blokirani solucijom avidina (15 min) i 0.02 % biotina (u TBS) u cilju smanjenja nespecifičnog (*eng.*, *background*) obojenja. Zatim je primenjeno primarno (specifično) antitelo odgovarajućeg razblaženja, tokom 30 minuta u vlažnoj sredini na sobnoj temperaturi. Imunoreaktivnost ciljnih molekula je detektovana primenom monoklonskih antitela: anti-Bcl-2 (1: 100), clone 124 (Dako, Denmark); anti- p53 (1: 100), clone DO-7 (Dako), i anti - Ki-67, (1 : 80), clone MIB-1(Dako). Za postupak detekcije reakcije između primarnog antitela i odgovarajućeg antigena je korišćen visoko senzitivni detekcioni kit "Dako LSAB^o + System-HRP" (code no. K 0690) u skladu sa uputstvom proizvođača. Za vizuelizaciju nastale reakcije, 3',3'-diaminobenzidine (DAB+ Liqid, Dako K3468) je upotrebljen kao hromogen, tokom 7 – 10 min do nastanka vidljivih braonkastih precipitata. Jedra su kontrastirana sa haematoxylin-om, a kao pokrovni medium je korišten DPX nakon dehidratacije preseka. Negativna kontrola koja verifikuje specifičnost primarnog antitela i pokazuje nespecifično "background" obojenje procenjena je izostavljanjem primarnog antitela. Pozitivna kontrola uključuje uzorak tkiva karcinoma dojke sa poznatom imunoreaktivnošću, u cilju provere optimalnosti procedure i validnosti detekcionog sistema.



Slika III.2. Braonkasti precipitati (DAB) u jedru malignih ćelija koji detektuju akumulaciju mutiranog p53 proteina (levo) i ekspresiju Ki-67 antigena u proliferišućim ćelijama (desno).

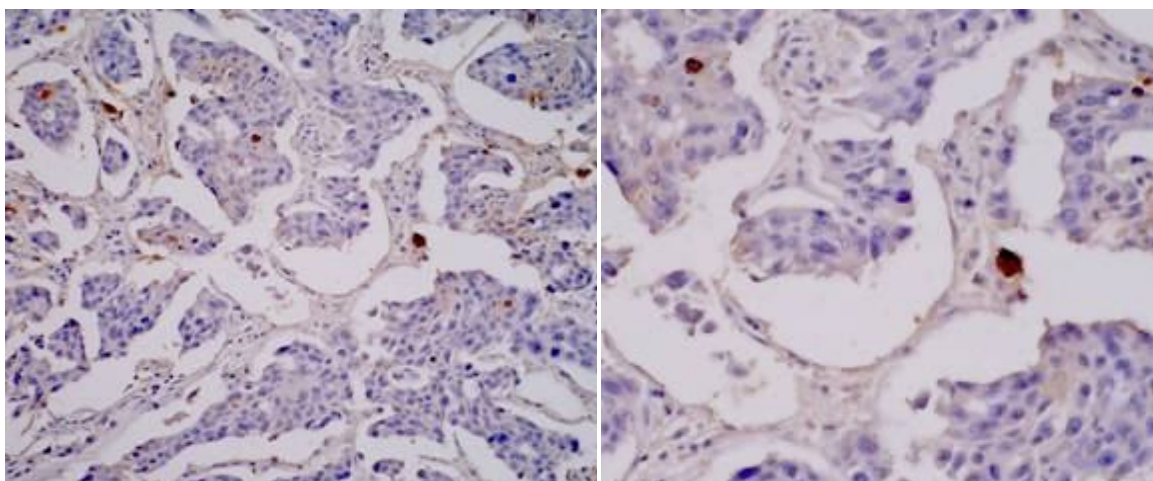


Slika III.3. Braonkasti precipitati (DAB) u citoplazmi ćelija koji detektuju bcl-2 protein.

III.5. Detekcija programirane ćelijske smrti (apoptoze) na nivou pojedinačnih ćelija u okviru morfološkog konteksta (*in situ*) – TUNEL metoda.

III.5.1. Princip metode

Za detekciju apoptozne smrti ćelija u okviru morfološkog konteksta (*in situ*), primenjena je TUNEL metoda, za koju je pokazano da predstavlja optimalan metod za detekciju apoptoze u patohistološkim isečcima tkiva (Dowsett M. 1998.).



Slika III.4. TUNEL-metodom obeležene ćelije u procesu apoptoze.

Eksperimentalna saznanja pokazuju da su prekidi dvolančane strukture genomske DNK karakteristično biohemijsko svojstvo procesa apoptoze. To dovodi do nastanka dvolančanih fragmenata DNK (mono i oligonukleozoma) i do pojave jednolančanih prekida DNK (eng. "nicks"). Ovi prekidi mogu biti identifikovani obeležavanjem slobodnih 3'-OH krajeva lanca DNK sa modifikovanim nukleotidima u enzimskoj reakciji. Metoda se zasniva na specifičnom povezivanju terminalne deoksinukleotidil transferaze (TdT) za 3'-OH krajeve lančanih prekida DNK koja potom katalizuje polimerizaciju obeleženih deoksiuridin-nukleotida za 3'-OH krajeve DNK, nezavisno od matrice (eng. "template-independent manner"), reakcije koja je označena kao TUNEL esej (eng. *TdT-mediated dUTP-nick end labeling*) (Gavrieli Y.1992.). Nastali poli(deoksi)nukleotidni polimer na mestu prekida lanca DNK jeste signal koji biva amplifikovan i detektovan korišćenjem enzim-supstrat reakcije koja omogućava uobičajenu histohemijsku identifikaciju svetlosnim mikroskopom.

III.5.2. Proceduralni postupak

Za imunohistohemijsku detekciju i kvantifikaciju ćelija u procesu apoptoze upotrebljen je detekcioni kit (*In situ Cell Death Detection Kit, POD*; Cat. No. 11 684 817 910, Roche Diagnostics GmbH). Proceduralni postupak je prilagođen intralaboratorijskoj standardizaciji u skladu sa preporukama proizvođača za detekciju apoptoznih ćelija na isečcima tkiva iz parafinskih kalupa. Priprema tkivnih preseka je identična navedenim postupcima za imunohistohemijsko bojenje, uključujući mikrotalasni pre-tretman parafinskih preseka tkiva u trajanju od 5 min (400 W) u 10 mM citratnom puferu, pH = 6.0 u cilju odvajanja („oljuštenja“) nukleusa od proteina. Primenjen je rastvor 3 % H₂O₂ tokom 10 min, kao i avidin i biotin (pojedinačno 15 min) u cilju smanjenja nespecifičnog, „background“ obojenja. Za postupak ispiranja između proceduralnih postupaka primenjen je pored dejenizovane vode, TBS pufer, pH = 7.6 (radni pufer). Naredni reakcioni sled je specifičan i uključuje: 1) Primenu «TUNEL reakcione solucije» koju čini enzimska solucija (TdT) i solucija za obeležavanje (miksura nukleotida koji su obeleženi fluoresceinom), tokom 60 min u vlažnoj sredini na t 37°C. Enzimska solucija je razblažena primenom TUNEL Buffer Solution (Cat. No. 11 966 006 001, Roche Diagnostics GmbH) u odnosu 1 : 5 (do 1: 7). Reakcija je

prekinuta postupkom prenošenja pločica u TBS pufer, tokom 15 min; 2). Dodavanje « Converter-POD solucije», solucije anti- fluorescein-skih antitela koji su konjugovani sa enzimom (peroksidazom) tokom 30 min u vlažnoj sredini na t 37°C u cilju detekcije inkorporiranog fluoresceina. Nakon ispiranja u TBS puferu (15 min), dalji proceduralni sled je identičan opisanoj imunohistochemijskoj proceduri. Dodavanjem supstrata (H₂O₂) u prisustvu hromogena (DAB), razvijaju se braokasti precipitati na mestu lančanih prekida DNK, *in situ*, u pojedinačnim ćelijama koje su u procesu apoptoze.

III.6. Procena ekspresije bcl-2 i p53 proteina, Ki-67 antigena i apoptoznih ćelija u malignim ćelijama karcinoma dojke (eng. scoring).

Odgovarajući tkivni preseci su pregledani na standardnom svetlosnom mikroskopu (Olympus Bx5, Olympus Optical, Tokyo, Japan), upotrebom objektiva (x 40), “na slepo”- bez poznavanja odgovora tumora na dejstvo hemioterapije i toka bolesti. Pregledom tumorskih preseka sa objektivom manjeg uveličanja (x20) prvo su selektovana “*hot spot*” polja u kojima se zapaža najizrazitija imunoreaktivnost u smislu učestalosti i intenziteta obojenja. Analizirano je najmanje 1000 invazivnih malignih ćelija, pregledom najmanje pet različitih mikroskopskih polja najvećeg uveličanja (x40), nasumično odabranih u okviru “*hot spot*” polja, u svakom pojedinom slučaju.

Procena ekspresije analiziranih biomarkera se zasniva na sledećim kriterijumima:

- **KI-67 indeks** – definiše se kao broj pozitivnih (imunoreaktivnih) ćelija u okviru izbrojanih 1000 malignih ćelija i izražava se kao procenat;
- **AI - Apoptotski indeks** – izražava se kao procentualni broj TUNEL tehnikom označenih ćelija – broj “obojenih jedara” u okviru izbrojanih 3000 malignih ćelija. Procenjuju se zone viabilnih malignih ćelija uz izbegavanje polja nekroze. Neobojene ćelije koje pokazuju klasične morfološke znake apoptoze (eozinofiliju citoplazme sa fragmentacijom jedra i separaciju od okolnih ćelija) su takođe ubrojane.
- **(Ki-67/AI) - indeks rasta tumora**, označava količnik proliferativnog i apoptotskog indeksa.
- **p53** – broj pozitivnih (imunoreaktivnih) ćelija u okviru izbrojanih 1000 malignih ćelija, izražen kao procenat;

- **Bcl-2** – Primenjen je semikvantitativan metod procene distribucije citoplazmatske imunoreaktivnosti, sa obzirom na nalaz heterogenosti intenziteta citoplazmatske prebojenosti na istom tkivnom preseku. Radi se o kombinaciji intenziteta obojenja (imunoreaktivnosti) i zastupljenosti datog intenziteta obojenja u okviru svih malignih ćelija tkivnog preseka. Intenzitet obojenja malignih ćelija je izražen skalom od 0 do 3 (0 ~ odsustvo, 1 ~ slaba obojenost, 2 ~ umerena i 3 ~ prebojenost citoplazme izrazitog intenziteta). Imunoreaktivnost limfocita na datom preseku (unutrašnja pozitivna kontrola) označena je vrednošću 3 na skali intenziteta obojenja. Procenjena je i zastupljenost ćelija odgovarajućeg intenziteta obojenja na celokupnom tkivnom preseku. Množenjem procenta malignih ćelija odgovarajućeg intenziteta imunoreaktivnosti sa vrednošću za dati intenzitet na skali, dobijen je broj; ovi brojevi koji odgovaraju zastupljenosti pojedinačnog intenziteta obojenja na celokupnom tkivnom preseku su sabrani i dobijen je skor u opsegu od 0 do 3.

III.7. Statističke metode

U analizi podataka primenjuvane su neparametrijske metode, testovi (Petz B. 1985.). Neparametrijski testovi se primenjuju u situaciji kada su rezultati merenja izraženi na kvalitativan način tj. opisno, ili kada su podaci izraženi kvantitativnim vrednostima koje ne pokazuju normalnu raspodelu (tendenciju grupisanja ili rasipanja oko neke srednje vrednosti).

Od metoda deskriptivne statistike upotrebljeni su učestalost, procenti i mere centralne tendencije (medijana i srednja vrednost) i mere rasipanja (raspon ili opseg od minimalne do maksimalne vrednosti) i posebno, interkvartilni opseg odnosno vrednosti koje odgovaraju 25 % i 75 % granici u okviru analiziranih vrednosti.

Status biomarkera je analiziran kao kvantitativne vrednosti, evaluacijom svih dobijenih vrednosti. Medijana označava centralnu vrednost kvantitativnog statusa biomarkera. Vrednost medijane uslovljena je brojem podataka, ali ne i njihovom apsolutnom brojčanom vrednošću, a to doprinosi tome da ekstremni rezultati nemaju uticaja na promenu vrednosti medijane. Opseg kvantitativnih vrednosti koji označava meru varijabilnosti vrednosti parametra koji se analizira predstavljen je u okviru

interkvartalnog opsega (25 % - 75 %) u cilju preciznijeg prikazivanja grupisanja rezultata oko medijane kao centralne vrednosti. Status-i biomarkera su analizirani i kao dihotomne varijable, pozitivni vs. negativni (kvalitativno) pri čemu je medijana izabrana kao granična vrednost (*eng. data oriented cut-offs*)

Testovi korelacije: za ispitivanje povezanosti između kvantitativnih vrednosti biomarkera primenjen je Spearman-ov test rang korelacije; "Point – biserialni" koeficijent korelacije je primenjen za analizu povezanosti između kvantitativnih vrednosti biomarkera i njihovog dihotomnog statusa i χ^2 test u situaciji analize verovatnoće povezanosti kvalitativno izraženih varijabli (pozitivan vs. negativan status). Analiza varijabilnosti biomarkera pod uticajem citotoksičnih lekova ispitivana je u okviru kvantitativnih vrednosti, a i određivanjem procentualne ili relativne promene vrednosti biomarkera u pojedinačnom slučaju. Za analizu varijabilnosti biomarkera između podgrupa pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora primenjen je Mann – Whitney U test i χ^2 test. Ispitivanje promene vrednosti biomarkera pod uticajem hemioterapije urađeno je u podgrupi pacijentkinja sa dostupnom malignom komponentom pre i posle hemioterapije (*eng. matched paired cohort*), u pacijentkinja sa parcijalnom regresijom bolesti (pPR). Poređenje vrednosti biomarkera između pre- i post-terapijskih tumorskih uzoraka utvrđeno je primenom Wilcoxon-ovog testa ekvivalentnih parova. U svakom pojedinačnom slučaju, primenjeno je izračunavanje procentualno/relativne promene vrednosti biomarkera posle hemioterapije. Količnik (odnos) post-terapijske i početne, pre-terapijske vrednosti predstavlja procentualnu promenu vrednosti biomarkera, u cilju evaluacije u kojoj se meri promena vrednosti biomarkera razlikuje od jedinične vrednosti. Relativna promena je definisana kao količnik razlike između rezidualne (post-) i početne (pre-terapijske) vrednosti sa početnom vrednošću.

Analiza značajnosti biomarkera za procenu terapijskog odgovora karcinoma dojke (prediktivna vrednost) urađena je primenom Spearman-ov testa rang korelacije (kvantitativne vrednosti) i χ^2 testa (dihotomni status).

Verovatnoća – p vrednost koja je manja od 0.05 označava statističku značajnost.

IV REZULTATI

IV.1. Kvantitativna analiza – analiza vrednosti biomarkera u grupi pacijentkinja u celini

Tabela IV.1.1. Relevantne - reprezentativne vrednosti biomarkera: srednja vrednost (medijana) i opseg biomarkera p53, bcl-2, Ki-67 indeks i AI u odnosu na (pod)grupe pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom na dejstvo hemioterapije.

Bio marker	Pacijentkinje sa različitim terapijskim odgovorom		N (%)	n0 (%)	Medijana	IK opseg (25% - 75%)	Opseg (min-max)
p53	sve vrednosti		106 (100)	0	0	0 - 16.91	0 - 96.72
	pRB	pre-	93 (87)	0	0	0 - 16.82	0 - 96.72
		post-	93 (87)	0	0	0 - 27.72	0 - 98.82
	kPR		8 (8)	0	23.56	3.75 - 52.95	0 - 91.91
	PB/SB		5 (5)	0	2.76	0 - 2.93	0 - 77.84
bcl-2	sve vrednosti		98 (92)	8 (8)	1.58	0.72 - 2.52	0 - 3
	pRB	pre-	85 (80)	8 (8)	1.74	0.95 - 2.55	0 - 3
		post-	85 (80)	8 (8)	1.69	0.85 - 2.70	0 - 3
	kPR		8 (8)	0	0.35	0.20 - 1.05	0 - 2.85
	PB/SB		5 (5)	0	0.53	0.09 - 0.96	0 - 2.85
Ki-67	sve vrednosti		106 (100)	0	14.68	5.18 - 24.72	0 - 72.75
	pRB	pre-	93 (87)	0	14.68	5.25 - 23.42	0 - 57.30
		post-	92 (86)	1 (1)	5.21	1.67 - 13.25	0 - 57.27
	kPR		8 (8)	0	34.77	20.38 - 55.99	9.51 - 72.75
	PB(SB)		5 (5)	0	0.70	0.50 - 1.23	0.32 - 12.84
AI	sve vrednosti		105 (99)	1 (1)	1.314	0.734 - 1.818	0.107 - 3.426
	pRB	pre-	92 (86)	1 (1)	1.207	0.676 - 1.703	0.107 - 3.426
		post-	90 (85)	3 (3)	0.827	0.506 - 1.258	0.0 - 6.530
	kPR		8 (8)	0	2.239	1.645 - 2.683	1.212 - 2.902
	PB/SB		4 (4)	1 (1)	1.901	1.646 - 2.257	1.362 - 2.791

Napomena: Tabela sadrži sledeće podatke:

- (Pod)grupa pacijentkinja: sve vrednosti koje su dobijene pre terapije; (pod)grupa sa parcijalnom patološkom regresijom tumora - rezidualna bolest (pPR); (pod)grupa sa kompletnom patološkom regresijom tumora (pKR) i pacijentkinje sa progresijom ili stabilnom bolešću (PB/SB) pod uticajem hemioterapije.

- N - broj jedinica posmatranja / broj pacijentkinja u odgovarajućoj (pod)grupi - veličina uzorka;
- *pre/post* - vrednosti biomarkera pre (bazalne, preterapijske), odnosno posle terapije (rezidualne vrednosti);
- n_0 - podaci koji nedostaju u analiziranoj (pod)grupi;
- *Medijana* – srednja vrednost biomarkera;
- Vrednosti koje odgovaraju *interkvartilnom (25%-75%) opsegu, IK opseg*.
- *Opseg vrednosti* – od minimalne do maksimalne vrednosti;

Tabela IV.1.2. Vrednosti medijane i IK opsega (25 % - 75 % opseg) indeksa rasta tumora u (pod)grupama pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom na dejstvo hemioterapije.

<i>Indeks rasta</i>	(Pod)grupa pacijentkinja	N (%)	n (%)	Medijana	IK opseg (25% - 75%)	Opseg (min-max)
	sve vrednosti	105 (99)	1 (1)	10.2	3.84 - 24.88	0 - 245.87
Ki-67/ AI	pRB pre-	92 (87)	1 (1)	10.39	3.93 - 25.04	0 - 245.87
	post-	90 (85)	3 (3)	8.22	2.30 - 14.93	0 - 248.02
	kPR	8 (8)	0	14.84	8.49 - 26.94	5.70 - 38.82
	PB/SB	5 (5)	0	0.37	0.30 - 0.44	0.23 - 5.69
Post/pre Ki-67/ AI (IR)	pRB	89 (85)	4 (3)	0.54	0.15 - 1.62	0 - 114.55

Indeks rasta tumora definisan je na dva načina:

- Odnos (količnik) vrednosti proliferativnog i apoptotskog indeksa (Ki-67/AI) – na nivou preterapijskih (pre-) i postterapijskih (post-) vrednosti;
- (IR) – vrednost koja odgovara srazmernom (proporcionalnom) delu post-terapijske vrednosti Ki-67/AI u odnosu na odgovarajuću pre-terapijsku vrednost (količnik post- / pre- vrednosti Ki-67/AI)). Ova analiza bila je moguća u (pod)grupi pacijentkinja sa parcijalnom patološkom regresijom tumora (pPR).

IV.2. Povezanost biomarkera (Spearman-ov test rang korelacije)

Tabela IV.2.1. Analiza povezanosti biomarkera na nivou pre-terapijskih vrednosti u svih pacijentkinja (sve dobijene vrednosti).

<i>Biomarker</i>		p53	Ki-67	AI
bcl-2	ρ^*	-0.139	-0.171	-0.333
	p^\dagger	0.17	0.09	0.0001
	n^\ddagger	98	97	97
p53	ρ		0.327	0.254
	p		0.0001	0.009
	n		105	105
AI	ρ		0.201	
	p		0.041	
	n		104	

* ρ - koeficijent korelacije;

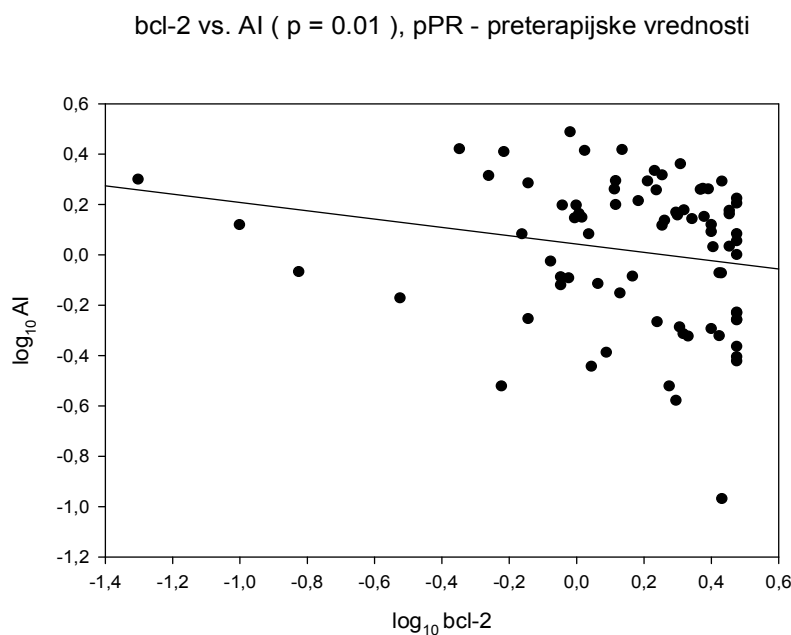
$^\dagger p$ - nivo značajnosti;

$^\ddagger n$ - broj pacijentkinja;

Tabela IV.2.2. Analiza povezanosti biomarkera na nivou pre-terapijskih vrednosti u (pod)grupi pacijentkinja sa parcijalnom patološkom regresijom tumora – rezidualna bolest (pPR).

<i>Biomarker</i>		p53	Ki-67	AI
bcl-2	ρ	-0.099	-0.163	-0.282
	p	0.37	0.14	0.01
	n	85	84	84
p53	ρ		0.322	0.220
	p		0.002	0.036
	n		92	92
AI	ρ		0.182	
	p		0.08	
	n		91	

Grafički prikazi povezanosti (eng. „*scattered-plot diagrams*“) – korelacije između vrednosti biomarkera u (pod)grupi pacijentkinja sa pPR, a koje su pokazale statističku značajnost. Svaki „tačkasti podatak“ predstavlja „score“ za pojedinačni tumor - uzorak. Vrednosti prikazane na logaritamskoj skali omogućavaju da niže vrednosti (bliske 0) mogu biti vizuelno izdvojene, odnosno jasno vidljive.

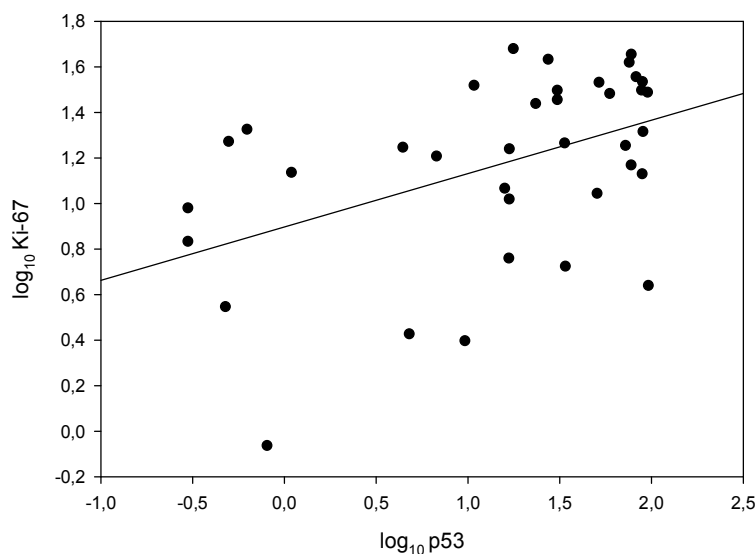


Slika IV.2.2.1. Grafički prikaz korelacije vrednosti bcl-2 i AI, na nivou pre-terapijskih vrednosti u pacijentkinja sa pPR.

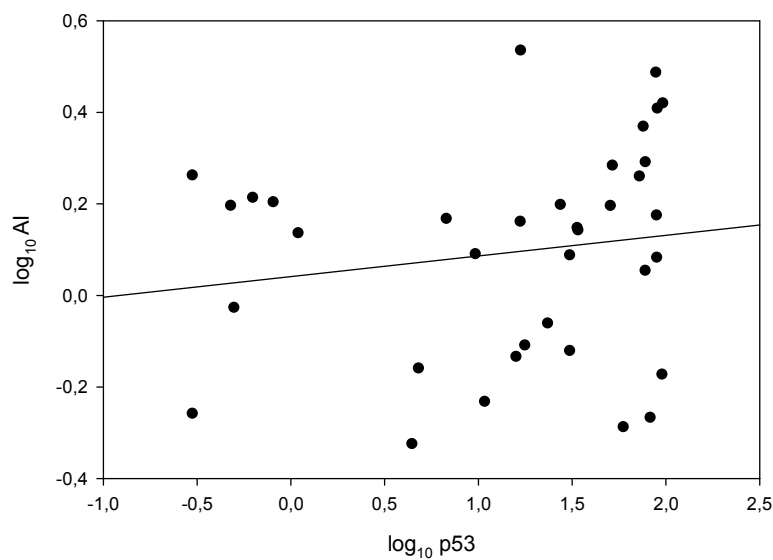
Analizom povezanosti između bcl-2 proteina i apoptotskog indeksa (AI) pre terapije dobijena je statistički značajna **negativna** korelacija; na nivou svih vrednosti u grupi pacijentkinja u studiji (Tabela IV.2.1. *bcl-2 vs. AI*, $p = 0.0001$) i u (pod)grupi pacijentkinja sa pPR (Tabela IV.2.2. *bcl-2 vs. AI*, $p = 0.01$, Sl. IV.2.2.1.). Sniženje ekspresije bcl-2 proteina povezano je sa porastom vrednosti apoptotskog indeksa (AI) u ispitivanim (pod)grupama pacijentkinja.

U netretiranim tumorima (pre-terapijske vrednosti) utvrđena je statistički značajna **pozitivna** korelacija između vrednosti p53 proteina i proliferativnog (KI-67), a i apoptotskog (AI) indeksa; u analiziranoj grupi pacijentkinja (Tabela IV.2.1. *p53 vs Ki-67*, $p = 0,0001$; *p53 vs AI* $p = 0.009$) i u grupi pacijentkinja sa pPR (Tabela IV.2.2. *p53 vs Ki-67*, $p = 0,002$; Sl. IV.2.2.2.; *p53 vs AI*, $p = 0,04$; Sl. IV.2.2.3.).

Nađena je statistički značajna pozitivna korelacija između vrednosti proliferativnog i apoptotskog indeksa (Ki-67 vs. AI, $p = 0.041$, Tabela IV.2.1.) koja ukazuje da su više vrednosti Ki-67 indeksa povezane sa višim vrednostima AI. Međutim, u (pod)grupi pacijentkinja sa pPR (Ki-67 vs. AI, $p = 0.08$, Tabela IV.2.2.) nije utvrđena statistički značajna povezanost ovih biomarkera.

p53 vs. Ki-67 ($p = 0.002$), pPR - preterapijske vrednosti

Slika IV.2.2.2. Grafički prikaz korelacije vrednosti p53 i Ki-67, na nivou pre-terapijskih vrednosti u pacijentkinja sa pPR.

p53 vs. AI ($p = 0.036$), pPR - preterapijske vrednosti

Slika IV.2.2.3. Grafički prikaz korelacije vrednosti p53 i AI, na nivou pre-terapijskih vrednosti u pacijentkinja sa pPR.

Nađena je statistički značajna **pozitivna** korelacija između vrednosti proliferativnog i apoptotskog indeksa (*Ki-67 vs. AI*, $p = 0.041$, Tabela IV.2.1.) koja ukazuje da su više

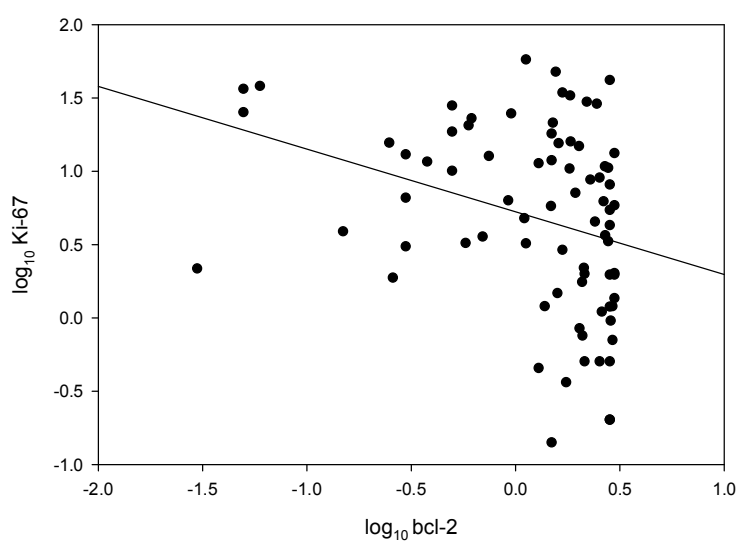
vrednosti Ki-67 indeksa povezane sa višim vrednostima AI. Međutim, u (pod)grupi pacijentkinja sa pPR (*Ki-67 vs. AI*, $p = 0.08$, Tabela IV.2.2.) nije utvrđena statistički značajna povezanost ovih biomarkera.

Ispitivanjem povezanosti *bcl-2* proteina sa *p53* proteinom (*bcl-2 vs. p53*), kao i sa proliferativnim indeksom (*bcl-2 vs Ki-67*) nije utvrđena statistički značajna korelacija; u situaciji analize svih vrednosti (Tabela IV.2.1.) i u situaciji analize vrednosti u (pod)grupi pacijentkinja sa pPR (Tabela IV.2.2).

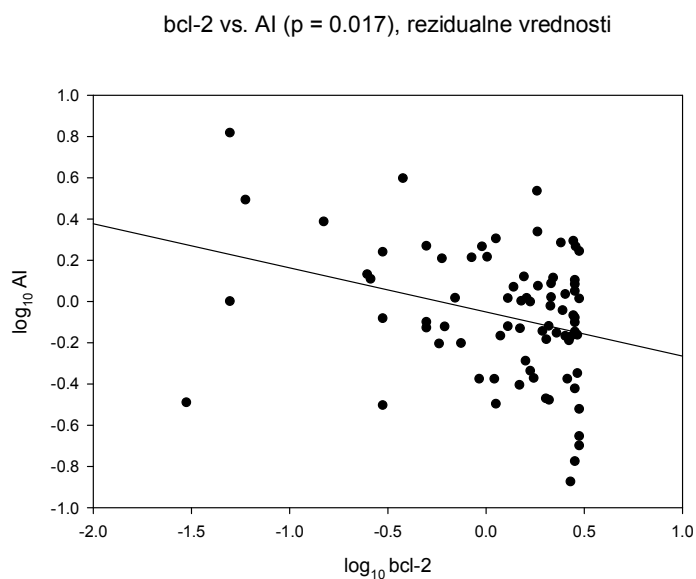
Tabela IV.2.3. Povezanost biomarkera posle dejstva hemioterapije analizom vrednosti na nivou rezidualne populacije malignih ćelija karcinoma dojke(pPR).

<i>Biomarker</i>		p53	Ki-67	AI
bcl-2	ρ	-0.100	-0.273	-0.263
	p	0.36	0.012	0.017
	n	85	84	82
p53	ρ		0.375	0.06
	p		0.0001	0.58
	n		92	90
AI	ρ		0.254	
	p		0.016	
	n		90	

bcl-2 vs. Ki-67 ($p = 0.012$), rezidualne vrednosti

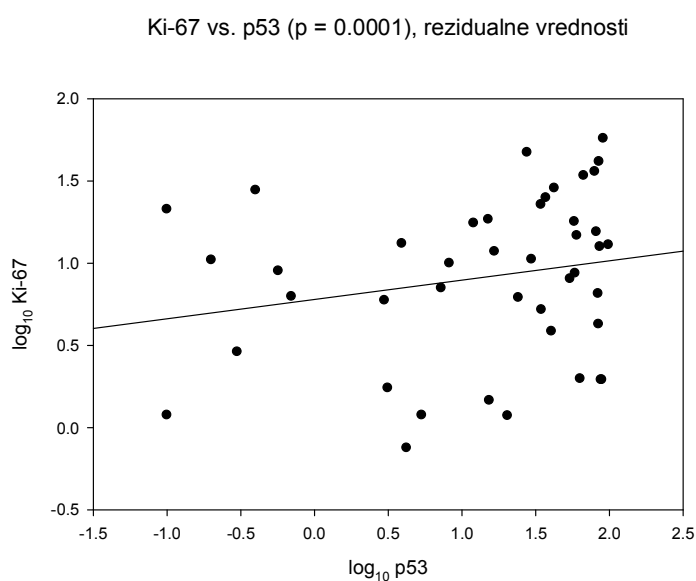


Slika IV.2.3.1. Grafički prikaz korelacije vrednosti *bcl-2* i Ki-67 indeksa, na nivou post-terapijskih vrednosti u pacijentkinja sa pPR.



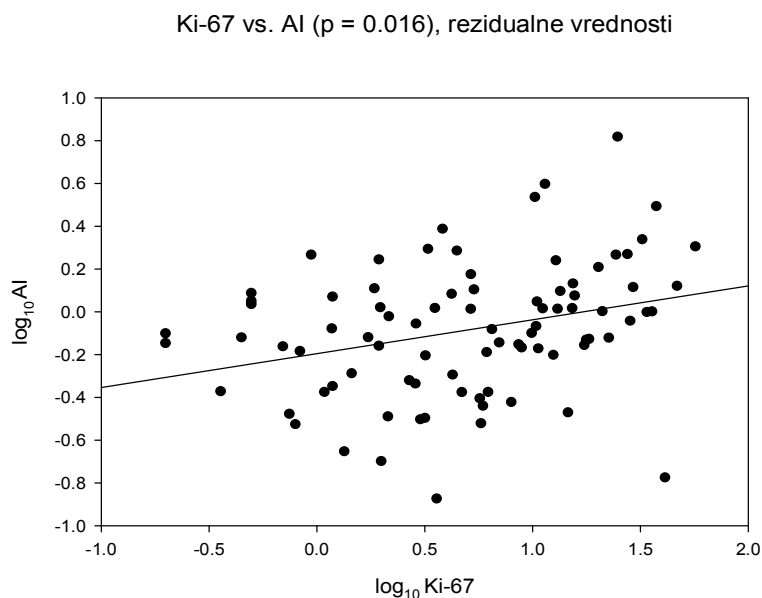
Slika IV.2.3.2. Grafički prikaz korelacije vrednosti bcl-2 i AI, na nivou post-terapijskih vrednosti u pacijentkinja sa pPR.

U rezidualnoj populaciji malignih tumorskih ćelija posle delovanja hemioterapije analizom povezanosti bcl-2 proteina sa Ki-67 indeksom (*bcl-2 vs. Ki-67*, p = 0.012, Slika IV.2.3.1.), i sa apoptotskim indeksom (*bcl-2 vs. AI*, p = 0.017, Slika IV.2.3.2.) utvrđena je statistički značajna **negativna** korelacija. Porast ekspresije bcl-2 proteina povezan je sa sniženjem vrednosti proliferativnog (Ki-67) i apoptotskog indeksa (AI).



Slika IV.2.3.3. Grafički prikaz korelacije vrednosti Ki-67 i p53, na nivou post-terapijskih vrednosti u pacijentkinja sa pPR.

Statistički značajna pozitivna korelacija dobijena je između vrednosti p53 proteina i Ki-67 indeksa posle terapije (p53 vs. Ki-67, $p = 0.0001$). Porast vrednosti p53 proteina povezan je sa većim vrednostima Ki-67 indeksa u okviru rezidualne populacije malignih ćelija.



Slika IV.2.3.4. Grafički prikaz korelacije vrednosti Ki-67 i AI, na nivou post-terapijskih vrednosti u pacijentkinja sa pPR.

Dobijena je statistički značajna **pozitivna** korelacija između proliferativne i apoptotske aktivnosti rezidualnih malignih ćelija (*Ki-67* vs. *AI*, $p = 0.016$) - više vrednosti Ki-67 indeksa su povezane sa višim vrednostima AI.

Porast vrednosti Ki-67 indeksa povezan je sa višim vrednostima p53 proteina i višim vrednostima AI u uzorcima karcinoma dojke posle hemioterapije.

Nije utvrđena povezanost između vrednosti p53 proteina i bcl-2 proteina analiziranih u uzorcima karcinoma dojke i pre i posle primenjene hemioterapije u pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) (Tabela IV.2.2.; IV.2.3).

Tabela IV.2.4. Povezanost vrednosti biomarkera pre terapije u (pod)grupama pacijentkinja sa kompletnom patološkom regresijom tumora (pKR) i sa klinički procenjenom progresijom/stabilnom bolešću (PB/SB).

		<i>Biomarker</i>					
		p53		Ki-67		AI	
<i>(Pod)grupa</i>		kPR	PB/SB	kPR	PB/SB	kPR	PB/SB
bcl-2	ρ	0.330	-0.820	-0.13	-0.300	0.168	0.00
	p	0.39	0.08	0.71	0.68	0.66	1.00
	n	8	5	8	5	8	5
p53	ρ			0.084	0.359	-0.240	0.154
	p			0.79	0.52	0.54	0.78
	n			8	5	8	5
AI	ρ			0.238	0.00		
	p			0.54	0.08		
	n			8	5		

U (pod)grupi pacijentkinja u kojih je utvrđena kompletna patološka regresija tumora (pKR), a i u pacijentkinja u kojih je kliničkom procenom utvrđena progresija / stabilna bolest (PB/SD) na dejstvo hemioterapije nije nađena međusobna povezanost između vrednosti ispitivanih biomarkera (analiza je bila moguća na nivou pre-terapijskih vrednosti).

IV.2.5. Povezanost biomarkera sa indeksom rasta tumora

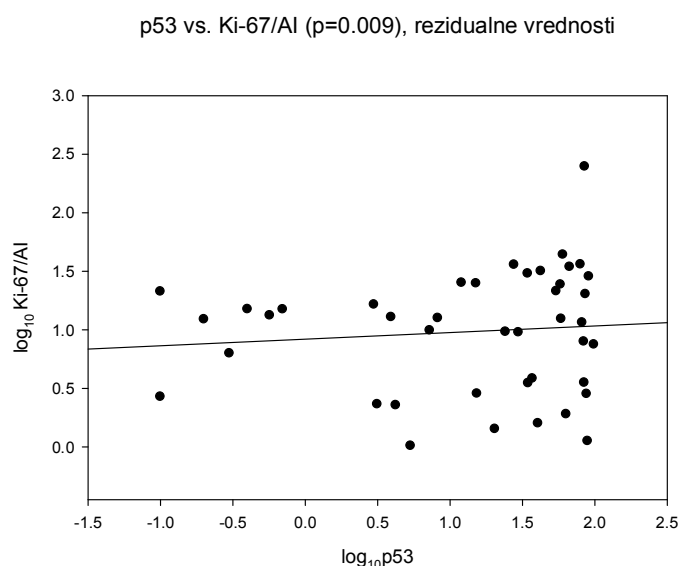
Tabela IV.2.5.1. Povezanost vrednosti p53 i bcl-2 sa indeksom rasta (Ki-67/AI) u pacijentkinja sa pPR pre i posle terapije, kao i na nivou pre-terapijskih vrednosti u pacijentkinja sa pKR i sa PB/SB.

		<i>(Pod)grupa pacijentkinja</i>						
		pRB				kPR	PB(SB)	
<i>Biomarker</i>		Ki-67/AI		*IR		Ki-67/AI	Ki-67/AI	
		pre-th	(post-th)	pre-th	(post-th)	pre-th	pre-th	
p53	pre (post)	ρ	0.19	0.276	0.116	0.068	0.331	-0.821
		p	0.08	0.009	0.28	0.53	0.39	0.08
		n	92	90	89	89	8	5
bcl-2	pre (post)	ρ	0.007	-0.107	0.148	0.114	0.12	-0.3
		p	0.95	0.34	0.19	0.31	0.75	0.68
		n	84	82	81	81	8	5

* IR - količnik vrednosti indeksa rasta pre i posle primenjene terapije.

Analizom povezanosti p53 sa indeksom rasta tumora na nivou rezidualnih, post-terapijskih vrednosti utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija (post p53 vs. post Ki67/AI, $p = 0.009$, Tabela IV.2.5.1., Sl. IV.2.5.1.) u pacijentkinja sa pPR. Više vrednosti p53 proteina posle terapije su povezane sa višim vrednostima indeksa rasta (Ki-67/AI) rezidualnog tumora.

U pacijentkinja sa pKR i u pacijentkinja sa PB/SD na dejtvo citotoksičnih lekova nije nađena povezanost između vrednosti p53 proteina i indeksa rasta tumora. Nije nađena statistički značajna povezanost između vrednosti bcl-2 proteina i indeksa rasta tumora u pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora na hemioterapiju – pKR, pPR, PB/SD (Tabela IV.2.5.1.).



Slika IV.2.5.1. Grafički prikaz korelacije vrednosti p53 i indeksa rasta (Ki-67/AI), na nivou post-terapijskih vrednosti u pacijentkinja sa pPR.

U podgrupi pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) bilo je moguće indeks rasta tumora razmatrati kao vrednost koja predstavlja srazmeran deo rezidualne u odnosu na početnu, pre-terapijsku vrednost. Ovaj način se može označiti kao procentualna promena vrednosti indeksa rasta (Deo IV.5.II) pod uticajem citotoksičnih lekova. Analiza povezanosti AI sa ovim vrednostima je pokazala statistički značajnu **pozitivnu** korelaciju na nivou bazičnih vrednosti, pre terapije (-pre AI vs. IR $p = 0.0001$), Tabela IV.2.5.2.

Ovaj nalaz ukazuje da su više pre-terapijske vrednosti AI povezane sa vrednostima koje pokazuju porast indeksa rasta rezidualnog tumora posle hemioterapije.

Tabela IV.2.5.2. Povezanost vrednosti proliferativnog (Ki-67) i apoptotskog indeksa (AI) sa vrednostima procentualne promene indeksa rasta tumora pacijentkinja sa pPR.

<i>Biomarker</i>		<i>Post/Pre (Ki-67/AI)</i>	
		pre-th	post-th
Ki-67	□	-0.26	0.447
	p	0.015	0.0001
	n	88	89
AI	□	0.402	-0.2
	p	0.0001	0.06
	n	88	89

Sa obzirom na rezultat statistički značajne korelacije između Ki-67 i vrednosti procentualne promene indeksa rasta tumora u okviru početnih i u okviru post-terapijskih vrednosti, vrednosti Ki-67 indeksa imaju značajan uticaj na procentualnu promenu vrednosti indeksa rasta tumora.

Više početne vrednosti Ki-67 indeksa su značajno povezane sa nižim vrednostima procentualne promene indeksa rasta (pre Ki-67 vs. IR, ρ -0.260, $p = 0.015$), a to ukazuje na povezanost viših vrednosti Ki-67 indeksa sa vrednostima koje pokazuju sniženje indeksa rasta rezidualnog tumora. Više pre-terapijske vrednosti Ki-67 indeksa su povezane sa izrazitijim sniženjem indeksa rasta u rezidualnom tumoru.

Statistički značajna pozitivna korelacija post-terapijskih vrednosti Ki-67 indeksa sa procentualnom promenom indeksa rasta ($\rho = 0.447$, $p = 0.0001$) sugerise da su niske rezidualne vrednosti Ki-67 indeksa povezane sa izrazitijim sniženjem indeksa rasta rezidualnog tumora.

IV.3. Povezanost biomarkera sa terapijskim odgovorom karcinoma dojke na delovanje hemioterapije (Spearman-ov test rang korelacije)

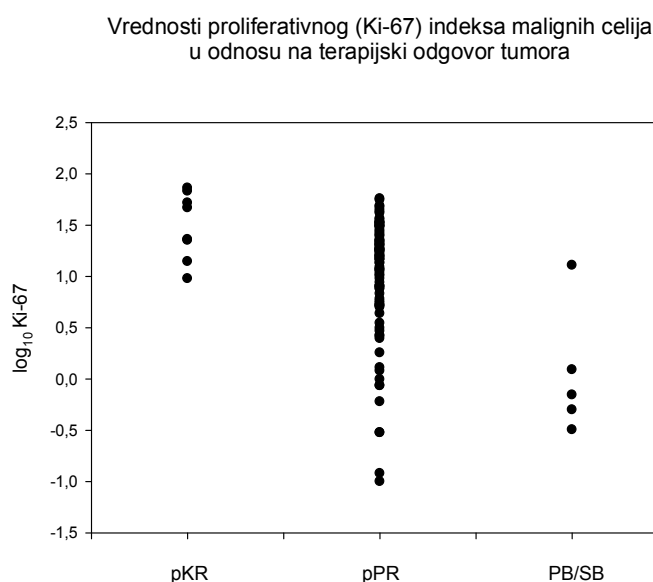
Analiza značajnosti biomarkera za procenu terapijskog odgovora karcinoma dojke - prediktivna vrednost biomarkera bila je izvediva na nivou **preterapijskih** vrednosti.

Tabela IV.3.1. Rezultati analize povezanosti biomarkera sa različitim odgovorom karcinoma dojke na dejstvo hemioterapije (pKR, pPR i PB/SB).

	<i>Biomarker</i>						
	p53	bcl-2	Ki-67	AI	Ki-67/AI	ER	PR
□	-0.125	0.101	-0.362	-0.103	-0.26	0.192	0.141
p	0.2	0.32	0.0001	0.29	0.008	0.08	0.2
n	106	98	105	105	105	84	84

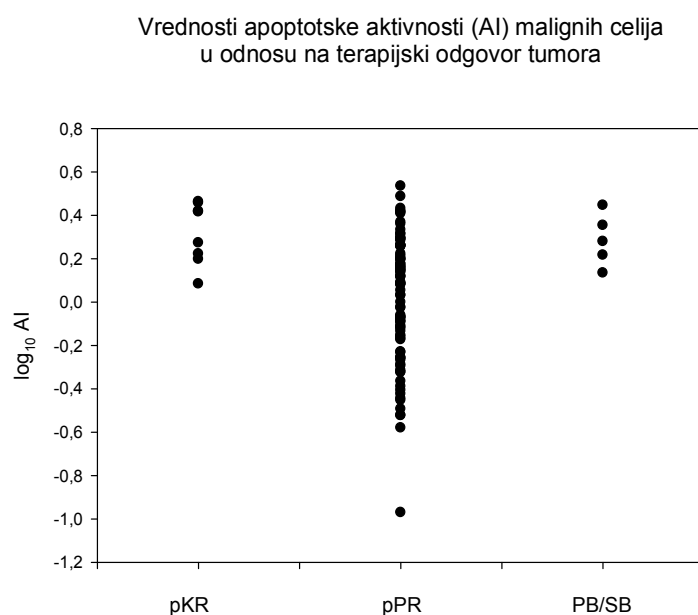
Utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između vrednosti Ki-67 indeksa i terapijskog odgovora tumora ($p = 0.0001$), u smislu da su niže vrednosti proliferativnog Ki-67 indeksa povezane sa većom verovatnoćom izostanka patološke regresije tumora - nastankom progresije/stabilne bolesti na dejstvo hemioterapije. Analiza je pokazala sličnu negativnu povezanost vrednosti indeksa rasta tumora sa terapijskim odgovorom tumora ($p = 0.008$). Nije nađena značajna povezanost vrednosti AI i terapijskog odgovora tumora ($p = 0.29$).

Analizom vrednosti p53 i bcl-2 proteina, kao i vrednosti steroidnih receptora (ER α i PR) određenih biohemijskom metodom, nije nađena povezanost sa različitim terapijskim odgovorom karcinoma dojke na dejstvo citotoksične terapije.



Slika IV.3.2.1. Grafički prikaz distribucije Ki-67 indeksa u pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora.

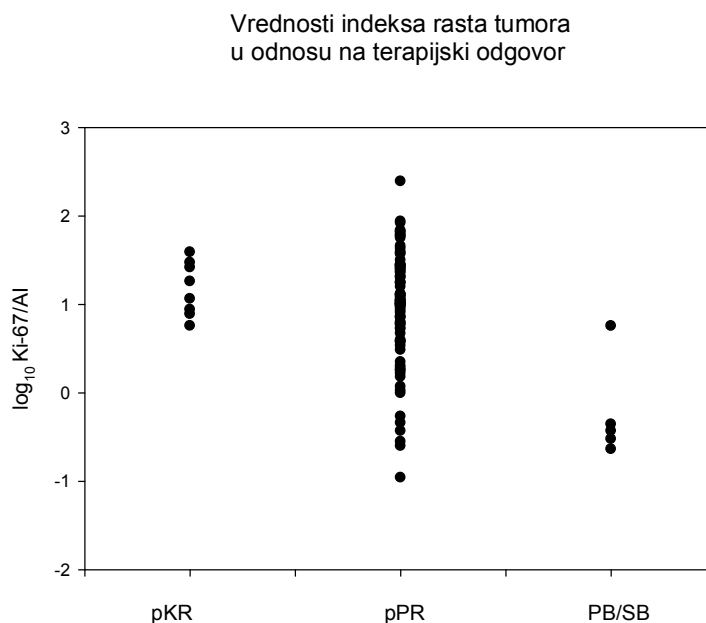
Zapaža se suprotna distribucija vrednosti Ki-67 indeksa koje odgovaraju tumorima dijametralno različite osetljivosti na dejstvo hemioterapije (pKR vs. PB/SB, Slika IV.3.2.1.). Aproksimativno, vrednost od 10 % za Ki-67 indeks ($\log_{10}(10) = 1$) predstavlja graničnu vrednost pri čemu niže vrednosti ($Ki-67 < 10\%$) mogu označavati nisko proliferativne tumore sa mogućnošću pojave rezistencije na dejstvo hemioterapije. Rigorozna granična vrednost od 1% za Ki-67 indeks ($\log_{10}(0.01) = -2$) koja označava izrazito niske vrednosti ovog biomarkera, na granici detektabilnosti, ukazuje na pojavu izostanka terapijskog odgovora tumora. Obrnuto, granična vrednost $Ki-67 \geq 10\%$ ukazuje na visoko proliferativne tumore sa mogućnošću pojave kompletne patološke regresije tumora na dejstvo hemioterapije.



Slika IV.3.2.2. Grafički prikaz distribucije AI u pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora.

Vrednosti AI su slične distribucije u tumorima dijametralno različite hemio-osetljivosti; tumori sa kompletnom patološkom regresijom (pKR) u poređenju sa tumorima koji pokazuju progresiju/stabilnu bolest (PB/SB) na delovanje hemioterapije (Sl.IV.3.2.2.). Grafički prikaz vrednosti indeksa rasta tumora u pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora (Sl. IV.3.2.3.), u pacijentkinja čiji su tumori suprotne hemio-osetljivosti (pKR vs. PB/SB) sličan je distribuciji vrednosti Ki-67 indeksa. Sa obzirom na to da nije utvrđena povezanost AI i terapijskog odgovora tumora ($p = 0.29$), a indeks

rasta je definisan kao količnik vrednosti proliferativnog i apoptotskog indeksa (KI-67/AI), indirektno se može zaključiti da su vrednosti Ki-67 od dominantnog uticaja na vrednosti indeksa rasta tumora. S tim u vezi, razlika u distribuciji vrednosti indeksa rasta između osetljivih (kPR) i rezistentnih (PB/SB) tumora prevashodno je posledica vrednosti proliferativnog (Ki-67) indeksa.



Slika IV.3.2.3. Grafički prikaz distribucije indeksa rasta u pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora.

IV.4. Analiza varijabilnosti (heterogenosti) vrednosti biomarkera između (pod)grupa pacijentkinja sa različitim odgovorom karcinoma dojke na hemioterapiju (Mann – Whitney's U Test, test sume rangova)

Analiza varijabilnosti vrednosti biomarkera između (pod)grupa pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom karcinoma dojke na dejstvo hemioterapije bila je moguća **u okviru pre-terapijskih vrednosti**; pacijentkinje u kojih je klinički procenjena progresija/stabilna bolest ne moraju biti podesne za operativno lečenje, a u tkivnom uzorku pacijentkinja sa kompletnom patološkom regresijom nisu prisutne invazivne maligne ćelije karcinoma dojke.

Tabela IV.4.1. Rezultati analize varijabilnosti vrednosti biomarkera pre terapije, između pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora: pPR, pKR i pacijentkinje sa PB/SB.

Biomarker	Upoređene podgrupe pacijentkinja	Broj pacijentkinja	<i>p</i>	Medijana poređenih pogrupa	IK opseg (25% - 75%)
p53	pRB vs. kPR	93 vs. 8	0.044	0 vs. 23.56	(0 -16.84) vs. (2.50-57.22)
	pRB vs. PB/SB	93 vs.5	0.55	0 vs. 2.76	(0 - 16.84) vs. (0 - 21.66)
	kPR vs. PB/SB	8 vs. 5	0.35	23.56 vs. 2.76	(2.50-57.22) vs. (0 - 21.66)
bcl-2	pRB vs. kPR	85 vs. 8	0.016	1.74 vs. 0.28	(0.94-2.58) vs. (0.18-1.15)
	pRB vs. PB/SB	85 vs. 5	0.13	1.74 vs. 0.70	(0.94-2.58) vs. (0.26 – 1.50)
	kPR vs. PB/SB	8 vs. 5	0.52	0.28 vs. 0.70	(0.18-1.15) vs. (0.26 – 1.50)
Ki-67	pRB vs. kPR	92 vs. 8	0.008	14.68 vs. 34.77	(5.23-23.86) vs. (18.24-59.94)
	pRB vs. PB/SB	92 vs. 5	0.010	14.68 vs. 0.70	(5.23-23.86) vs. (0.46-4.13)
	kPR vs. PB/SB	8 vs. 5	0.003	34.77 vs. 0.70	(18.24-59.94) vs. (0.46-4.13)
AI	pRB vs. kPR	92 vs. 8	0.002	1.207 vs. 2.239	(0.674-1.736) vs. (1.621-2.744)
	pRB vs. PB/SB	92 vs. 5	0.025	1.207 vs. 1.901	(0.674-1.736) vs. (1.575-2.391)
	kPR vs. PB/SB	8 vs. 5	0.72	2.239 vs. 1.901	(1.621-2.744) vs. (1.575-2.391)
indeks rasta (Ki-67/AI)	pRB vs. kPR	92 vs. 8	0.38	10.39 vs. 14.84	(3.90-25.21) vs. (8.25-27.84)
	pRB vs. PB/SB	92 vs. 5	0.003	10.39 vs. 0.37	(3.90-25.21) vs. (0.28-1.75)
	kPR vs. PB/SB	8 vs. 5	0.002	14.84 vs. 0.37	(8.25-27.84) vs. (0.28-1.75)

Napomena: tabela sadrži sledeće podatke:

- (Pod)grupe pacijentkinja koje su analizirane i odgovarajući broj pacijentkinja (*n*, veličina uzorka);
- *p* vrednost koja pokazuje stepen verovatnoće kojim utvrđena razlika između medijalnih vrednosti dve analizirane (pod)grupe može predstavljati slučajnost u varijabilitetu ispitivanih vrednosti;
- Medijana kao srednja vrednost biomarkera u okviru analiziranih (pod)grupa i vrednosti biomarkera koje odgovaraju 25% - 75 % opsegu (interkvartilni opseg), IK opseg u daljem tekstu.

P53 protein: Analizom varijabilnosti p53 proteina dobijena je statistički značajna razlika ($p = 0.044$) u distribuciji vrednosti p53 u rezidualnim tumorima u poređenju sa tumorima koji pokazuju kompletnu patološku regresiju. Vrednosti medijane (Med 23.56) i interkvartilnog opsega (IK opseg; 2.50 - 57.22) su značajno viši u (pod)grupi pacijentkinja sa kompletnom regresijom tumora (pKR). Nije utvrđen statistički značajan varijabilitet vrednosti p53 između (pod)grupa pacijentkinja sa pKR i PB/SB ($p = 0.35$); ipak, vrednosti Med (23.56 vs. 2.76) i IK opsega (2.50 - 57.22 vs. 0 - 21.66) p53

proteina u ovim tumorima očigledno su različite. Relativno mali broj pacijentkinja uključenih u analizu može imati uticaja na statističku „snagu“ primenjenog testa. Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji vrednosti p53 u pacijentkinja sa progresijom bolesti (PB/SB) u odnosu na pacijentkinje sa rezidualnim tumorom na delovanje hemioterapije (pPR).

Bcl-2 protein: Statistički značajna razlika u varijabilnosti vrednosti bcl-2 proteina utvrđena je između (pod)grupa pacijentkinja sa rezidualnom bolešću i sa kompletnom patološkom regresijom (pPR vs. pKR), ($p = 0.016$). Pre-terapijske vrednosti bcl-2 su značajno niže (Med 0.28; IK opseg, 0.18 - 1.15) u tumorima u kojih je pod uticajem hemioterapije nastala kompletna patološka regresija (kPR). Nije utvrđena značajna razlika u distribuciji vrednosti bcl-2 između pacijentkinja sa PB/SB i sa pPR na dejstvo hemioterapije ($p = 0.13$). Mali uzorak pacijentkinja sa progresijom bolesti ($N = 5$), pri čemu su vrednosti bcl-2 (Med 0.70; IK opseg, 0.26 - 1.50) vidljivo niže u odnosu na te vrednosti u rezidualnim tumorima (Med 1.74; IK opseg, 0.94 - 2.58), ukazuju na obazrivu interpretaciju nepostojanja statističke značajnosti između poređenih (pod)grupa. Nije dobijena značajna razlika u varijabilitetu vrednosti bcl-2 proteina između (pod)grupa pacijentkinja sa dijametralno različitim terapijskim odgovorom, odnosno, između pacijentkinja u kojih je bolest progredirala/stabilna na dejstvo hemioterapije i pacijentkinja sa kompletnom patološkom regresijom tumora (PB/SB vs. pKR, $p = 0.52$).

Ki-67 indeks: Vrednosti Ki-67 indeksa statistički se značajno razlikuju između ispitivanih (pod)grupa pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora na dejstvo hemioterapije. Najviše pre-terapijske vrednosti su detektovane u pacijentkinja sa kompletnom patološkom regresijom tumora (Med 34.77; IK opseg, 18.24 - 59.94), posebno u poređenju sa (pod)grupom pacijentkinja sa tumorima suprotne hemio-osetljivosti (PB/SB, $p = 0.003$), u kojima su detektovane najniže vrednosti Ki-67 indeksa (Med 0.70; IK opseg, 0.46 - 4.13). U pacijentkinja sa rezidualnim tumorom posle hemioterapije vrednosti Ki-67 su „intermedijarne“ (Med 14.68; IK, 5.23 - 23.86), ali značajno različite i u odnosu na (pod)grupu pacijentkinja sa kPR ($p = 0.002$) i u odnosu na pacijentkinje sa PB/SB ($p = 0.025$).

AI: Analiza vrednosti apoptotskog indeksa (AI) pokazala je statistički značajnu razliku u distribuciji vrednosti u pacijentkinja sa rezidualnim tumorom u poređenju sa (pod)

grupom pacijentkinja sa pKR ($p = 0.002$) i sa pacijentkinjama u kojih je nastala progresija bolesti ($p = 0.025$) u toku primene hemioterapije. Pre-terapijske vrednosti AI su značajno niže u pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora - pPR (Med 1.207; IK, 0.674 - 1.736) u odnosu na više vrednosti AI u pacijentkinja sa pKR (Med 2.239; IK, 1.621 - 2.744) i sa PB/SB (Med 1.901; IK, 1.575 - 2.391). Između tumora dijametralno različite hemio-osetljivosti (pKR vs. PB/SB) nije nađena razlika u distribuciji vrednosti ovog biomarkera ($p = 0.72$).

Indeks rasta tumora (Ki-67/AI): Utvrđen je statistički značajan varijabilitet vrednosti ovog parametra između tumora dijametralno različite hemio-osetljivosti; između pacijentkinja sa pKR i pacijentkinja sa PB/SB ($p = 0.002$). Vrednosti indeksa rasta tumora u pacijentkinja sa PB/SB (Med 0.37; IK, 0.28 - 1.75) su značajno niže u poređenju sa (pod)grupom pacijentkinja sa pKR (Med 14.84; IK, 8.25 - 27.84). Vrednosti indeksa rasta tumora koji pokazuju progresiju (PB/SB) su značajno niže ($p = 0.003$) u odnosu na vrednosti u tumorima sa parcijalnom regresijom na dejstvo hemioterapije - pPR (Med 10.39; IK, 3.90 - 25.21). Međutim, nije utvrđena statistički značajna razlika u varijabilitetu vrednosti između (pod)grupe pacijentkinja sa pPR u poređenju sa pacijentkinjama sa pKR pod uticajem hemioterapije ($p = 0.38$). Vrednosti medijane i IK opsega ovog parametra slične su u pacijentkinja čiji su tumori ispoljili merljiv terapijski odgovor na dejstvo citotoksičnih lekova - pPR vs. pKR (Med, 10.39 vs. 14.84; IK opseg, 3.90 – 25.21 vs. 8.25 – 27.84). Izdvajaju se značajno niže pre-terapijske vrednosti indeksa rasta tumora u pacijentkinja sa progresijom bolesti pod uticajem citotoksičnih lekova (Med 0.37; IK opseg, 0.28 - 1.75).

IV.5. Analiza promene vrednosti biomarkera na delovanje hemioterapije

IV.5.I. Analiza varijabilnosti (promene) vrednosti biomarkera pod uticajem hemioterapije (*Wilcoxon-ov signed rank test/test ekvivalentnih parova*)

Analiza varijabilnosti, promene vrednosti biomarkera na dejstvo citotoksičnih lekova (promena post-terapijskih, rezidualnih vrednosti u odnosu na „bazične“ pre-terapijske vrednosti) bila je moguća u (pod)grupi pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora (pPR).

Tabela IV.5.I.1. Rezultati analize promene vrednosti biomarkera pod uticajem hemioterapije – pacijentkinje sa patološkom parcijalnom regresijom tumora (pPR).

<i>Biomarker</i>		<i>Pre - th</i>	<i>Posle - th</i>	<i>p</i>
p53	Medijana	0	0	0,10
	opseg (25%-75%)	0 - 16.84	0 - 28.23	
	n	93	93	
bcl-2	Medijana	1,74	1,69	0,62
	opseg (25%-75%)	0.94 - 2.56	0.83 - 2.70	
	n	85	85	
Ki-67	Medijana	14,68	5,21	p < 0.001
	opseg (25%-75%)	5.23 - 23.86	1.60 - 13.34	
	n	92	92	
AI	Medijana	1,207	0,827	0,035
	opseg (25%-75%)	0.674 - 1.736	0.504 - 1.263	
	n	92	90	
Ki-67/AI	Medijana	10,39	8,22	0,008
	opseg (25%-75%)	3.90 - 25.21	2.29 - 14.94	
	n	92	90	

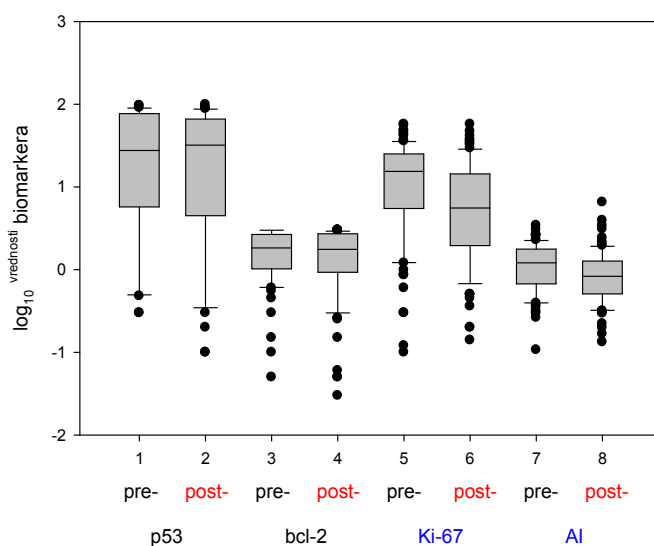
Ki-67 indeks: Utvrđena je statistički značajna promena vrednosti Ki-67 indeksa pod uticajem hemioterapije (Tabela IV.5.I.1. $p < 0.001$). Post-terapijske vrednosti Ki-67 u rezidualnoj populaciji malignih ćelija tumora (Med 5.21; IK opseg, 1.60 - 13.34) su značajno niže u poređenju sa početnim, pre-terapijskim vrednostima (Med 14.68; IK opseg, 5.23 - 23.86). Medijana Ki-67 indeksa snižena je od vrednosti 14.68 (IK, 5.23 – 23.86) do vrednosti 5.21 (1.60 – 13.34). Razlika između početne i rezidualne vrednosti pokazuje sniženje Ki-67 indeksa u 64 (70%) uzoraka pri čemu je medijalno sniženje 12.87 (IK opseg, 4.50 - 18.38, od 0.1 do 46.14). Porast rezidualnih vrednosti Ki-67 indeksa utvrđen je u 28 (30%) pacijentkinja (Med 6.26; IK opseg, 1.83 – 10.97).

AI: Analizom varijabiliteta vrednosti AI pod uticajem hemioterapije dobijeno je statistički značajno sniženje post-terapijskih vrednosti u poređenju sa pre-terapijskim (Tabela IV.5.I.1. $p = 0.035$). Rezidualne vrednosti AI su snižene pri čemu je medijalna vrednost 0.827 (IK opseg, 0.504 - 1.263) u poređenju sa višim vrednostima pre terapije

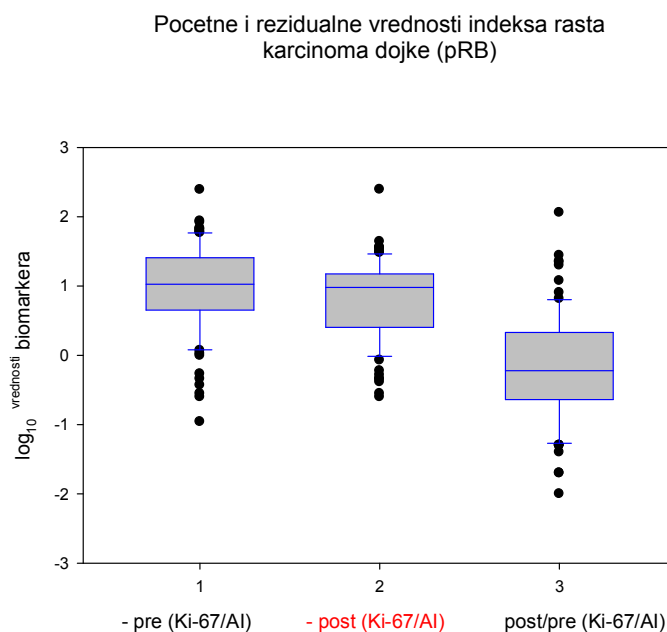
(Med 1.207; IK opseg, 0.674 – 1.736). Sniženje vrednosti AI pod uticajem hemioterapije je utvrđeno u 52 (58%) pacijentkinja, a medijana sniženja je 0.636 (IK opseg, 0.222 – 1.148, opseg 0.001 - 2.429). U 37 (41%) pacijentkinja utvrđen je porast vrednosti AI posle terapije u rezidualnom tumoru (Med 0.377; IK opseg, 0.158 – 0.734, opseg 0.002 - 4.194).

Indeks rasta tumora (Ki-67/AI): Analizom varijabilnosti vrednosti ovog parametra pod uticajem hemioterapije utvrđeno je statistički značajno sniženje (Tabela IV.5.I.1. $p = 0.008$). Vrednosti indeksa rasta su značajno niže u rezidualnom tumoru posle hemioterapije sa vrednošću medijane od 8.22 (IK opseg, 2.29 - 14.94) u odnosu na pre-terapijske vrednosti (Med 10.39; IK opseg, 3.90 - 25.21). Sniženje vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora utvrđeno je u 54 (61%) pacijentkinja pri čemu je medijalna vrednost sniženja 11.4 (IK, 4.44 - 26.83, opseg 0.09 - 233.05). Porast vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora je ustanovljen u 35 (39%) pacijentkinja sa medijanom porasta ovog parametra od 8.36 (IK opseg, 4.81 - 13.84, opseg 0.17 - 239.04).

Pocetne, preterapijske (pre-) i rezidualne (post-) vrednosti biomarkera, u grupi pacijentkinja sa rezidualnom bolescu.



Slika IV.5.I.1. Grafički prikaz vrednosti biomarkera (p53, bcl-2, Ki-67 i AI) - Medijana i interkvartilni opseg (25% - 75%) prikazani su u okviru osenčenog pravougaonika, a vrednosti koje odgovaraju 10% i 90% vrednostima prikazane su na graničnim linijama greške.



Slika IV.5.I.2. Grafički prikaz vrednosti indeksa rasta tumora (Ki-67/AI) u netretiranim tumorima (pre-) i posle hemioterapije (post-) i procentualna promena vrednosti indeksa rasta (Post-/Pre- Ki-67/AI).

Nije utvrđen statistički značajan varijabilitet vrednosti p53 i bcl-2 proteina (Tabela IV.4.I.1.) pod uticajem hemioterapije. Promena rezidualnih vrednosti u poređenju sa vrednostima pre terapije, u statističkom smislu, nije dovoljno izražena da bi bilo moguće isključiti pojavu slučajne izmene vrednosti nezavisno od delovanja terapije.

IV.5.II. Analiza varijabilnosti biomarkera pod uticajem hemioterapije, označena kao procentualna ili relativna promena vrednosti

Izračunavanje promene vrednosti biomarkera pod uticajem hemioterapije, označena kao procentualna ili relativna promena vrednosti, definiše se na sledeći način:

- **Procentualna promena vrednosti** označava srazmeran udeo post-terapijske, rezidualne vrednosti u odnosu na početnu, preterapijsku vrednost. Izračunava se kao količnik rezidualne vrednosti sa početnom vrednošću (*Post/Pre*);
- **Relativna promena vrednosti** predstavlja količnik, razlike između rezidualne (post-) i početne (pre-terapijske) vrednosti sa početnom (pre-terapijskom) vrednošću (*Post-Pre/Pre*).

Promena vrednosti biomarkera pod uticajem hemioterapije, na osnovu literaturnih podataka, može se analizirati kao procentualna ili relativna promena vrednosti. U osnovi se radi o različitom numeričkom prikazivanju **smera** (sniženje ili porast) i **stepena** (udela) izmenjenih rezidualnih (post-terapijskih) vrednosti biomarkera u odnosu na njihovu početnu (preterapijsku vrednost).

Tabela IV.5.II.1. Distribucija procentualne/relativne promene vrednosti biomarkera pod uticajem hemioterapije.

	<i>Biomarker</i>	<i>n (%)</i>	<i>Medijana</i>	<i>Interkvartilni opseg (25%-75%)</i>	<i>opseg (min - max)</i>
<i>Procentualna promena</i>	↑ p53	28 (30)	1,10	0 - 2.29	0 - 10.5
	↓ p53	20 (22)	0,44	0.10 - 0.68	0 - 0.99
	↔ p53	45 (48)			
<i>Relativna promena</i>	↑ p53	28	0,10	0 - 1.29	0 - 9.50
	↓ p53	20	-0,57	od -0.91 do - 0.33	od -1.00 do - 0.01
	↔ p53	45			
<i>Procentualna promena</i>	↑ bcl-2	31 (36)	1,52	1,11 - 2.00	0 - 12.33
	↓ bcl-2	48 (57)	0,76	0.31 - 0.93	0 - 0.99
	↔ bcl-2	6 (7)			
<i>Relativna promena</i>	↑ bcl-2	31	0,52	0.12 - 1.06	0 - 11.33
	↓ bcl-2	48	-0,24	od -0.24 do -0.07	od -1 do -0.005
	↔ bcl-2	6			

Vrednosti p53 proteina i bcl-2 ne pokazuju značajnu promenu. Imunohistohemijska detekcija p53 i bcl-2 molekula jeste stabilan fenotip pod uticajem citotoksičnih lekova.

Nastavak Tabele IV.5.II.1. Distribucija procentualne/relativne promene vrednosti biomarkera pod uticajem hemioterapije.

	Biomarker	n (%)	Medijana	Interkvartalni opseg (25%-75%)	opseg min - max
Procentualna promena	↑ Ki-67	25 (27)	2,3	1.50 - 4.17	0 - 33.23
	↓ Ki-67	67 (73)	0,28	0.10 - 0.50	0 - 0.95
	↔ Ki-67	∅			
Relativna promena	↑ Ki-67	25	1,3	0.50 - 3.17	0 - 32.23
	↓ Ki-67	67	-0,72	min -0.5 - max -0.9	
	↔ Ki-67	∅			
Procentualna promena	↑ AI	38 (43)	1,47	1.20 - 1.83	1.00 - 9.59
	↓ AI	51 (57)	0,52	0.30 - 0.72	0 - 0.99
	↔ AI	∅			
Relativna promena	↑ AI	38	0,47	0.20 - 0.83	0.003 - 8.59
	↓ AI	51	-0,48	min -0.28 - max -0.70	min -0.01 - max -1
	↔ AI	∅			
Procentualna promena	↑ indeks rasta	32 (36)	2,35	1.60 - 5.81	1.19 - 114.55
	↓	57 (64)	0,25	0.05 - 0.51	0 - 0.97
	↔	∅			
Relativna promena	↑ indeks rasta	32	1,35	0.60 - 4.81	0.19 - 113.5
	↓	57	-0,75	min -0.49 - max -0.95	min -0.03 - max -1.46
	↔	∅			

↑ porast vrednosti; ↓ sniženje vrednosti; ↔ neizmenjena vrednost; ∅ promene nisu detektovane; n (%) – broj uzoraka sa izmenjenim vrednostima u odgovarajućem smeru;

Ki-67 indeks: na osnovu procentualno/relativne promene vrednosti Ki-67 indeksa utvrđena je promena u smeru sniženja u 67 (73%) pacijentkinja (Tabela IV.5.II.1) pri čemu dobijeni rezultati pokazuju sledeće: analiza relativne promene vrednosti Ki-67 ukazuje da je medijalno sniženje 0.72 (IK opseg, min od -0.5 max do -0.9). U rezidualnim uzorcima tumora su vrednosti Ki-67 „prosečno“ (Med) snižene za 0.72 „dela“ u odnosu na odgovarajuće vrednosti pre terapije (interkvartalni opseg pokazuje da su vrednosti snižene za 0.5 do 0.9 dela). Različito u načinu numeričkog prikazivanja podataka, procentualna promena vrednosti pokazuje da u situaciji sniženja vrednosti, medijana sniženih rezidualnih vrednosti Ki-67 čini 0.28 deo analognih vrednosti pre terapije (IK opseg, 0.10 – 0.50), čini 28% odgovarajućih pre-terapijskih vrednosti (IK opseg od 10% do 50%). Analizom promene vrednosti Ki-67 u okviru odgovarajućih

intervala (Tabela IV.5.II.2.), utvrđeno je da se sniženje vrednosti Ki-67 indeksa veće od 75 % detektuje najčešće, u 46 % tumora. U 25 (27%) pacijentkinja utvrđen je porast Ki-67 indeksa (Tabela IV.5.II.1.), pri čemu je medijalni porast vrednosti 1.3 (IK, 1.50 - 4.17), povišene vrednosti Ki-67 u rezidualnim tumorima su „prosečno“ za 1.3 puta više u odnosu na analogne preterapijske vrednosti (u IK opsegu za 1.50 do 4.17 „puta“ više). Sa najvećom učestalošću, u 56% tumora, porast vrednosti Ki-67 indeksa je veći od 100% (Tabela IV.5.II.2)

Tabela IV.5.II.2. Učestalost izmenjenih vrednosti (relativno/procentualna promena) biomakera pod uticajem hemioterapije, a u okviru rastućih intervala izraženih u procentima.

<i>Indeks rasta tumora</i>	KI-67	AI	Indeks rasta tumora
↓ SNIŽENJE vrednosti (%)	broj uzoraka, n (%)		
-100 do -75	31 (46)	9 (18)	27 (48)
-75 do -50	18 (27)	12 (23)	14 (25)
-50 do -25	11 (16)	19 (37)	9 (16)
-25 do 0	7 (11)	11 (22)	7 (11)
Suma	67(100)	51(100)	57(100)
↑ PORAST vrednosti (%)	broj uzoraka, n (%)		
0 do 25	4 (16)	11 (29)	3 (9)
25 do 50	1 (4)	10 (26)	4 (21)
50 do 100	6 (24)	9 (24)	6 (21)
više od 100	14 (56)	8 (21)	19 (58)
Suma	25(100)	38(100)	32(100)
N	92	89	89

AI: analiza promene vrednosti AI pokazala je da se u 51 (57 %) tumora detektuje „prosečno“ sniženje od 0.48 dela u odnosu na vrednosti pre terapije (IK opseg, min od -0.28 do max -0.70); medijana sniženih rezidualnih vrednosti AI iznosi 0.52 dela, čini 52 % (IK opseg, 30 - 72 %) odgovarajućih pre-terapijskih vrednosti (Tabela IV.5.II.1.). Sniženje vrednosti AI sa nešto većom učestalošću, od 37 % utvrđeno je u intervalu sniženja od 25% do 50 %, a sniženje veće od 50 % detektuje se u 48 % tumorskih

uzoraka (Tabela IV.5.II.2.). U 38 (43%) pacijentkinja utvrđen je porast vrednosti AI, pri čemu medijana povišenih vrednosti odgovara 0.47 „delu“ pre-terapijskih vrednosti (IK opseg, 0.20 - 0.83); rezidualne vrednosti AI su prosečno povišene za približno jednu polovinu (0.47) u odnosu na analogne pre-terapijske vrednosti. Procentualna analiza pokazala je da su povišene rezidualne vrednosti AI „prosečno“ (Med) 1.47 „puta“ više u odnosu na odgovarajuće početne vrednosti (IK opseg, 1.20 – 1.83). Analiza je pokazala i približno, ravnomeran porast vrednosti AI u okviru analiziranih kvartalnih intervala (Tabela IV.5.II.2.).

Indeks rasta tumora: analiza relativno/procentualne promene indeksa rasta tumora pokazala je da se sniženje rezidualnih vrednosti detektuje u 57 (64%) pacijentkinja. Vrednosti relativnog sniženja indeksa rasta obuhvataju opseg sniženja od min 0.49 do max 0.95 „delova“ od analognih početnih vrednosti sa medijalnim sniženjem od 0.75 „dela“; medijalna vrednost indeksa rasta rezidualnog tumora čini 25 % analognih početnih vrednosti u situaciji sniženja pod uticajem hemioterapije (IK opseg od 5 % do 51 %) na osnovu procentualne promene vrednosti, Tabela IV.5.II.1. U situaciji sniženja vrednosti indeksa rasta u 27 (48%), približno u polovini slučajeva, vrednosti su snižene za više od 75%, a u 73 % uzoraka snižene su za više od 50 % (Tabela IV.5.II.2.). Porast vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora utvrđen je u 32 (36%), pri čemu je „prosečna“, medijalna vrednost porasta 1.35 (IK, 0.60 do 4.81); povišene vrednosti su „prosečno“ više 1.35 „puta“ u odnosu na analogne pre-terapijske vrednosti, Tabela IV.5.II.1. Analiza procentualne promene vrednosti indeksa rasta označava parametar IR (Tabela IV.1.2.). U situaciji porasta indeksa rasta „prosečno“ (medijana) povećanje iznosi 2.35 „puta“ (IK opseg, od 1.60 do 5.81). Analiza promene vrednosti indeksa rasta u okviru pojedinih intervala (Tabela IV.5.II.2.) pokazuje da je najzastupljeniji porast za više od 100% u odnosu na pre-terapijske nivoe, u 58 % uzoraka.

Značajan je rezultat da u situaciji porasta Ki-67 indeksa u 27 % tumora i sniženja AI u 57 % tumora, porast vrednosti indeksa rasta je utvrđen u 37 % slučajeva. Suprotno tome, sniženje vrednosti Ki-67 u 73 %, a porast AI u 43 % tumora praćen je nalazom sniženja indeksa rasta u 63 % rezidualnih tumora.

Tabela IV.5.II.3. Analiza varijabilnosti vrednosti p53 i bcl-2 između (pod)grupa - kategorija tumora sa sniženim i povišenim vrednostima indeksa rasta na dejstvo hemioterapije, pacijentkinje sa pPR (*Mann – Whitney's U Test, test sume rangova*).

<i>INDEKS RASTA TUMORA</i>				
<i>Biomarker</i>	↓ sniženje vrednosti	vs.	↑ porast vrednosti	p
p53	n = 57		n = 32	
	Pre-		Pre-	0.91
	Post-		Post-	0.7
	Procentualna promena		Procentualna promena	0.72
	Relativna promena		Relativna promena	0.54
bcl-2	n = 53		n = 28	
	Pre-		Pre-	0.64
	Post-		Post-	0.71
	Procentualna promena		Procentualna promena	0.09
	Relativna promena		Relativna promena	0.026

P53 protein: Varijabilitet vrednosti p53 u odnosu na tumore sa promenom (porast vs. sniženje) indeksa rasta pod uticajem hemioterapije nije utvrđen, i u situaciji analize pre-terapijskih i u situaciji analize post-terapijskih vrednosti.

Bcl-2 protein: Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji vrednosti koje pokazuju relativnu promenu vrednosti bcl-2 pod uticajem hemioterapije između kategorija koje su formirane na osnovu sniženja i porasta indeksa rasta rezidualnog tumora ($p = 0.026$).

Vrednosti medijane i IK opsega relativne promene bcl-2 proteina za tumore koji pokazuju sniženje vrednosti indeksa rasta iznose (Med -0.05; IK opseg, od -0.43 do 0.0) u poređenju sa takvim vrednostima (Med 0; IK opseg, od -0.09 do 0.67) u tumorima sa porastom indeksa rasta posle terapije. S tim u vezi, u situaciji sniženja indeksa rasta rezidualnog tumora ekspresija bcl-2 gena pokazuje izrazitije sniženje rezidualnih vrednosti u odnosu na početne vrednosti pre terapije.

Tabela IV.5.II.4. Povezanost između p53 i bcl-2 proteina na nivou pre-terapijskih i rezidualnih vrednosti, kao i između vrednosti koje označavaju njihovu procentualnu / relativnu promenu, a u okviru pojedine „kategorije“ tumora sa sniženim ili povišenim vrednostima ideksa rasta (Spearman-ov test rang korelacije).

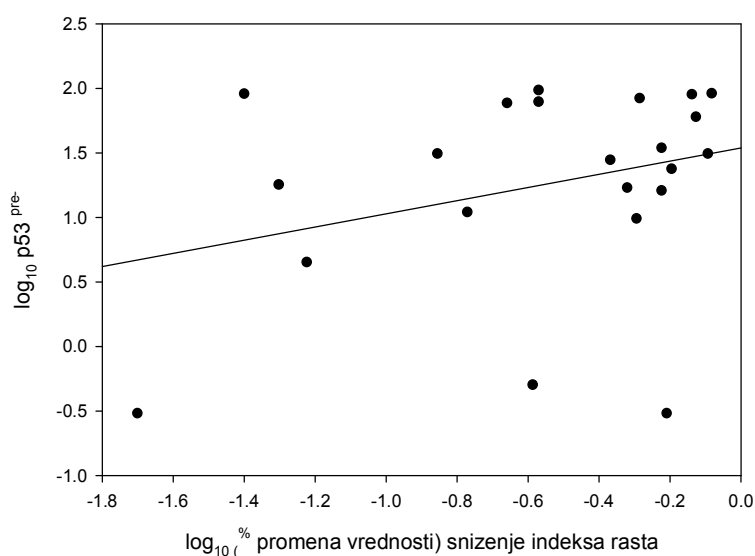
<i>INDEKS RASTA TUMORA</i>				
↓ sniženje vrednosti n = 57		p	↑ porast vrednosti n = 32	
			n	p
pre p53 vs. pre bcl-2		0,25	pre p53 vs. pre bcl-2	0,95
post p53 vs. post bcl-2		0,98	post p53 vs. post bcl-2	0,11
procentualna promena			procentualna promena	
p53 vs. bcl-2		0,09	p53 vs. bcl-2	0,42
relativna promena			relativna promena	
p53 vs. bcl-2		0,59	p53 vs. bcl-2	0,08

U situaciji sniženja ili porasta vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora nije utvrđena statistički značajna povezanost p53 i bcl-2 proteina i u situaciji analize vrednosti pre i posle hemioterapije ili analizom vrednosti koje pokazuju njihovu relativno/procentualnu promenu pod uticajem hemioterapije.

Tabela IV.5.II.5. Povezanost vrednosti p53 i bcl-2 proteina sa vrednostima koje pokazuju procentualnu (%) promenu indeksa rasta tumora u smeru sniženja ili porasta pod uticajem hemioterapije (Spearman-ov test rang korelacije).

<i>Biomarker</i>		<i>INDEKS RASTA TUMORA</i>		
			↓sniženje vrednosti	↑ porast vrednosti
p 53	Pre-	ρ	0.308	0.203
		p	0.02	0.26
		n	57	32
	Post-	ρ	0.225	0.324
		p	0.09	0.07
		n	57	32
bcl-2	Pre-	ρ	-0.048	-0.3361
		p	0.73	0.06
		n	53	28
	Post-	ρ	-0.219	-0.256
		p	0.11	0.19
		n	53	28

Snizenje indeksa rasta rez.tu. (% promena vrednosti) vs. (^{pre-} p53
(p = 0.02)



Slika IV.5.II.1. Grafički prikaz korelacije p53 pre terapije i vrednosti procentualne promene indeksa rasta (Ki-67/AI) koje ukazuju na sniženje ovog parametra posle hemioterapije u pacijentkinja sa pPR.

Utvrđena je statistički značajna **pozitivna** korelacija između pre-terapijskih vrednosti p53 proteina i vrednosti procentualne (%) promene indeksa rasta tumora u smeru sniženja ovog parametra pod uticajem hemioterapije (p = 0.02, Tabela IV.5.II.5.). Više vrednosti p53 proteina pre terapije povezane su sa manjim stepenom sniženja vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora.

IV.6. Kvalitativna analiza - analiza biomarkera u okviru statusa : pozitivan (+)/negativan (-)

Tabela IV.6.1. Relevantne vrednosti biomarkera u studiji (netretirani tumori).

Biomarker	N	Medijana	Opseg vrednosti (min-max)	IK opseg (25%-75%)
p53	106	0.00	0 - 96.72	0 - 16.91
Bcl-2	98	1.58	0 - 3	0.72 - 2.52
Ki-67	106	14.68	0 - 72.75	5.18 - 24.72
AI	105	1.314	0.107 - 3.426	0.734 - 1.818
Ki-67/AI	105	10.2	0 - 245.87	3.84 - 24.88

Na osnovu Medijane svih vrednosti u analizi, pre započinjanja terapije (grupe pacijentkinja u studiji) koja je primenjena kao granična vrednost, određen je **status** biomarkera: *pozitivan* se određuje prema vrednostima većim ili jednakim (\geq) graničnoj vrednosti i označava „*prisustvo*“ biomarkera; *negativan* status - „*odsustvo*“ biomarkera, odgovara vrednostima manjim ($<$) od granične vrednosti.

Sa obzirom na to da je medijalna vrednost p53 proteina jednaka 0 i predstavlja graničnu vrednost za određivanje statusa, imunodetekcija p53 proteina u malignim ćelijama karcinoma dojke ma kog stepena označava pozitivan status ovog biomarkera.

Tabela IV.6.2. Učestalost (distribucija) statusa biomarkera (pozitivan (+) / negativan (-)) na nivou pre-terapijskih vrednosti u okviru (pod)grupa pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom karcinoma dojke na dejstvo hemioterapije.

(Pod) grupa	N	Status biomarkera									
		p53 n (%)		bcl-2 n (%)		Ki-67 n (%)		AI n (%)		Ki-67/AI n (%)	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
sve vr.		46 (43)	60 (57)	49 (50)	49 (50)	54 (51)	52 (49)	53 (50)	52 (50)	53 (50)	52 (50)
pRB	93	37 (40)	56 (60)	46 (54)	39 (46)	48 (52)	45 (48)	41 (45)	51 (55)	48 (52)	44 (48)
kPR	8	6 (25)	2 (75)	2 (25)	6 (75)	6 (75)	2 (25)	7 (88)	1 (12)	5 (63)	3 (37)
PB(SB)	5	3 (40)	2 (60)	1 (20)	4 (80)	0	5 (100)	5 (100)	0	0	5 (100)
N		106		98		106		105		105	

(Pod)grupu pacijentkinja sa klinički procenjenom progresijom/stabilnom bolešću pod uticajem hemioterapije (PB/SB) karakteriše negativan status Ki-67 indeksa i pozitivan status AI sa nalazom negativnog statusa indeksa rasta karcinoma dojke pre primene hemioterapije.

Tabela IV.6.3. Status steroidnih receptora u odnosu na grupe pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom.

(Pod)grupa	n	Status biomarkera			
		ER n (%)		PR n (%)	
		+	-	+	-
pRB	79	43 (54)	36 (46)	22 (28)	57 (72)
kPR	8	2 (25)	6 (75)	1 (12)	7 (88)
PB(SB)	4	2 (50)	2 (50)	1 (25)	3 (75)
N		91		91	

Na osnovu granične vrednosti od 10 fmol/mg za sadržaj ER α odnosno 20 fmol/mg za PR određen je status steroidnih receptora koji su određivani biohemijskom metodom (n = 84). U situaciji određivanja ER α i PR imunohistochemijskom metodom (n = 7), vrednosti skora od 3 i više (opseg 3 – 8) označavaju pozitivan (+) status.

Tabela IV.6.4.a. Učestalost statusa biomarkera u (pog)grupama pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom, kao i povezanost sa terapijskim ishodom (χ^2 – test).

Biomarker	(Pod)grupe pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom			P
	pKR	pPR	PB/SB	
	Br. uzoraka (%)	Br. uzoraka (%)	Br. uzoraka (%)	
Ki-67 index				
pozitivan	6 (75)	48 (52)	0	0.029
negativan	2(25)	45 (48)	5 (100)	
AI				
pozitivan	7 (88)	41 (45)	5 (100)	0.005
negativan	1 (12)	51 (55)	0	
Indeks rasta				
pozitivan	48 (52)	5 (63)	0	<u>0.059</u>
negativan	44 (48)	3 (37)	5 (100)	
p53				
pozitivan	6 (75)	37 (40)	3 (40)	0.12
negativan	2 (25)	56 (60)	2 (60)	
bcl-2				
pozitivan	2 (25)	46 (54)	1 (20)	0.11
negativan	6 (75)	39 (46)	4 (80)	

Tabela IV.6.4.b. Prediktivna vrednost statusa biomarkera između različitih (pod)grupa pacijentkinja (χ^2 – test).

(Pod)grupe pacijentkinja koje su analizirane	Biomarker (Status)						
	Ki-67	AI	Indeks rasta	p53	bcl-2	ER α	PR
	p	p	p	p	p	p	p
pPR vs. pKR	0.37	0.027	0.72	0,12	0,15	0,15	0,68
pPR vs. PB/SB	0.056	0.021	0.056	0,40	0,19	1,00	1,00
pKR vs. PB/SB	0.021	1.0	0.08	1,00	1,00	0,55	1,00

Analizom povezanosti statusa biomarkera sa različitim terapijskim odgovorom tumora na dejstvo hemioterapije, dobijeni su sledeći rezultati:

- Status Ki-67 indeksa je statistički značajno povezan sa terapijskim odgovorom tumora ($p = 0.029$, Tabela IV.6.4.a). Međutim, učestalost (distribucija) statusa Ki-67 indeksa pokazuje statistički značajnu razliku, samo između pacijentkinja sa kompletnom regresijom tumora (pKR) u odnosu na pacijentkinje sa progresijom/stabilnom bolešću ($p = 0.021$), Tabela IV.6.4.b.;

U pacijentkinja sa pKR je utvrđena veća učestalost pozitivnog Ki-67 statusa (75% Tabela IV.6.4.a) u odnosu na pacijentkinje sa progresijom bolesti u kojih je pozitivan status Ki-67 indeksa odsutan. Analiza razlike u distribuciji učestalosti Ki-67 statusa između pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) u poređenju sa pacijentkinjama sa progresijom bolesti (PB/SB) je pokazala trend značajnosti ($p = 0.056$, Tabela IV.6.4.a), nalaz koji je potrebno obazrivo interpretirati, sa obzirom na različitost u broju uzoraka koji se porede (93 vs. 5). U pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) je približno polovina uzoraka (52 %) sa pozitivnim statusom Ki-67, a izdvaja se nalaz odsustva pozitivnog statusa Ki-67 (prisustvo samo negativnog Ki-67 statusa) u podgrupi pacijentkinja sa progresijom/stabilnom bolešću.

- Status AI je statistički značajno povezan sa terapijskim odgovorom tumora ($p = 0.005$, Tabela IV.6.4.a). Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji statusa AI u pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) i u poređenju sa pacijentkinjama sa kompletnom regresijom tumora ($p = 0.027$) i u poređenju sa pacijentkinjama sa progresijom bolesti ($p = 0.021$, Tabela IV.6.4.b).

U pacijentkinja sa kompletnom regresijom tumora, kao i sa progresijom bolesti, dominira pozitivan status AI (Tabela IV.6.4.a), a nije nađena razlika u distribuciji statusa AI između ovih podgrupa pacijentkinja ($p = 1.00$, Tabela IV.6.4.b).

- Između podgrupa pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) i pacijentkinja sa progresijom bolesti (PB/SB), dobijen je trend značajnosti razlike u distribuciji statusa indeksa rasta tumora ($p = 0.056$, Tabela IV.6.4.a) koji sa obzirom na veličinu uzoraka koji se porede treba oprezno interpretirati.

U pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) se 52 % tumora karakteriše pozitivnim statusom indeksa rasta (Tabela IV.6.4.a), dok je u pacijentkinja sa progresijom/stabilnom bolešću prisutan negativan status indeksa rasta tumora.

Nije utvrđena značajnost preterapijskog statusa p53 i bcl-2 proteina za odgovor karcinoma dojke na dejstvo hemioterapije (Tabela IV.6.4.a).

Takođe, nije nađena statistički značajna povezanost statusa steroidnih receptora (ER α i PR) sa različitim terapijskim odgovorom karcinoma dojke (podaci nisu prikazani).

Tabela IV.6.5. Učestalost statusa biomarkera (pozitivan/negativan) na nivou vrednosti pre i posle terapije u pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) i analiza promene učestalosti statusa pod uticajem hemioterapije (χ^2 test).

Status biomarkera	Granična vrednost	Pre-terapije	Posle-terapije	χ^2	<i>p</i>
p53	0.0				
pozitivan		37 (40)	44 (47)		
negativan		56 (60)	49 (53)		N.S:
bcl-2	1,58				
pozitivan		43 (51)	42 (49)		
negativan		42 (49)	43 (51)		N.S:
Ki-67	14.68				
pozitivan		48 (52)	22 (24)	13.357	< 0.001
negativan		45 (48)	70 (76)		
AI	1.207				
pozitivan		41 (45)	25 (28)	8.532	0.003
negativan		51 (55)	65 (72)		
Ki-67/AI (indeks rasta)	10,39				
pozitivan		46 (50)	38 (42)	0.817	0.37
negativan		46 (50)	52 (58)		

Nije nađena razlika u učestalosti statusa indeksa rasta tumora pre i posle hemioterapije. Sa obzirom na nalaz istovremenog sniženja pozitivnog statusa Ki-67 i AI, približno iste učestalosti od 20-25 %, indeks rasta tumora kao odnos njihovih vrednosti nije značajno promenjen.

IV.6.6. Povezanost vrednosti Ki-67 indeksa, AI i indeksa rasta tumora sa različitim terapijskim odgovorom tumora, a u okviru statusa (pozitivan/negativan) p53 i bcl-2 proteina (*Spearman-ov test rang korelacije*).

Biomarker		Status p53		Status bcl-2	
		negativan	pozitivan	negativan	pozitivan
Ki-67	ρ	-0,348	-0,382	-0,45	-0,232
	p	0,007	0,009	0,002	0,105
	n	59	46	47	50
AI	ρ	-0,063	-0,127	-0,093	-0,149
	p	0,629	0,405	0,528	0,306
	n	60	45	48	49
Indeks rasta tumora	ρ	-0,244	-0,255	-0,358	-0,145
	p	0,06	0,091	0,013	0,32
	n	60	45	48	49

Vrednosti Ki-67 indeksa su statistički značajno povezane sa terapijskim odgovorom tumora, nezavisno od statusa p53 proteina. Povezanost Ki-67 sa terapijskim odgovorom tumora utvrđena je u situaciji snižene ekspresije (negativnog statusa) bcl-2 proteina ($p = 0.002$). Vrednosti indeksa rasta statistički su značajno povezane sa terapijskim odgovorom tumora na dejstvo hemioterapije u situaciji snižene ekspresije - negativnog statusa bcl-2 proteina ($p = 0.013$). Vrednosti AI ne pokazuju prediktivnu vrednost, nezavisno od statusa p53 i bcl-2 proteina.

Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji vrednosti Ki-67 u odnosu na status p53 proteina ($p = 0.013$), Tabela IV.6.7. Vrednosti Ki-67 su statistički značajno više (Med 17.72; IK, 9.51 – 31.27) u situaciji pozitivnog statusa p53 proteina. Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji vrednosti AI u odnosu na status p53 i bcl-2 proteina; više vrednosti AI se utvrđuju u okviru pozitivnog statusa p53 proteina ($p =$

0.023) i u situaciji negativnog statusa (snižene ekspresije) bcl-2 proteina ($p = 0.017$). Vrednosti indeksa rasta ne pokazuju značajnu heterogenost (varijabilnost) u odnosu na status p53 i bcl-2 proteina.

Tabela IV.6.7. Distribucija pre-terapijskih vrednosti Ki-67 indeksa, AI i indeksa rasta tumora u okviru statusa (pozitivan/negativan) p53 i bcl-2 proteina (Mann – Whitney's U Test, test sume rangova).

<i>Biomarker</i>	<i>Status</i>	<i>Br. Uzoraka</i>	<i>Medijana</i>	<i>IK (25 % - 75 %) opseg</i>	<i>p</i>	
Ki-67	p53	negativan	60	11,55	2.69 - 21.51	0.013
		pozitivan	46	17.82	9.51 - 31.27	
	bcl-2	negativan	49	18.62	5.96 - 31.27	0.22
		pozitivan	49	13.61	5.34 - 30.93	
AI	p53	negativan	60	1,07	0.55 - 1.81	0.023
		pozitivan	45	1,47	0.92 - 1.93	
	bcl-2	negativan	48	1,57	0.84 - 2.28	0.017
		pozitivan	49	1,27	0.55 - 1.66	
Ki-67/AI (indeks rasta)	p53	negativan	60	9,71	1.86 - 23.64	0.18
		pozitivan	40	12,88	5.26 - 26.31	
	bcl-2	negativan	49	10,52	5.58 - 25.92	0.79
		pozitivan	48	10,58	5.01 - 25.42	

IV.7. Analiza biomarkera u okviru kombinovane ekspresije p53 i bcl-2 gena – dihotomnog fenotipa p53/bcl-2 proteina

Na osnovu medijane kao granične vrednosti za p53 (Pre/Post, Med = 0 .0) i za bcl-2 protein (Pre-, Med = 1.58; Post-, Med = 1.69), Tabela IV.1.1., vrednosti p53 i bcl-2 proteina su definisane kao pozitivne (više (jednake); \geq od Med) odnosno negativne (manje; $<$ od Med) vrednosti. Međusobna kombinacija pozitivnog i negativnog statusa čini fenotip koji je grupisan kao dihotomni fenotip p53/bcl-2 gena - „fiziološki“ i „aberrantni“ .

Dihotomni fenotipovi p53 i bcl-2 proteina su definisani na sledeći način:

Fenotip	p53 negativan (-) / bcl-2 pozitivan (+)	„fiziološka“ kombinacija
	p53 pozitivan (+) / bcl-2 pozitivan (+)	„aberrantne“ kombinacije
	p53 negativan (-) / bcl-2 negativan (-)	
	p53 pozitivan (+) / bcl-2 negativan (-)	

Tabela IV.7.1. Relevantne vrednosti p53 i bcl-2 proteina (Med; IK opseg, 25% -75% opseg) u okviru „fiziološkog“/„aberrantnog“ fenotipa u (pod)grupama pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom karcinoma dojke.

(Pod)grupa pacijentkinja	Dihotomni fenotip	Biomarker				Br. Uzoraka (%)
		p53		bcl-2		
		Medijana	IK opseg (25 - 75 %)	Medijana	IK opseg (25 - 75 %)	
pPR	Pre- "fizioloski"	0,00	(0.0 - 0.0)	2,52	(1.99 - 2.89)	28 (32.9)
	Pre- "aberrantni"	1,10	(0.0 - 34.17)	1,09	(0.69 - 2.03)	57 (67.1)
pKR	Post- "fizioloski"	0,00	(0.0 - 0.0)	2,71	(2.16 - 2.90)	24 (28.2)
	Post- "aberrantni"	6,30	(0.0 - 56.40)	1,25	(0.50 - 2.07)	61 (71.8)
pKR	"aberrantni"	23,56	(3.75 - 52.95)	0,35	(0.20 - 1.05)	8 (100)
PB/SB	"aberrantni"	2,85	(2.07 - 21.68)	0,53	(0.26 - 0.79)	4 (80)

Na osnovu vrednosti p53 i bcl-2 proteina (Medijana, IK opseg) koje odgovaraju „fiziološkom“ i „aberrantnom“ fenotipu u (pod)grupama pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom zapaža se da su vrednosti bcl-2 proteina značajno niže u okviru „aberrantnih“ kombinacija u odnosu na vrednosti „fiziološkog“ fenotipa ($p < 0.001$, nije prikazano).

Vrednosti p53 proteina u okviru „aberrantnih“ kombinacija odgovaraju pozitivnom statusu i označavaju prisustvo izmenjenog p53 proteina koji je odsutan („neizmenjen“) u „fiziološkom“ fenotipu.

Ovi nalazi opravdavaju analizu „združenog“ – kombinovanog statusa p53/bcl-2 proteina kao dihotomni fenotip ovih biomolekula.

Tabela IV.7.2. Distribucija „fiziološkog / aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina u (pod)grupama pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom karcinoma dojke na dejstvo hemioterapije.

(Pod) grupa pacijentkinja	Fenotip p53/bcl-2	n	n (%)
Sve vrednosti	"fizioloski" p53-/bcl-2+	29	29(29.6)
	p53+/bcl-2+	20	
	(Pre-) "aberrantni" p53-/bcl-2 -	25	69(70.4)
	p53+/bcl-2-	24	
	N	98	100
pPR	"fizioloski" p53-/bcl-2+	28	28 (32.9)
	p53+/bcl-2+	18	
	Pre- "aberrantni" p53-/bcl-2 -	22	57 (67.1)
	p53+/bcl-2-	17	
	N	85	100
kPR (pre-)	"fizioloski" p53-/bcl-2+	24	24 (28.2)
	p53+/bcl-2+	20	
	Post- "aberrantni" p53-/bcl-2 -	20	61 (71.8)
	p53+/bcl-2-	21	
	N	85	100
PB/SB (pre-)	"fizioloski" p53-/bcl-2+	0	
	p53+/bcl-2+	2	
	"aberrantni" p53-/bcl-2 -	4	8 (100)
	p53+/bcl-2-	8	
	N		
PB/SB (pre-)	"fizioloski" p53-/bcl-2+	1	
	p53+/bcl-2+	0	
	"aberrantni" p53-/bcl-2 -	1	4 (80)
	p53+/bcl-2-	3	
	N	5	100

Podgrupu pacijentkinja sa kompletnom patološkom regresijom tumora (kPR) pod uticajem hemioterapije, karakteriše prisustvo samo „aberrantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina, na nivou preterapijskih vrednosti (Tabela IV.7.2.).

Nije nađena značajna razlika u učestalosti „fiziološkog“ odnosno „aberrantnog“ fenotipa u (pod) grupama pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom karcinoma dojke., Tabela IV.7.3.

Nije dobijena povezanost dihotomnog fenotipa p53/bcl-2 proteina sa terapijskim odgovorom tumora na dejstvo hemioterapije.

Tabela IV.7.3. Analiza razlike u distribuciji „fiziološkog/aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina između (pod)grupa pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora na dejstvo hemioterapije (χ^2 -test).

Dihotomni fenotip	<u>(Pod)grupa pacijentkinja</u>			χ^2 -test	p
	pPR	pKR	PB/SB		
"fizioloski"	28	0	1	4,041	0.13
"aberantni"	57	8	4		

Tabela IV.7.4. Distribucija „fiziološkog/aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina u situaciji sniženih ili povišenih vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora na dejstvo hemioterapije (pPR).

Pacijentkinje sa pPR	Dihotomni fenotip	n	n (%)	
↓ Snižene vrednosti indeksa rasta tumora	fizioloski" p53-/bcl-2 +	18	18 (34.6)	
	Pre- "aberantni"	p53+/bcl-2+	11	34 (65.4)
		p53-/bcl-2 -	12	
		p53+/bcl-2-	11	
	N	52	100	
	Post- "aberantni"	fizioloski" p53-/bcl-2+	13	13 (25)
		p53+/bcl-2+	14	39 (75)
		p53-/bcl-2 -	13	
		p53+/bcl-2-	12	
		N	52	100
↑ Povišene vrednosti indeksa rasta tumora		fizioloski" p53-/bcl-2+	7	7 (24.1)
	Pre- "aberantni"	p53+/bcl-2+	6	22 (75.9)
		p53-/bcl-2 -	10	
		p53+/bcl-2-	6	
	N	29	100	
	Post- "aberantni"	fizioloski" p53-/bcl-2+	10	10 (34.5)
		p53+/bcl-2+	5	19 (65.5)
		p53-/bcl-2 -	5	
		p53+/bcl-2-	9	
		N	29	100

Analiza promene vrednosti indeksa rasta karcinoma dojke pod uticajem hemioterapije, u smislu sniženja odnosno porasta vrednosti bila je moguća u (pod)grupi pacijentkinja sa parcijalnom regresijom bolesti (pPR) u kojoj su prisutne početne (pre-) i rezidualne (post-) vrednosti (Poglavlje IV.4.II.).

Tabela IV.7.5. Analiza razlike u distribuciji „fiziološkog“ i „aberrantnog“ fenotipa u odnosu na promenu vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora, pRB (χ^2 test).

Indeks rasta tumora	Dihotomni fenotip p53/bcl-2					
	"fizioloski"		"aberrantni"			
↓ Snižene vrednosti	Pre-	18	34	Post-	13	10
↑ Povišene vrednosti		7	22		39	19
χ^2 test		0,530			0,423	
p		0,47			0,52	

Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti odgovarajućeg fenotipa p53/bcl-2 proteina između tumora koji na dejstvo hemioterapije pokazuju porast ili sniženje vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora; u situaciji analize pre i posle hemioterapije.

Prisustvo određenog - fiziološki ili aberrantni fenotipa p53/bcl-2 proteina nije povezano sa promenom vrednosti indeksa rasta tumora na delovanje hemioterapije.

IV.7.6. Analiza statusa biomarkera u okviru „fiziološkog“ / „abernantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina

Tabela IV.7.6.1. Distribucija statusa Ki-67, AI i indeksa rasta tumora u okviru dihotomnog fenotipa p53/bcl-2 u (pod)grupama pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom.

(Pod)grupa pacijentkinja	Fenotip p53/bcl-2	Status	Ki-67 n (%)	AI n (%)	Ki-67/AI n (%)
Sve vrednosti	"fizioloski"	pozitivan	10 (10.3)	12 (12.4)	15 (15.5)
		negativan	19 (19.6)	17 (17.5)	14 (14.4)
	N = 29				
	"abernantni"	pozitivan	26 (26.8)	40 (41.2)	36 (37.1)
negativan		42 (42.9)	28 (28.6)	32 (32.7)	
N = 68					
Pre-pPR	"fizioloski"	pozitivan	13 (15.5)	11 (13.1)	15 (17.9)
		negativan	15 (17.9)	17 (20.2)	13 (15.5)
	N = 28				
	"abernantni"	pozitivan	33 (39.3)	29 (34.5)	31 (36.9)
negativan		23 (27.4)	27 (32.1)	25 (29.8)	
N = 56					
Post-pPR	"fizioloski"	pozitivan	9 (10.7)	12 (14.3)	8 (9.5)
		negativan	15 (17.9)	12 (14.3)	16 (19.0)
	N = 24				
	"abernantni"	pozitivan	35 (41.7)	30 (35.7)	32 (38.1)
negativan		25 (29.8)	28 (33.3)	26 (31)	
N = 60					
pKR	"abernantni"	pozitivan	6 (75)	7 (87.5)	5 (62.5)
		negativan	2 (25)	1 (12.5)	3 (37.5)
N = 8					
PB/SB	"fizioloski"	pozitivan	0	1	0
		negativan	1 (100)	0	1
	N = 1				
	"abernantni"	pozitivan	0	4	0
negativan		4 (100)	0	4	
N = 4					

Medijana (Pre-)	
Ki-67	(14.68)
AI	(1.314)
Medijana (Post-)	
Ki-67	(5.21);
AI	(0.827)

Tabela IV.7.6.2. Analiza razlike u distribuciji statusa (+/-) Ki-67, AI i indeksa rasta (Ki-67/AI) koji odgovara odgovarajućem fenotipu p53/bcl-2 proteina, u pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora (χ^2 test, Fisher-ov test).

(Pod)grupa	pacijentkinja		Ki-67	AI	Ki-67/AI
pRB	pre-	χ^2	0.727	0.722	0.006
		p	0.39	0.39	0.94
	post-	χ^2	2.206	0.01	2.425
		p	0.14	0.92	0.12
PB/SB	pre-	p	1.00	1.00	1.00

Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji statusa Ki-67, AI i indeks rasta tumora između „fiziološkog“ i „aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 u (pod)grupi pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) i sa progresijom bolesti (PB/SB) na dejstvo hemioterapije. Združeni status p53 i bcl-2 proteina razmatan kao dihotomni fenotip - „fiziološki“ / „aberantni“ nije povezan sa zastupljenošću različitog statusa (pozitivnog ili negativnog) Ki-67 indeksa, AI i indeksa rasta tumora.

U (pod)grupi pacijentkinja sa kompletnom patološkom regresijom tumora (pKR), utvrđeno je prisustvo samo „aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina.

IV.7.8. Povezanost nalaza odgovarajućeg fenotipa p53/bcl-2 proteina sa vrednostima Ki-67, AI i indeksa rasta (Ki-67/AI) (Pierson-ov „point biserijalni“ koeficijent korelacije r)

Analizom povezanosti dihotomnog fenotipa p53/bcl-2 proteina („fiziološki / aberantni“) sa vrednostima Ki-67 i AI, dobijeni su sledeći rezultati, Tabela IV.7.8.1:

- Utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost vrednosti Ki-67 i AI i nalaza „aberantne“ kombinacije p53/bcl-2 proteina, pre terapije. Više vrednosti Ki-67 indeksa i AI povezane su sa nalazom „aberantne“ kombinacije p53/bcl-2 proteina na nivou preterapijskih vrednosti u grupi pacijentkinja koje su analizirane u celini;

Na nivou pre-terapijskih vrednosti u (pod)grupi pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR), povezanost vrednosti Ki-67 kao i AI sa nalazom „aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina nije utvrđena ($p = 0.11$; $p = 0.052$).

Tabela IV.7.8.1. Analiza povezanosti fenotipa p53/bcl-2 proteina sa vrednostima Ki-67, AI i indeksa rasta (Ki-67/AI), pre i posle dejstva hemioterapije.

(Pod)grupa pacijentkinja			Biomarker		
			Ki-67	AI	Ki-67/AI
sve vrednosti	(pre-)	□	0.201	0.265	-0.088
		p	0.049	0.009	0.39
		n	97	97	97
pRB	(pre-)	□	0.177	0.213	-0.081
		p	0.11	<u>0.052</u>	0.47
		n	84	84	84
	(post-)	□	0.235	0.035	0.132
		p	0.032	0.76	0.24
		n	84	82	82
PB/SB	(pre-)	□	0.269	0.348	0.258
		p	0.66	0.57	0.68
		n	5	5	5

- Na nivou rezidualnih vrednosti utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost, više vrednosti Ki-67 indeksa povezane sa nalazom „aberantnog“ fenotipa p53 i bcl-2 proteina ($p = 0.032$).

U pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) nije utvrđena povezanost nalaza određenog fenotipa p53/bcl-2 sa vrednostima AI i indeksa rasta tumora, i u situaciji analize pre i u situaciji analize posle hemioterapije. Nije nađena povezanost prisustva fenotipa p53/bcl-2 sa vrednostima ispitivanih biomarkera u pacijentkinja sa PB/SB. U okviru ove (pod)grupe pacijentkinja predominira „aberantni“ fenotip (80%).

IV.7.9. Analiza varijabilnosti vrednosti Ki-67, AI i indeksa rasta (Ki-67/AI) između „fiziološkog“ i „aberrantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina, a u okviru grupe pacijentkinja u celini i pacijentkinja sa pPR (*Mann – Whitney’s U Test, test sume rangova*)

Tabela IV.7.9.1. Relevantne vrednosti (Med; IK opseg) Ki-67 indeksa, AI i indeksa rasta u okviru pojedinog fenotipa p53/bcl-2 proteina i analiza varijabilnosti biomarkera u svih pacijentkinja i u pacijentkinja sa pPR.

(Pod)grupa pacijentkinja	Biomarker	Fenotip p53/bcl-2	Br. Uzoraka	Medijana	IK (25% - 75 %) opseg	p
Sve vrednosti (Pre-)	Ki-67	"fizioloski"		11,82	5.14 - 20.31	0,09
		"aberrantni"		17,42	6.25 - 30.93	
	AI	"fizioloski"	29 vs. 68	1,071	0.482 - 1.652	0,015
		"aberrantni"		1,45	0.836 - 1.957	
	Ki-67/AI	"fizioloski"		10,25	5.18 - 24.45	0,84
		"aberrantni"		10,62	5.49 - 26.58	
pPR (Pre-)	Ki-67	"fizioloski"		12,07	5.61 -20.82	0,16
		"aberrantni"		17,42	6.25 -30.42	
	AI	"fizioloski"	28 vs.57	1.035	0.480 - 1.590	0.06
		"aberrantni"		0.791	0.791 - 1.823	
	Ki-67/AI	"fizioloski"		10,66	5.61 - 24.59	0.85
		"aberrantni"		10,82	5.62 - 27.33	
pPR (Post-)	Ki-67	"fizioloski"		2.00	(0.55 - 5.70)	0,003
		"aberrantni"		9,87	(2.84 -14.93)	
	AI	"fizioloski"	24 vs. 61	0.946	(0.479-1.287)	0,93
		"aberrantni"		0.830	(0.622-1.304)	
	Ki-67/AI	"fizioloski"		2,34	(0.60 - 14.58)	<u>0,053</u>
		"aberrantni"		9.87	(2.84 - 14.93)	

U okviru svih analiziranih vrednosti utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji vrednosti AI između „fiziološkog“ i „aberrantnog“ fenotipa ($p = 0.015$). Vrednosti AI u netretiranim tumorima koje odgovaraju „aberrantnom“ fenotipu p53/bcl-2 su značajno više (Med 1.450; IK 0.836 - 1.957) u odnosu na vrednosti koje odgovaraju „fiziološkom“ fenotipu (Med 1.071; IK 0.482 - 1.652).

U pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora na dejstvo hemioterapije (pPR) utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji vrednosti Ki-67 indeksa, posle terapije ($p = 0.003$) u odnosu na dihotomni fenotip p53/bcl-2 proteina. Rezidualne vrednosti Ki-67 indeksa koje odgovaraju „fiziološkom“ fenotipu su značajno niže (Med 2.00, IK 0.55 – 5.70) u poređenju sa vrednostima (Med 9.87, IK 2.84 – 14.93) koje su nađene u okviru „aberantnih“ kombinacija p53/bcl-2 proteina. Na nivou pre-terapijskih vrednosti nije dobijena značajnost u varijabilitetu vrednosti ovog biomarkera.

Nije utvrđen značajan varijabilitet vrednosti AI u situaciji analize vrednosti pre- i posle terapije u odnosu na prisustvo odgovarajućeg fenotipa p53/bcl-2 proteina.

Analizom indeksa rasta nije utvrđen varijabilitet vrednosti u odnosu na nalaz odgovarajućeg dihotomnog fenotipa p53/bcl-2 proteina, pre terapije. Posle terapije, u okviru rezidualnih vrednosti dobijen je trend značajnosti ($p = 0.053$); vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora pokazuju trend ka višim vrednostima u okviru „aberantnih“ kombinacija p53/bcl-2 fenotipa.

U podgrupi pacijentkinja sa kompletnom regresijom tumora na dejstvo hemioterapije (pKR) vrednosti fenotipa p53/bcl-2 proteina odgovaraju „aberantnom“ fenotipu. U pacijentkinja sa klinički procenjenom progresijom/stabilnom bolešću pod uticajem hemioterapije (PB/SB), „aberantni“ fenotip je preovlađujući (80%).

Zbog toga je bilo moguće ispitivati varijabilnost pre-terapijskih vrednosti biomarkera (Ki-67, AI i Ki-67/AI) u okviru „aberantnog“ fenotipa, a između podgrupa pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom na dejstvo hemioterapije (pPR, pKR i PB/SB).

Tabela IV.7.9.2. Rezultati analize varijabilnosti vrednosti Ki-67, AI, Ki-67/AI u okviru „aberantnih“ kombinacija p53/bcl-2 proteina između (pod)grupa pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora.

(Pod)grupe pacijentkinja	Biomarker (Pre-th) vrednosti	"ABERANTNI" Fenotip p53/bcl-2			
		Br. uzoraka	Medijana poredjenih (pod)grupa	interkvartilni (25%-75%) opseg	p
kRB vs. PB/SB	Ki-67		34.77 vs. 0.97	(18.24 - 59.94) vs. (0.51 - 7.04)	0,008
	AI	8 vs. 4	Sv. 2.17 vs. 2.10	95% CI (-0.787 - 0.963)	0,83
	Ki-67/AI		14.84 vs. 0.41	(8.25 - 27.84) vs. (0.30 - 3.07)	0,004
pRB vs. PB/SB	Ki-67		17.42 vs. 0.97	(6.25 - 30.42) vs. (0.51 - 7.04)	0,018
	AI	57 vs 4	1.376 vs.	(0.79 - 1.82) vs.1.63 -2.52).	0,08
	Ki-67/AI		10.82 vs.0.41	(5.62 - 27.33) vs.(0.30 - 3.07)	0,007
pRB vs. kRB	Ki-67		17.42 vs.34.77	(6.25 - 30.42) vs. (18.24 - 59.94)	0,024
	AI	57 vs. 8	1.376 vs. 2.239	(0.791-1.823) vs. (1.621-2.744)	0,008
	Ki-67/AI		10.82 vs. 14.84	(5.62 - 27.33) vs. (8.25 - 27.84)	0,55

Ki-67: Analizom varijabilnosti vrednosti Ki-67 indeksa u okviru „aberantnog“ p53/bcl-2 fenotipa između pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora utvrđena je statistički značajna razlika između svih analiziranih (pod)grupa pacijentkinja (Tabela IV.7.9.2.). U pacijentkinja sa kompletnom patološkom regresijom tumora (pKR) su detektovane najviše vrednosti Ki-67 sa medijanom 34.77 (IK opseg, 18.24 – 59.94). U pacijentkinja sa progresijom/stabilnom bolešću (PB/SB) kao dijametralno suprotnom terapijskom odgovoru tumora, nađene su najniže vrednosti Ki-67 sa Med 0.97 (IK 0.51 – 7.04). U pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) se nalaze „intermedijarne“ vrednosti Ki-67 indeksa (Med 17.42; 25-75%, 6.25 – 30.42).

AI: Vrednosti AI su značajno niže ($p = 0.008$) u pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) sa Med 1.376, u poređenju sa visokim vrednostima AI u tumorima sa kompletnom regresijom bolesti (pKR), Med 2.239. Međutim, nije dobijena statistički značajna razlika u distribuciji vrednosti AI između pacijentkinja sa rezidualnom bolešću (pPR) i pacijentkinja sa progresijom bolesti (PB/SB). S obzirom na veličinu poređenih uzoraka (57 vs. 4), dobijeni rezultat treba obazrivo razmatrati. Nije utvrđena

varijabilnost vrednosti AI između podgrupa sa kompletnom regresijom tumora (pKR) i progresijom bolesti (PB/SD) pod uticajem hemioterapije ($p = 0.828$) koje se odlikuju visokim vrednostima AI.

Indeks rasta: Vrednosti indeksa rasta netretiranog karcinoma dojke su statistički značajno različite između pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom na hemioterapiju. U pacijentkinja sa progresijom bolesti (PB/SB) su izrazito niže (Med 0.41; 25-75%, 0.30 - 3.07) u odnosu na pacijentkinje sa kompletnom regresijom tumora (Med 14.84; 25-75%, 8.25 - 27.84), $p = 0.004$, kao i u odnosu na pacijentkinje sa parcijalnom regresijom tumora pod uticajem hemioterapije, pPR (Med 10.82; 25-75%, 5.62 - 27.33), $p = 0.007$. Između podgrupa pacijentkinja sa kompletnom (pKR) i sa parcijalnom regresijom tumora (pPR) na dejstvo hemioterapije nije nađena značajna razlika u distribuciji vrednosti indeksa rasta tumora, analiziranih pre terapije, a u okviru „aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina.

IV.8. Sažetak rezultata

- Pacijentkinje sa parcijalnom patološkom regresijom bolesti (pPR) – rezidualna bolest:
 - Preterapijske, početne vrednosti analiziranih parametara.

U pacijentkinja sa rezidualnom bolešću pod uticajem hemioterapije, tumori pokazuju značajno niže početne vrednosti AI, sa medijanom od 1.207 (IK opseg, 0.674 – 1.736) i visoke vrednosti bcl-2 proteina sa medijanom od 1.74 (IK opseg, 0.94 – 2.58), Tabela IV.4.1. Porast ekspresije bcl-2 gena je povezan sa nižim vrednostima AI ($p = 0.01$, Tabela IV.2.2., Sl. IV.2.2.1.). Vrednosti AI u netretiranih tumora sa parcijalnom regresijom se značajno razlikuju u odnosu na tumore sa kompletnom patološkom regresijom (pKR) a i odnosu na tumore koji ispoljavaju progresiju/stabilnu bolest na dejstvo hemioterapije (PB/SB); u obe ove (pod)grupe pacijentkinja su detektovane više vrednosti AI kao pokazatelja apoptotske aktivnosti malignih ćelija (Tabela IV.4.1). Ekspresija mutiranog p53 gena, odnosno porast vrednosti p53 proteina je povezan sa višim vrednostima proliferativnog (Ki-67) indeksa, ($p = 0.002$) i apoptotskog (AI), ($p = 0.036$) malignih ćelija karcinoma dojke kao pokazatelja proliferativne i apoptotske aktivnosti malignih ćelija (Tabela IV.2.2., Sl. IV.2.2.2, Sl. IV.2.2.3.). Međutim, povezanost vrednosti Ki-67 indeksa i AI nije utvrđena. Vrednosti Ki-67 indeksa, takođe nisu povezane sa vrednostima bcl-2 proteina (Tabela IV.2.2.). Preterapijske vrednosti Ki-67 su „intermedijarnog nivoa“, sa medijanom od 14.68 (IK opseg, 5.23 – 23.86), u odnosu na vrednosti koje su detektovane u pacijentkinja sa tumorima koji ispoljavaju kompletnu regresiju (pKR) a i progresiju bolesti na dejstvo hemioterapije, PB/SB (Tabela IV.4.1).

Vrednosti biomarkera su analizirane i kao status datog bimolekula, primenom medijane kao granične vrednosti za određivanje pozitivnog tj. negativnog statusa odnosno prisustva tj odsustva datog biomolekula. U situaciji analize vrednosti Ki-67 indeksa kao statusa, utvrđen je „trend“- marginalna značajnost razlike u zastupljenosti statusa Ki-67 indeksa između pod(grupa) tumora sa parcijalnom regresijom i tumora sa progresijom u toku hemioterapije ($p = 0.056$, Tabela IV.6.4.b). Od značaja je nalaz

izrazito niskih vrednosti Ki-67 i saglasno tome odsustvo pozitivnog statusa ovog biomolekula u pacijentkinja sa tumorima koji ispoljavaju kliničku progresiju bolesti, PB/SB (Tabela IV.6.2.).

Nije utvrđena povezanost između vrednosti p53 i bcl-2 proteina u netretiranih tumora koji na dejstvo hemioterapije ispoljavaju parcijalnu patološku regresiju (Tabela 2.2.). Vrednosti p53 i bcl-2 proteina su analizirane kao združeni status, predstavljene kao dihotomni fenotip (Deo IV.7.). U okviru „aberantnog“ fenotipa vrednosti p53 proteina odgovaraju prisustvu mutiranog, izmenjenog p53 gena, a vrednosti bcl-2 proteina su značajno niže u poređenju sa vrednostima koje odgovaraju „fiziološkom“ fenotipu., $p < 0.001$, (Tabela IV.7.1.). U netretiranih tumora koji na dejstvo hemioterapije ispoljavaju parcijalnu patološku regresiju (pPR), „aberantni“ fenotip preovlađuje sa učestalošću od 67.1 % (Tabela IV.7.1.) Međutim, varijabilitet vrednosti (Tabela IV.7.2.), a niti razlika u učestalosti statusa Ki-67 indeksa, AI i indeksa rasta (Tabela IV.7.3.) između dva različita, dihotomna fenotipa p53/bcl-2 nije utvrđena. U pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora, pPR ($p = 0.052$, Tabela IV.7.9.), dobijen je jedino „trend“ značajnosti odnosno tendencija učestalijeg nalaza viših, preterapijskih vrednosti AI u okviru „aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina. Povezanost vrednosti Ki-67 indeksa i AI nije utvrđena u okviru pojedinačnog (fiziološki/aberantni) fenotipa p53/bcl-2 proteina, nije prikazano (analogno nalazu na nivou svih pre-terapijskih vrednosti).

Vrednosti indeksa rasta netretiranih tumora u pacijentkinja sa parcijalnom regresijom na dejstvo hemioterapije takođe pokazuju „intermedijarne nivoe“ koji se značajno razlikuju u odnosu na istovetne vrednosti pacijentkinja sa progresijom/stabilnom bolesti (PB/SB) na dejstvo hemioterapije, a čije su vrednosti indeksa rasta izrazito niske (Tabela IV.4.1).

– *Post-terapijske, rezidualne vrednosti analiziranih biomarkera*

U rezidualnoj populaciji malignih ćelija održava se nalaz da su više vrednosti bcl-2 proteina povezane sa sniženim vrednostima AI ($p = 0.017$, Tabela IV.2.3, Sl. IV.2.3.2.), ali i sa nižim vrednostima Ki-67 indeksa ($p = 0.012$, Tabela IV.2.3, Sl. IV.2.3.1.). Sniženje vrednosti Ki-67 indeksa povezano je i sa smanjenom ekspresijom

mutiranog p53 proteina ($p = 0.001$, Tabela IV.2.3. Sl. IV.2.3.3.), a i sa sniženim vrednostima AI ($p = 0.016$, Tabela IV.2.3.2., Sl. IV.2.3.4.). Dakle, u rezidualnoj populaciji malignih ćelija karcinoma dojke posle dejstva hemioterapije, prisustvo viših vrednosti Ki-67 indeksa, povezano je sa višim vrednostima p53 proteina i sa višim vrednostima AI, a sa nižim vrednostima bcl-2 proteina. Povezanost viših vrednosti Ki-67 indeksa sa višim vrednostima p53 proteina, a sa nižim vrednostima bcl-2 proteina, podudara se sa nalazom da su više rezidualne vrednosti Ki-67 povezane sa prisustvom „aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina ($p = 0.032$, Tabela IV.7.8.1.). Štaviše, vrednosti Ki-67 koje odgovaraju „aberantnom“ fenotipu su značajno više (Med 9.87, IK 2.84 – 14.93), u poređenju sa vrednostima Ki-67 koje se detektuju u okviru „fiziološkog“ fenotipa, Med 2.00, IK opseg 0.55 – 5.70, ($p = 0.003$, Tabela IV.7.9.1.). Učestalost „aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina na nivou rezidualnih vrednosti preovladava (71.8 %, Tabela IV.7.2.). Vrednosti p53 i bcl-2 proteina nisu povezane na nivou rezidualnih, istovetno kao i u okviru preterapijskih vrednosti. Nalaz da je prisustvo mutiranog p53 proteina povezan sa višim vrednostima AI, detektovan u tumora pre terapije, ne utvrđuje se u rezidualnoj populaciji malignih ćelija posle terapije. Međutim prisustvo mutiranog p53 proteina u rezidualnim malignim ćelijama, povezan je sa višim vrednostima indeksa rasta rezidualnog tumora ($p = 0.009$, Tabela IV.2.5.1., Sl. IV.2.5.1.).

- Promena vrednosti biomarkera pod uticajem terapije – pacijentkinje sa parcijalnom patološkom regresijom tumora (pPR).

Ki-67 indeks: Pod uticajem hemioterapije ustanovljeno je značajno sniženje vrednosti Ki-67 indeksa ($p < 0.001$, Tabela IV.5.1.1.). Medijalna vrednost Ki-67 indeksa u netretiranih tumora od 14.68 (IK, 5.23 – 23.86) posle dejstva hemioterapije u rezidualnim tumorima je snižena do vrednosti 5.21 (IK, 1.60 – 13.34). Saglasno tome je i nalaz, značajne razlike u učestalosti statusa (+/-) Ki-67 u tumorima pod uticajem terapije ($p < 0.001$, Tabela IV.6.5.). Zapaža se pomak (*eng. „shift“*) statusa Ki-67, u smislu nalaza veće učestalosti negativnog statusa Ki-67, za približno 25 %, u rezidualnim tumorima (Tabela IV.6.5.). Pojednostavljena analiza promene vrednosti Ki-67 indeksa koja podrazumeva izračunavanje razlike između vrednosti posle i pre

terapije („apsolutna analiza“), pokazuje sniženje Ki-67 indeksa u 70 % tumora pri čemu je medijana sniženja 12.87 (IK opseg, 4.50 – 18.38). Međutim, na osnovu analize relativno (procentualne) promene vrednosti biomarkera pod uticajem hemioterapije (Deo IV.7.) sniženje vrednosti je utvrđeno u 73 % tumorskih uzoraka, pri čemu je „prosečno“ (Medijana) sniženje vrednosti za 0.72 „dela“ u odnosu na odgovarajuće vrednosti pre terapije, u IK opsegu od 0.50 do 0.90 „delova“ (relativna promena vrednosti, Tabela IV.5.II.1.). Ili iskazano na drugi način, snižene rezidualne vrednosti Ki-67 indeksa „prosečno“ (Medijana) čine 0.28 „deo“ odgovarajućih preterapijskih vrednosti, u (IK opsegu) od 0.10 do 0.50 (procentualna promena vrednosti). U situaciji kada se detektuje sniženje vrednosti Ki-67 indeksa, sniženje koje je veće od 75 % je najčešće, u 46 % tumora (Tabela IV.5.II.2). Obrnuto, porast vrednosti Ki-67 indeksa je utvrđen u 27 % rezidualnih tumora. Rezidualne vrednosti su „prosečno“ uvećane 1.3 „puta“, u IK opsegu od 0.50 do 3.17, u odnosu na preterapijske vrednosti, što znači da povišene rezidualne vrednosti Ki-67 „prosečno“ (Med) čine 2,30 „dela“ analognih vrednosti pre terapije. U situaciji porasta Ki-67 indeksa, vrednosti koje su više za 100 % u odnosu na početne vrednosti se nalaze u više od polovine (56 %) uzoraka (Tabela IV.5.II.2). Nije utvrđen uzorak tumora sa neizmenjenom vrednošću Ki-67 indeksa pod uticajem citotoksičnih lekova.

AI: Utvrđeno je značajno sniženje vrednosti AI posle hemioterapije, u 58 % tumora ($p = 0.035$, Tabela IV.5.I.1). Medijana sniženih rezidualnih vrednosti AI iznosi 0.827 (IK opseg 0.504 – 1.263) u poređenju sa početnom medijalnom vrednošću od 1.207 (IK opseg, 0.675 – 1.736). „Apsolutno“ medijalno sniženje AI iznosi 0.636 (IK opseg, 0.222 – 1.148). Saglasno tome je i nalaz značajno veće učestalosti negativnog statusa AI u tumorima posle terapije, za približno 20 % ($p = 0.003$, Tabela IV.6.5.). Relativno/procentualna analiza promene vrednosti AI pod uticajem terapije (Tabela IV.5.II.1.), pokazuje sniženje vrednosti AI u 57 % ispitivanih tumora, sa medijanom sniženja za 0.48 „dela“ (u IK opsegu od 0.28 do 0.70) od odgovarajućih početnih vrednosti. Na drugi način iskazano (procentualna promena), snižene rezidualne vrednosti AI „prosečno“ (Medijana) čine 52 % analognih preterapijskih vrednosti, a snižene su u IK opsegu za 30 % do 72 % u odnosu na početne vrednosti. U situaciji kada se detektuje sniženje rezidualnih vrednosti AI na dejstvo hemioterapije, utvrđeno je da se sniženje vrednosti od 25 – 50 %, zapaža sa nešto većom učestalošću (37 %,

Tabela IV.5.II.2.). Nalaz nižih rezidualnih vrednosti AI je povezan sa nižim vrednostima Ki-67 indeksa, a sa višim vrednostima bcl-2 proteina. Suprotno od toga, u rezidualnim malignim ćelijama je utvrđen porast vrednosti AI u 43 % uzoraka, za približno polovinu (Med 0.47) od odgovarajućih početnih vrednosti, u opsegu za 0.20 do 0.83 „dela“ (relativna promena). Medijalna vrednost povišenih rezidualnih vrednosti iznosi 147 % analognih početnih vrednosti, pri čemu se zapaža porast rezidualnih vrednosti približno ravnomerno u okviru analiziranih kvartalnih intervala (Tabela IV.4.II.2.).

Trend pozitivne korelacije koji je dobijen između preterapijskih vrednosti Ki-67 indeksa i vrednosti procentualne promene AI usled dejstva hemioterapije ($\rho = 0.209$, $p = 0.051$, $n = 88$, podaci nisu prikazani), ukazuje da viša proliferativnost pre terapije ima tendenciju da izazove veći porast apoptotske aktivnosti rezidualne maligne ćelijske populacije. S druge strane, dobijena značajna pozitivna korelacija između preterapijskih vrednosti AI i vrednosti procentualne promene Ki-67 indeksa rasta ($\rho = 0.262$, $p = 0.012$, $n = 91$, podaci nisu prikazani), ukazuje da je viša apoptotska aktivnost pre terapije povezana sa porastom proliferativnosti u rezidualnom tumoru.

Indeks rasta: Indeks rasta tumora koji predstavlja odnos vrednosti Ki-67 indeksa i AI, pokazuje značajno sniženje pod uticajem hemioterapije ($p = 0.008$, Tabela IV.5.I.1.). Medijalna vrednost indeksa rasta rezidualnog tumora posle hemioterapije je 8.22 (IK, 2.29 – 14.94) sa medijanom „apsolutnog“ sniženja od 11.4 (IK, 4.44 - 26.83). Međutim, analiza promene učestalosti statusa (+/-) indeksa rasta tumora pod uticajem terapije, nije potvrdila značajnu razliku u učestalosti statusa ovog parametra pre i posle terapije ($p = 0.37$, Tabela IV.6.5); S obzirom na nalaz istovremenog sniženja učestalosti statusa Ki-67 i AI pod uticajem terapije (približno iste učestalosti od 20 %), status indeksa rasta pod uticajem terapije nije bitno izmenjen. Analizom promene vrednosti indeksa rasta, pri čemu IR označava procentualna promenu vrednosti ovog parametra, utvrđeno je sniženje vrednosti indeksa rasta tumora pod uticajem hemioterapije u 63 % rezidualnih tumorskih uzoraka. Vrednosti ovog parametra su „prosečno“ snižene za 0.75 „dela“ (u opsegu za 0.50 do 0.94 „delova“) od odgovarajućih početnih vrednosti (relativna promena, Tabela IV.5.II.1.). Slično, snižene rezidualne vrednosti indeksa rasta, „prosečno“ čine jednu četvrtinu (Med 25 %, sniženje od 6 do 51 %) odgovarajućih početnih vrednosti (procentualna promena vrednosti; Med 0.24, od 0.06

do 0.51). Sniženje vrednosti indeksa rasta tumora, u intervalu za 75 % do 100 % u odnosu na vrednosti pre terapije je detektovano sa najvećom učestalošću, u polovini ovih uzoraka (48 %) (Tabela IV.5.II.2).

Više preterapijske vrednosti p53 proteina su povezane sa manje izraženim sniženjem indeksa rasta rezidualnog tumora ($p = 0.02$, Tabela IV.5.II.5. sl. IV.5.II.1.9.). Osim toga, ekspresija bcl-2 gena pokazuje značajnije sniženje rezidualnih vrednosti u situaciji sniženja indeksa rasta rezidualnog tumora u poređenju sa tumorima u kojih nastaje porast indeksa rasta ($p = 0.026$, Tabela IV.5.II.3). Sa obzirom na nalaz statistički značajne negativne korelacije između preterapijskih vrednosti Ki-67 indeksa i vrednosti procentualne promene indeksa rasta usled hemioterapije ($\rho = -0.262$, $p = 0.015$, $n = 88$), više vrednosti Ki-67 pre terapije su povezane sa izrazitijim sniženjem indeksa rasta tumora posle terapije.

Suprotno od sniženja vrednosti ovog parametra, „apsolutni“ porast vrednosti indeksa rasta je utvrđen u 39 % uzoraka sa medijanom porasta od 8.36 (IK opseg, 4.81 – 13.84). Rezultati analize relativne(procentualne) promene vrednosti indeksa rasta tumora pod uticajem hemioterapije, Tabela IV.5.II.1., prikazuju porast vrednosti u 37 % uzoraka. Vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora su „prosečno“ (Medijana) za 1.23 „puta“ više od početnih vrednosti (u IK opsegu 0.53 – 3.80) pri čemu je najzastupljeniji porast koji je veći 100 % u odnosu na analogne preterapijske vrednosti (58 %), Tabela IV.5.II.2. Porast vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora je povezan sa nalazom nižih vrednosti bcl-2 proteina u uzorcima tumora pre terapije ($p = 0.037$, Tabela IV.5.II.2, Sl. IV.5.II.2.). Štaviše, statistički značajna pozitivna korelacija između preterapijskih vrednosti AI i procentualne promene indeksa rasta ($\rho = 0.402$, $p = 0.0001$, $n = 89$, Tabela IV.2.5.2.) ukazuju da je viša apoptotska aktivnost u tumorima pre terapije povezana sa porastom indeksa rasta rezidualnog tumora posle terapije.

➤ Pacijentkinje sa kompletnom patološkom regresijom bolesti (pKR)

U podgrupi pacijentkinja sa kompletnom patološkom regresijom tumora pod uticajem hemioterapije, tumori pokazuju izrazito visoke „bazične“ preterapijske vrednosti Ki-67 indeksa, sa medijanom od 34.77 (IK opseg, 18.24 – 59.94), Tabela IV.4.1. Vrednosti proliferativnog Ki-67 indeksa su značajno više u odnosu na tumore sa

parcijalnom regresijom na dejstvo hemioterapije (pPR; $p = 0.008$) u kojih se detektuju „intermedijarne“ vrednosti (Med 14.68, IK 5.23 – 23.86) ovog biomarkera. Premda nije dobijena statistički značajna razlika ($p = 0.37$, Tabela IV.6.4.b.) u smislu razlike u učestalosti statusa (+/-) Ki-67 indeksa između ovih podgrupa pacijentkinja, sa obzirom na razliku u broju pacijentkinja koje su analizirane (8 vs. 93), a u odnosu na učestalost pozitivnog statusa Ki-67 od 75 % u pacijentkinja sa kompletnom regresijom bolesti (Tabela IV.6.4.a.), ovaj nalaz je potrebno interpretirati sa obazrivošću. Posebno su vrednosti Ki-67 značajno više ($p = 0.003$, Tabela IV.4.1.), u odnosu na istovetne vrednosti u pacijentkinje sa progresijom/stabilnom bolešću (PB/SB) na dejstvo hemioterapije (Med 0.70, IK 0.46 – 4.13), kao dijametralno suprotnom grupom u smislu terapijskog odgovora karcinoma dojke. Ovaj nalaz potvrđuje i razlika u učestalosti statusa Ki-67 između tumora dijametralno suprotnog terapijskog odgovora ($p = 0.021$, Tabela IV.6.4.b), sa nalazom odsustva pozitivnog statusa Ki-67 u pacijentkinja sa progresijom bolesti, PB/SB (Tabela IV.6.4.a).

Tumori sa kompletnom regresijom pod uticajem hemioterapije ispoljavaju povišenu ekspresiju mutiranog p53 proteina (Med 23.56, IK opseg 2.50 – 57.22), Tabela IV.4.1., značajno višu ($p = 0.044$) u odnosu na tumore u kojih je nastala parcijalna regresija (pPR; Med 0, IK opseg 0 – 16.84). U poređenju sa podgrupom pacijentkinja sa progresijom bolesti (PB/SB; Med 2.76, 0 – 21.66), nije dobijena statistički značajna razlika u vrednostima p53 proteina ($p = 0.35$, Tabela IV.4.1.); ipak, relativno mali broj pacijentkinja u analiziranim grupama nalaže obazrivu interpretaciju rezultata, a medijalne vrednosti p53 proteina koje odgovaraju ovim tumorima (pKR; 23.56 vs. PB/SB; 2.76) ukazuju na učestaliji nalaz viših vrednosti mutiranog p53 proteina u tumorima sa kompletnom regresijom.

U tumorima sa kompletnom regresijom na hemioterapiju su detektovane visoke vrednosti AI (Med 2.239, IQ 1.621 – 2.744), Tabela IV.4.1., značajno različite u odnosu na pacijentkinje sa parcijalnom regresijom tumora na terapiju, pPR ($p = 0.002$) ali koje su približne vrednostima AI u pacijentkinja sa kliničkom progresijom/stabilnom bolešću, PB/SB. S tim u vezi je saglasan nalaz, značajne razlike u učestalosti statusa (+/-) AI ($p = 0.021$, Tabela IV.6.4.b) sa većom učestalošću pozitivnog statusa AI od 88 % (Tabela IV.6.4.a.) u pacijentkinja sa kompletnom regresijom tumora u odnosu na pacijentkinje sa parcijalnom regresijom tumora na hemioterapiju. Sumarno iskazano,

dobijen je nalaz da u pacijentkinja sa tumorima koji pokazuju kompletnu regresiju na hemioterapiju, tumorski uzorci pre terapije pokazuju visoke vrednosti proliferativnog Ki-67 indeksa uporedo sa visokim vrednostima apoptotskog AI, a koji istovremeno ispoljavaju visoke vrednosti p53 proteina i snižene vrednosti bcl-2. Nije utvrđena povezanost vrednosti Ki-67 indeksa i p53 proteina, a niti sa vrednostima AI (Tabela IV.2.4.). U tumorima sa kompletnom regresijom prisutan je samo „aberantni“ fenotip p53/bcl-2 proteina (Tabela IV.7.II.1.), koji se karakteriše visokim vrednostima p53 proteina (Med 23.56; IK 3.75 – 52.95) i sniženim vrednostima bcl-2 proteina (Med 0.28, IK 0.19 – 0.84), između kojih nije utvrđena povezanost (Tabela IV.2.4).

Indeks rasta tumora u pacijentkinja sa kompletnom regresijom tumora na hemioterapiju pokazuje izrazito visoke vrednosti (Med 14.84, IK 8.25 – 27.84), posebno u odnosu na pacijentkinje sa tumorima koji ispoljavaju progresiju/stabilnu bolest ($p = 0.002$, Tabela IV.4.1.).

- Pacijentkinje sa klinički procenjenom progresijom/stabilnom bolešću na dejstvo hemioterapije – PB/SB.

U tumorima pacijentkinja sa kliničkom progresijom/stabilnom bolesti(šću) pod uticajem hemioterapije, detektovane su izrazito niske preterapijske vrednosti proliferativnog Ki-67 indeksa (Med 0.70, IK 0.46 – 4.13), u odnosu na vrednosti Ki-67 u pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora, pPR ($p = 0.010$), a naročito u poređenju sa pacijentkinjama sa kompletnom patološkom regresijom tumora na dejstvo hemioterapije, pKR ($p = 0.003$), Tabela IV.4.1.

U tom smislu, dijagram distribucije vrednosti Ki-67 indeksa (Sl.IV.3.2.1.) prikazuje suprotnu distribuciju vrednosti Ki-67 koje odgovaraju tumorima sa dijametralno različitom osetljivošću na dejstvo hemioterapije (pKR vs. PB/SB). Aproximativno, vrednost od 10 % za Ki-67 ($\log_{10}(10) = 1$) predstavlja graničnu vrednost pri čemu niže vrednosti ($Ki-67 < 10\%$) mogu označavati nisko proliferativne tumore u kojih je moguća pojava rezistencije na dejstvo hemioterapije; štaviše, rigorozna granična vrednost od 1% za Ki-67 ($\log_{10}(1) = 0$) sa izrazito niskim vrednostima Ki-67, na granici detektabilnosti, izrazito ukazuje na mogućnost izostanka terapijskog odgovora tumora. Obrnuto, vrednost $Ki-67 \geq 10\%$ ukazuje na visoko

proliferativne tumore sa mogućnošću pojave kompletne regresije tumora na dejstvo hemioterapije.

Relativno visoke vrednosti apoptotskog AI se značajno ne razlikuju između ovih suprotnih (pod)grupa pacijentkinja ($p = 0.72$) u smislu terapijskog odgovora tumora. Vrednosti AI u ovim dijametralno različitim podgrupama u odnosu na hemio-osetljivost su značajno više u odnosu na niže vrednosti AI u pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora (pPR). Vrednosti AI su slične distribucije u tumorima sa dijametralno različitom hemio-osetljivošću (Sl.IV.3.2.2.).

Saglasno tome je i nalaz značajnosti razlike u učestalosti statusa (+/-) AI između ovih dijametralno različitih tumora u pogledu terapijskog odgovora, i tumora sa parcijalnom regresijom na hemioterapiju ($p = 0.027$, $p = 0.021$, Tabela IV.6.4.b). Dodatno, vrednosti AI u svim uzorcima pacijentkinja sa progresijom/stabilnom bolešću ($n = 5$) odgovaraju pozitivnom statusu ovog biomarkera (Tabela IV.6.2., Tabela IV.6.4.a).

Sa obzirom na medijalnu vrednost p53 proteina od 2.76 (IK opseg, 0 – 21.66), iako nije dobijena statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti p53 koje su detektovane u tumorima sa kompletnom regresijom na hemioterapiju (pKR; Med 23.56, IQ 2.50 – 57.22), $p = 0.354$, Tabela IV.3.1., može se uočiti da je prisustvo p53 proteina niže u malignim ćelijama karcinoma dojke koji pokazuju kliničku progresiju bolesti. Relativno mali broj pacijentkinja u okviru poređenih (pod)grupa, eventualno može biti od uticaja na ovaj nalaz. Sumarno iskazano, tumori sa kliničkom progresijom bolesti se karakterišu sa izrazito niskim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa uporedo sa visokim vrednostima apoptotskog AI, ali i sa sniženom ekspresijom mutiranog p53 proteina. Analogno nalazu za tumore sa kompletnom regresijom na hemioterapiju, nije utvrđena povezanost vrednosti Ki-67 sa vrednostima AI, a takođe ne i sa vrednostima p53 (Tabela IV.2.4.).

Indeks rasta tumora ispoljava značajno niske vrednosti sa medijanom od 0.37 (IK, 0.28 – 1.75) u odnosu na pacijentkinje sa parcijalnom regresijom tumora (pPR; Med 10.39, 3.90 – 25.21; $p = 0.003$), a posebno u poređenju sa tumorima za koje je utvrđena kompletna regresija na dejstvo hemioterapije (pKR; Med 14.84, IK 8.25 – 27.84; $p = 0.002$), Tabela IV.4.1. Vrednost indeksa rasta tumora definisana je kao odnos proliferativnog i apoptotskog indeksa (Ki-67/AI); potrebno je ukazati na nalaz sličnih,

visokih vrednosti AI za tumore sa dijametralno suprotnim odgovorom na dejstvo hemioterapije (pKR vs. PB/SB). Grafički prikaz vrednosti indeksa rasta u odnosu na terapijski odgovor tumora (Sl. IV.3.2.3.), posebno u pacijentkinja sa suprotnom hemio-oseitljivošću pKR vs. PB/SB, sličnog je izgleda kao i distribucija vrednosti Ki-67 indeksa. S obzirom da nije utvrđena povezanost AI i terapijskog odgovora tumora ($p = 0.29$, Tabela IV.6.4.a), a kako indeks rasta predstavlja odnos vrednosti proliferativnog i apoptotskog indeksa (KI-67/AI), indirektno se može zaključiti da su vrednosti Ki-67 od dominantnog uticaja na vrednosti indeksa rasta tumora. Takođe, razlika u distribuciji vrednosti indeksa rasta između osetljivih (kPR) i rezistentnih (PB/SB) tumora, prevashodno je posledica vrednosti proliferativnog (Ki-67) indeksa. Može se indirektno pretpostaviti da su niže vrednosti indeksa rasta karcinoma dojke pacijentkinja sa progresijom bolesti na dejstvo citotoksičnih lekova, prevashodno posledica izrazito niskih vrednosti proliferativnog - Ki-67 indeksa malignih ćelija ovih tumora koje istovremeno pokazuju višu apoptotsku aktivnost - AI).

U tumorima sa progresijom bolesti na dejstvo hemioterapije, prevladuje „aberantni“ fenotip p53/bcl-2 proteina (80 %, Tabela IV.7.II.1). Utvrđena je i značajna razlika u distribuciji vrednosti Ki-67 i indeksa rasta između dijametralno suprotnih (pod)grupa pacijentkinja u pogledu hemio-oseitljivosti (pKR vs. PB/SB) a koje su analizirani samo u okviru „aberantnog“ fenotipa (Tabela IV.7.9.2.). Potvrđen je nalaz značajno nižih vrednosti Ki-67 u tumorima sa progresijom na dejstvo hemioterapije koji su praćeni sa visokim vrednostima AI (slično nalazu u tumorima sa kompletnom regresijom), što predominantno utiče na izrazito niske vrednosti indeksa rasta ovih tumora.

- Značaj biomarkera za procenu terapijskog odgovora tumora – prediktivni značaj biomarkera

Niže vrednosti Ki - 67 indeksa pre terapije, povezane su sa većom verovatnoćom izostanka odgovora tumora na dejstvo citotoksičnih lekova, odnosno sa pojavom progresije bolesti ($p = 0.0001$, Tabela IV.3.1.) dok značaj vrednosti AI za povezanost sa terapijskim odgovorom tumora nije utvrđen ($p = 0.29$). Analizom Ki-67 kao statusa (+/-), odnosno primenom medijalne vrednosti kao arbitrarne granične vrednosti za

definisane prisustva/odsustva biomarkera, status Ki-67 pokazuje prediktivnu značajnost ($p = 0.029$, Tabela IV.6.4.a.). Međutim, jasna statistička značajnost statusa Ki-67 za predikciju terapijskog odgovora tumora je utvrđena samo za tumore sa kompletnom regresijom (pKR) u poređenju sa onima koji ispoljavaju progresiju na dejstvo hemioterapije (PB/SB), $p = 0.021$, Tabela IV.6.4.b. Od značaja je da je u pacijentkinja sa progresijom bolesti nađen samo negativni status Ki-67 indeksa. Sa druge strane, status AI je povezan sa boljom patološkom regresijom tumora, odnosno poboljšanim terapijskim odgovorom ($p = 0.005$, Tabela IV.6.4.a.). Međutim, dalja analiza je pokazala da preterapijski status AI ne pokazuje značajnu razliku između ekstrema u smislu hemio-osetljivosti (pKR vs. PB/SB, $p = 1.0$, Tabela IV.6.4.b), što bitno umanjuje nalaz prediktivne vrednosti statusa AI. Istovremeno, utvrđeno je da su niže vrednosti indeksa rasta netretiranih tumora, takođe povezane sa lošijim terapijskim odgovorom tumora ($p = 0.008$, Tabela IV.3.1.). Međutim, analizom ovog parametra kao statusa (+/-), utvrđen je izraziti trend (tendencija) značajnosti statusa indeksa rasta tumora za terapijski odgovor karcinoma dojke na citotoksične lekove ($p = 0.059$, Tabela IV.6.4.). Zbog odsustva značajnosti statusa indeksa rasta između podgrupa pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora (Tabela IV.6.4.b.), status indeksa rasta nije pokazao prediktivnu vrednost. Povrh toga, povezanost Ki-67 i indeksa rasta sa terapijskim odgovorom tumora (prediktivna vrednost) je dobijen samo u situaciji snižene ekspresije tj. negativnog statusa bcl-2 proteina (Tabela IV.6.7.). Bitan nalaz je odsustvo značajne varijabilnosti vrednosti Ki-67 i indeksa rasta između tumora sa pozitivnim i negativnim statusom bcl-2 tj. u odnosu na status bcl-2 ($p = 0.22$, Tabela IV.6.8.). Saglasno tome, može biti istaknuto da se prediktivna vrednost Ki-67 i indeksa rasta tumora ispoljava u situaciji snižene ekspresije bcl-2 proteina u analiziranoj kohorti pacijentkinja sa lokalno uznapredovalim karcinomom dojke.

V DISKUSIJA

V.1. Patološka regresija tumora - terapijski odgovor karcinoma dojke na delovanje citotoksičnih lekova

Pokušaj da se predvidi osetljivost malignog tumora na odgovarajuću terapiju je kritični izazov u onkologiji, sa obzirom na to da je odgovor tumora na početni terapijski pristup povezan sa sveobuhvatnom prognozom pacijenta. Otkrivanje pouzdanih biomarkera kao pokazatelja osetljivosti ili rezistencije tumora na primenjenu terapiju, odnosno potvrđivanje njihove prediktivne vrednosti, uključuje izbor preciznog i jasnog kliničkog događaja koji čini objektivni stepen odgovora merljive bolesti na primenjenu terapiju (*eng. response rate*). Za procenu prediktivne vrednosti biomarkera kao optimalni "model" istraživanja podrazumeva se izvođenje kliničkih studija u okviru metastatskog i neoadjuvantnog modaliteta lečenja (Hamilton A. et Piccart M. 2000; Loønning PE. 2003). Uobičajena klinička praksa za procenu delotvornosti citotoksične terapije, pokazatelja terapijskog odgovora tumora, jeste primena relevantnih "krajnjih" događaja (*eng. end-points*) kao što su vreme do ponovne pojave bolesti i vreme progresije bolesti, ili smrtni ishod usled osnovne bolesti. Međutim, upotrebljivost ovih klinički bitnih događaja zahteva evaluaciju velikog broja pacijentkinja sa dugotrajnim praćenjem toka bolesti. Navedeni klinički pokazatelji terapijskog odgovora tumora uključuju ne samo efikasnost primenjene terapije, već i mnogo značajnije, konstitutivnu agresivnost tumora koja doprinosi prognostičkoj vrednosti markera (Loønning PE. 2003). Za razliku od toga, iščezavanje (nestanak) malignih ćelija predstavlja direktno i nedvosmisleno merilo efikasnog dejstva citotoksičnog načina lečenja. Kompletna patološka regresija tumora posle delovanja primarne hemioterapije kao intermedijarni „krajnji“ događaj, može se ostvariti za kratko vreme, u okviru nekoliko nedelja od započinjanja terapije. Zbog toga, neoadjuvantni klinički pristup jeste idealan okvir za procenu značajnosti biomarkera i poređenje delotvornosti citotoksičnih lekova.

Terapijski odgovor karcinoma dojke kao objektivna mera za procenu osetljivosti ili rezistencije tumorskih ćelija na citotoksične lekove se učestalo upotrebljava. U kliničkim okolnostima, odgovor tumora na dejstvo citotoksičnih lekova se utvrđuje u prosečno 70 % pacijentkinja, dok se u preostalim slučajevima pojavljuje različiti stepen

neosetljivosti tumora. Na osnovu pretpostavke da tumorski odgovor na citotoksične lekove odražava osetljivost svih malignih ćelija, lokoregionalnih i diseminovanih, može se očekivati da je terapijski odgovor tumora povezan sa kliničkim tokom bolesti. Termini, parcijalna regresija tumora (pPR) i kompletna regresija tumora (pKR), a donekle i stabilna bolest (SB) čine praktične termine koji opisuju status „zaustavljenog rasta tumora (*eng. growth arrest*). Ovi termini označavaju smanjenje tumora u određenom stepenu i izmenjenu apoptozu. Ova podgrupa pacijentkinja se može označiti - osetljivi na hemioterapiju (*eng. responders*), sa obzirom na to da tumori pokazuju delotvornost citotoksičnog leka u određenom stepenu (Loønning PE. 2003). Pacijentkinje sa klinički utvrđenom progresijom bolesti (PB) mogu predstavljati posebnu, dijametralno različitu grupu koja se jasno raspoznaje zbog makroskopskog rasta tumora, a to ukazuje da veći deo tumorske mase nije osetljiv na dejstvo primenjenih citotoksičnih lekova (Loønning PE. 2003, Aas *et al.* 2003).

Klinička procena odgovora karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova na osnovu standardizovanih kliničkih kriterijuma UICC, RECIST (Therasse *et al.* 2006) se učestalo primenjuje kao intermedijarni - „surogat“ pokazatelj za procenu daljeg kliničkog toka i ishoda bolesti. Međutim, klinička procena stepena regresije tumora usled primarne hemioterapije je manje precizna, sa obzirom na to da rezidualna tumorska masa može biti realno umanjena ili precenjena; nastala fibroza, ili smanjenje edema na mestu tumora i nejasne granice tumora otežavaju precizno određivanje rezidualne maligne komponente (Vinnicombe *et al.* 1996, Rajan *et al.* 2004). Klinička procena terapijskog odgovora tumora često nije u skladu i precizno ne odražava prisustvo maligne bolesti procenjene na osnovu patoloških kriterijuma (Kuerer *et al.* 1999). Navodi se podatak da od četiri pacijentkinje sa klinički kompletnom regresijom karcinoma dojke pod uticajem hemioterapije (nepalpabilna masa) u samo jedne od njih postoji kompletna regresija tumora na osnovu patoloških kriterijuma (Fisher *et al.* 1997). To potvrđuje superiornost procene terapijskog odgovora tumora na osnovu patoloških kriterijuma. Kompletna patološka regresija tumora kao pokazatelj terapijskog odgovora karcinoma dojke, čini se da je najpouzdaniji pokazatelj toka bolesti u odnosu na verovatnoću nastanka smrtnog ishoda, preživljanje pacijentkinja (Jones RL. *et Smith* IE. 2006).

Primenjuju se različite sheme za patološku procenu terapijskog odgovora tumora, a to dovodi do teškoća u poređenju rezultata između objavljenih studija (Tewari *et al.* 2008). Nije usaglašen metod, nisu prisutni jedinstveni patološki (makroskopsko/mikroskopski) kriterijumi za objektivnu procenu regresije karcinoma dojke na dejstvo hemiterapije u objavljenim studijama (Kuerer *et al.* 1999, Ogston *et al.* 2003, Kurosimi M. 2006; Apple SK *et al.* Suthar F. 2006; Penault-Llorca *et al.* 2008). Nekoliko predloženih klasifikacija (Sataloff *et al.* 1995, Akashi-Tanaka *et al.* 1996, Chevallier *et al.* 1993, Hoonkoop *et al.* 1997, Kuerer *et al.* 1998, Smith *et al.* 2002), razlikuje se u pristupu načina klasifikovanja stepena parcijalne regresije tumorske mase; razmatra se ili makroskopska procena tumora definisana kao promena preterapijske veličine (klinički/radiološki) u odnosu na posterapijsku - rezidualnu veličinu, ili mikroskopska procena koja uključuje stepen gubitka malignih ćelija u kombinaciji sa degenerativnim i fibroznim promenama na mestu tumora, ili se kombinuju obe ove kategorije. Koji su razlozi? Sa morfološkog aspekta, rezidualne maligne ćelije ispoljavaju karakteristične citološke promene usled dejstva citotoksičnih lekova, ali upadljivo svojstvo oštećenja ćelija u tumoru koji je osetljiv na dejstvo hemioterapije jeste sveukupni gubitak celularnosti maligne komponente. Gubitak malignih ćelija usled hemioterapije nije uvek praćen smanjenjem veličine tumora, bilo makro- ili mikroskopski, sa obzirom na to da su maligne ćelije uništene, dok fibrozna stroma ostaje (Ogston *et al.* 2003). Istraživanja su pokazala promenljiv stepen redukcije celularnosti, različitu zastupljenost malignih ćelija, uporedo sa varijabilno izraženim citološkim promenama u okviru pojedinačne kategorije rezidualnog tumora nakon dejstva hemioterapije; najizrazitije smanjenje u celularnosti maligne komponente zapaža se u rezidualnim tumorima koji su manji od 1 cm (Rajan *et al.* 2004). Zapaženo izrazito sniženje celularnosti odnosno nalaz invazivnih malignih ćelija u znatnom broju slučajeva su verovatno povezani sa manjim izmenama same veličine tumora. U pojedinim studijama se kompletna patološka regresija, u smislu kompletnog iščezavanja invazivne maligne komponente, ograničava na mesto primarnog tumora u dojci, ali bez razmatranja nalaza u regionalnim limfnim čvorovima aksile. Sa druge strane, veća je saglasnost u označavanju kompletne patološke regresije na dejstvo primarne hemioterapije, kao odsustvo rezidualne invazivne maligne komponente u tkivu dojke i regionalnim limfnim čvorovima aksile odstranjenim tokom hiruškog lečenja (Kaufmann

et al. 2006). Sa obzirom na to da je utvrđena povezanost između kompletne patološke regresije tumora i povoljnog kliničkog toka i ishoda bolesti (Ogston *et al.* 2003, Amat *et al.* 2005, Bonadonna *et al.* 1998) to je izraziti prognostički pokazatelj (Fisher *et al.* 1997, Guarneri *et al.* 2006, Bertheau *et al.* 2005) i verovatno odražava uništenje mikrometastatskih fokusa i tako doprinosi povoljnom kliničkom toku bolesti (Tewari *et al.* 2008). Istovremeno, kompletna patološka regresija ukazuje na ekstremno osetljiv karcinom dojke na dejstvo citotoksičnih lekova i nagoveštava povoljan klinički tok bolesti (Kuerer *et al.* 1999).

Na morfološkom nivou, histološke promene koje su indukovane delovanjem citotoksičnih lekova prepoznate su pre više decenija i prisutne su u tumorskom tkivu i u ne-neoplastičnom tkivu dojke i tkivu limfnih čvorova. Opisane histološke promene čine opseg od karakterističnih izmena jedara i citoplazme malignih ćelija, do degenerativnih promena i fibroze strome (Sneig *et al.* 2001). Ove histološke promene su varijabilnog intenziteta u okviru različitih mikroskopskih polja i nisu specifične u odnosu na citotoksični agens koji je delovao. Zapažena varijabilnost morfoloških promena čini histološku manifestaciju biološkog programa koji je pokrenut dejstvom hemioterapije, a potvrđuje heterogenost klonova malignih ćelija u odnosu na različitu osetljivost ćelija i tkiva na citotoksične lekove. Od značaja je da sveukupna regresija malignog tkiva, kompletna patološka regresija, pokazuje povezanost sa povoljnijim kliničkim tokom bolesti (Fisher *et al.* 1997, Guarneri *et al.* 2006, Bertheau *et al.* 2005, Chollet *et al.* 2002, Amat *et al.* 2005, Jones RL. *et Smith* IE. 2006), dok je objavljen oprečan prognostički značaj citoloških promena usled dejstva hemioterapije; izrazite citološke promene koje obično prate stepen regresije tumora mogu biti (Fisher *et al.* 2002) ili nisu povezane sa kliničkim tokom bolesti (Sneig *et al.* 2001, Ogston *et al.* 2003).

Navedeni nalazi, a u skladu sa konceptom pouzdanosti „surogat pokazatelja“ (Uvod I.2.1.), su bitne odrednice studije koja kao pouzdan „intermedijarni surogat“ primenjuje stepen patološke regresije tumora pod uticajem hemioterapije. Značaj ispitivanih biomarkera za procenu odgovora karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova, analiziran je na osnovu strogog kriterijuma za stepen kompletne regresije tumora koji podrazumeva odsustvo invazivne maligne komponente u tkivu dojke i regionalnim limfnim čvorovima (Kaufmann *et al.* 2006). Mikroskopski dokaz invazivnih malignih ćelija, bilo kojeg obima, označava kategoriju rezidualne tumorske

bolesti, a nasuprot dijametralno različitoj kategoriji rezistentnih tumora u pacijentkinja sa klinički procenjenom progresijom osnovne bolesti pod uticajem hemioterapije.

U ovoj studiji je utvrđena kompletna patološka regresija karcinoma dojke sa učestalošću od 8 % , (pKR; Tabela IV.1.1.) pod uticajem primarne hemioterapije FAC modaliteta, citotoksičnog pristupa koji se bazira na antraciklinskom leku (doxorubicinu) (Goldhirsch *et al.* 2005). Nastanak (*eng. overall rate*) kompletne regresije tumora uočen u ovoj studiji, iako u donjem delu opsega, je slične učestalosti pojave kompletne patološke regresije u prethodnim studijama koje ispituju dejstvo sličnog citotoksičnog pristupa u okviru neoadjuvantnog lečenja u pacijentkinja sa operabilnim i lokalno uznapredovalim karcinomom dojke (Kuerer *et al.* 1999, Petit *et al.* 2004, Moon *et al.* 2005, Vargas-Roig *et al.* 2008). Relativno „širok“ opseg (3 – 26 %) nalaza kompletne patološke regresije tumora pod uticajem neoadjuvantne hemioterapije, objavljen u različitim studijama, može se delimično pripisati različitim kriterijumima za procenu rezidualne tumorske mase, kao što je već navedeno. Ipak se više ukazuje da analiza varijabilnih, promenljivih grupa pacijentkinja (*eng. patient cohort*), različitih u odnosu na stepen lokalno uznapredovale bolesti (primarno operabilni ili uznapredovali karcinom dojke i inflamatorni karcinom) može imati presudan uticaj. Navodi se da je verovatnoća za postizanje kompletne regresije tumora pod uticajem primarne hemioterapije, veća za pacijentkinje sa manjim stepenom lokalno proširene bolesti, odnosno nižeg kliničkog stadijuma (Tewari *et al.* 2008). Povrh toga, raznovrsnost primenjenih citotoksičnih pristupa u objavljenim studijama, u smislu različitosti u pogledu kombinacije, sheme i doze primene leka-ova, takođe može doprineti oprečnim nalazima (Untch M. *et von Minckwitz G.* 2009). Studije su često promenljive u odnosu na analiziranu grupu pacijentkinja u pogledu stadijuma bolesti, a koje su izložene uticaju različitog citotoksičnog načina lečenja. To znatno otežava upoređivanje nalaza između objavljenih studija, a svakako je i jedan od bitnih razloga koji doprinose kontroverznosti iznetih rezultata. Otuda, neusaglašenost stavova o značaju pojedinih biomarkera u proceni osetljivosti / rezistencije karcinoma dojke na pojedini citotoksični način lečenja (predikcija), ili kao pokazatelja kliničkog toka i ishoda bolesti (prognoza) (Lønning PE. 2003, Tewari *et al.* 2008).

Istaknuto je da je najočiglednija prednost u primeni primarne hemioterapije, ne toliko rana identifikacija pacijentkinja sa izvrsnim odgovorom na dati citotoksični način

lečenja, već radije prepoznavanje slučajeva koji pokazuju minimalni odgovor, odnosno ne reaguju na terapiju (Kuerer *et al.* 1999, Chollet *et al.* 2002). U ovoj studiji je nalaz klinički procenjene progresivne (stabilne) bolesti zabeležen u svega 5 pacijentkinja (PB/SB; 5 %, Tabela IV.1.1.), kao oblik pojave rezistencije na primenjeni citotoksični način lečenja (Loønning PE. 2003). Dominantnu (pod)grupu čine pacijentkinje sa parcijalnom regresijom bolesti (pPR; 88 %, Tabela IV.1.1.) pod uticajem citotoksičnih lekova, u kojih je dostupna rezidualna maligna ćelijska populacija za dalju analizu. Ovako visok objektivni lokalni odgovor karcinoma dojke na primenjeni antraciklinski način lečenja (95 %) u ispitivanoj grupi pacijentkinja, sličan je nalazima u drugim studijama, ali čini i ograničenje za procenu povezanosti biomarkera sa terapijskim odgovorom tumora i dozvoljava da samo izraziti prediktorni činioci ispolje značajnost. U tom smislu, kao i u većini objavljenih studija u ovoj oblasti, broj pacijentkinja sa dijametralno suprotnom osetljivošću na dejstvo citotoksičnih lekova (kompletna regresija vs. progresija/stabilna bolesti), naspram grupe pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora je relativno nedovoljan.

V.2. Povezanost biomarkera - Ki-67 indeksa, AI, indeksa rasta, a i p53 i bcl-2 proteina pre primene hemioterapije, kao i njihov značaj za terapijski odgovor karcinoma dojke (prediktivna vrednost)

Preterapijske - „bazične“ vrednosti Ki-67 indeksa u analiziranoj grupi pacijentkinja, obuhvataju IK opseg od 5.18 do 24.72 (opseg 0 – 72.75), sa medijalnom vrednošću od 14.68 (Tabela IV.1.1.). Vrednosti apoptotskog indeksa (AI) detektovane pre terapije, nalaze se u IK opsegu od 0.734 do 1.818, sa Med od 1.314 (opseg 0.107 – 3.426) saglasno nalazima drugih autora, a u skladu sa niskom učestalosti merljive apoptoze u solidnim tkivima, kao što je karcinom dojke (Liponen P. 1999, Losa GA. *et* Graber R. 1998). Apoptozne ćelije se morfološki retko detektuju u tumorskim uzorcima. Kritična tačka prilikom kvantifikacije apoptoze uključuje saznanje da proces apoptoze veoma kratko traje, nezavisno od događaja kojim je pokrenut ovaj proces. Sa obzirom na to da makrofazi u kratkom vremenskom periodu odstranjuju apoptozna telašca iz tkiva *in vivo*, brzi presek (*eng. snapshot*) apoptoze koji je procenjen u bilo kojem trenutku, može potceniti sveukupni nivo smrti ćelija (Savill J. *et* Fadok V. 2000). To podrazumeva da u

statičkoj analizi *in situ*, vrlo mali broj apoptoznih ćelija koji je zapažen u datom trenutku, može ustvari, odražavati značajan doprinos ćelijskom obnavljanju odnosno fluktuaciji ćelija (Hall PA. 1999). Kvantifikacija odnosno „merljivost“ apoptoze se skoro uvek odnosi na stanje ovog parametra; pogrešno bi bilo govoriti o apoptotskoj brzini tj. stopi (*eng. apoptotic rates*). Dakle, kvantifikacija apoptoze omogućava samo „blic snimak“ odnosno trenutno stanje jednog dinamičnog procesa (Cleator *et al.* 2002).

U ispitivanoj grupi pacijentkinja, utvrđena je povezanost između vrednosti Ki-67 indeksa i AI u karcinomu dojke pre otpočinjanja terapije ($p = 0.041$, Tabela IV.2.1.) koja ukazuje da je povišena proliferativnost malignih ćelija povezana sa njihovom izrazitijom apoptotskom aktivnošću. To je u skladu sa prethodnim podacima, u smislu dosledne povezanosti Ki-67 indeksa i AI (Urruticoechea *et al.* 2005, Liponen P. 1999, Liu *et al.* 2001, Ellis *et al.* 1998, van Sloten *et al.* 1998). Ovaj nalaz ukazuje da ćelijske populacije izrazito proliferativnih tumora, takođe i nestaju vrlo brzo (Ellis *et al.* 1998, Parton *et al.* 2002, Cleator *et al.* 2002, Archer *et al.* 2003). Proliferišuće ćelije su često mnogo osetljivije na apoptozu zato što u nepovoljnim uslovima za proliferisanje, možda, neki od efektora odvijanja ćelijskog ciklusa potpomažu apoptozu. Relativno nenaglašena povezanost pokazatelja apoptoze i proliferativnosti, u ovoj studiji ($p = 0.041$, verovatnoća > 0.01), može se dovesti u vezu sa nalazom odsustva povezanosti preterapijskih vrednosti Ki-67 indeksa i AI ($p = 0.08$, Tabela IV.2.2.) u tumorima sa parcijalnom regresijom (pPR) koji čine 88 % ispitivanih uzoraka. Sa aspekta statističke evaluacije, prikazivanje značajne povezanosti između Ki-67 i AI u okviru svih preterapijskih vrednosti, verovatno je posledica nalaza izrazito visokih vrednosti Ki-67 u tumorima sa kompletnom regresijom (Med 34.77, IK opseg 18.24 – 59.94, Tabela IV.4.1.), naspram značajno nižih vrednosti Ki-67 u tumorima koji ispoljavaju progresiju pod uticajem hemioterapije (Med 0.70, IK opseg 0.46 - 4.13, $p = 0.002$), a kojima su istovremeno, pridružene slične, visoke vrednosti AI (Medijana 2.239, IK opseg 1.621 – 2.744 vs. Med 1.901, IK opseg 1.575 – 2.391, $p = 0.724$, Tabela IV.4.1.). Osnovni nalaz za pacijentkinje sa parcijalnom regresijom tumora pod uticajem hemioterapije (pPR) su „intermedijarne“ vrednosti Ki-67 pre terapije (Med 14.68, IK opseg 5.23 -23.86, Tabela IV.4.1.) kojima su pridružene značajno niže vrednosti AI (Med 1.207, IK 0.674 – 1.736), između kojih nije utvrđena međusobna povezanost.

Prediktivni faktor je mera (statistička varijabla) koja je povezana sa doprinosom ili odsustvom koristi na primenjenu terapiju (Hayes *et al.* 1998, 2005). Grafički prikaz vrednosti Ki-67 u odnosu na terapijski odgovor tumora (Sl.IV.3.1.) pokazuje dijametralnu, suprotnu distribuciju vrednosti Ki-67 između tumora sa kompletnom regresijom i tumora sa progresijom na dejstvo hemioterapije. Distribucija vrednosti Ki-67 ukazuje da, aproksimativno, vrednost od 10 %, ili još izrazitije od 1 % ($\log_{10} 1 = 0$) može biti granična vrednost koja ukazuje na nisko proliferativne tumore sa mogućnošću pojave rezistencije tumora na dejstvo citotoksične terapije. To potvrđuje i nalaz prediktivne značajnosti statusa Ki-67 ($p = 0.029$, Tabela IV.6.4.a). Odsustvo pozitivnog statusa ovog markera u tumorima koji su ispoljili progresiju na dejstvo hemioterapije (Tabela IV.6.2., IV.6.4.a) jeste bitna razlika u učestalosti statusa Ki-67 indeksa između tumora dijametralno različite hemio-osetljivosti (pKR vs. PB/SB, $p = 0.021$, Tabela IV.6.4.b). Saglasno tome, statistički značajna korelacija vrednosti Ki-67 indeksa sa terapijskim odgovorom karcinoma dojke ($\rho = -0.362$, $p = 0.0001$, Tabela IV.3.1.), ukazuje da su niže vrednosti Ki-67 povezane sa većom verovatnoćom izostanka odgovora tumora na dejstvo citotoksičnih lekova. Sa druge strane, nađeno je odsustvo povezanosti vrednosti AI sa različitim terapijskim odgovorom tumora ($p = 0.29$, Tabela IV.3.1.), a to podržava grafički prikaz distribucije vrednosti AI (Sl.IV.3.2.), u smislu nalaza sličnih (viših) vrednosti u tumorima dijametralno različite hemio-osetljivosti. Međutim, analizom statusa AI dobija se prediktivna značajnost ($p = 0.005$, Tabela IV.6.4.a). Ovaj nalaz je rezultat razlike u učestalosti statusa AI između predominantne (pod)grupe tumora sa parcijalnom regresijom, u poređenju sa obe podgrupe pacijentkinja kao dijametralnom suprotnosti u odnosu na hemio-osetljivost tumora (pKR vs PB/SB; Tabela IV.6.4.a,b; Sl.IV.3.2.).

Brzina tumorskog rasta, bar delimično, zavisi od prekomerne proliferativnosti u odnosu na apoptozu. Indeks rasta tumora, predložen u cilju aproksimacije udela kojeg ovi procesi proliferativna i apoptotska aktivnost malignih ćelija mogu imati u procesu rasta tumora, dozvoljava procenu učestalosti pojave proliferacije u odnosu na apoptozu (Uvod I.5.1.). Vrednosti indeksa rasta za tumore sa kompletnom regresijom (Med 14.84, IK opseg 8.49 – 26.94) u odnosu na tumore koji ispoljavaju progresiju pod uticajem terapije (Med 0.37, IK opseg 0.30 – 0.44, Tabela IV.1.2.) sugerišu da izrazito redak događaj proliferisanja ćelija u odnosu na apoptozu, a to je karakteristika sporo rastućih

tumora, jeste odlučujući činiac za pojavu rezistencije na citotoksične lekove. Negativna prediktivna vrednost niske proliferativnosti malignih ćelija, tako je ubedljivija od pozitivne prediktivne vrednosti visoke proliferativnosti. U tom smislu je i prediktivna vrednost indeksa rasta netretiranog tumora, odnosno povezanost vrednosti indeksa rasta tumora sa stepenom patološke regresije karcinoma dojke na hemioterapiju ($p = 0.008$, Tabela IV.3.1.). Stepem korelacije terapijskog odgovora karcinoma dojke sa indeksom rasta, ipak, nije izrazitiji od povezanosti koja je dobijena ispitivanjem samo vrednosti Ki-67 indeksa ($p = 0.0001$, Tabela IV.3.1.). Grafički prikaz vrednosti indeksa rasta u podgrupama pacijentkinja sa različitim terapijskim odgovorom tumora (Sl. IV.3.3.), sličan je analognom grafičkom prikazu vrednosti Ki-67 (Sl. IV.3.1.), a to ukazuje na izrazitiji uticaj proliferativnosti od apoptoze na vrednost ovog parametra; različitost vrednosti Ki-67 indeksa (visoke vs. niske) predominantno određuje osetljivost na citotoksične lekove, uporedo sa sličnim vrednostima AI (visoke) u tumora sa suprotnom hemio-osetljivosti (pKR vs. PB/SB). Tome odgovara i nalaz da status indeksa rasta pokazuje trend značajnosti za terapijski odgovor tumora ($p = 0.059$, Tabela IV.6.4.a). Archer CD i sar. 2003, navode istovetne rezultate, zaključke o prediktivnoj vrednosti bazalnih, preterapijskih vrednosti ovih biomarkera, posebno indeksa rasta tumora, ali ispitivanjem njihove značajnosti za terapijski odgovor karcinom dojke na hemioterapiju koji je procenjen na osnovu kliničkih kriterijuma. Potrebno je ukazati da je manji broj objavljenih studija neoadjuvantnog modaliteta hemioterapije koje razmatraju prediktivnu vrednost indeksa rasta tumora koji sumira suprotstavljene efekte apoptoze i proliferativnosti kao kritičnih procesa za rast tumora. Ova studija je, utoliko, jedinstvena u nalazu da vrednosti indeksa rasta netretiranog tumora koje predominantno odražavaju proliferativnost malignih ćelija, mogu ispoljiti prediktivnu vrednost u odnosu na stepen patološke regresije karcinoma dojke na primenjeni antraciklinski hemioterapijski pristup.

Prikazani rezultati su dobijeni univarijantnom statističkom analizom koja razmatra uticaj ispitivanih parametara kao nezavisnih varijabli, pri čemu se nema uvid u mogući uticaj drugih relevantnih faktora. Višefaktorska analiza određuje relativnu statističku značajnost svakog parametra, istovremeno procenjujući vrednost više parametara između kojih može postojati određeni stepen povezanosti. Stoga, omogućava izdvajanje nezavisnih pokazatelja terapijskog odgovora. Nezavisan

pokazatelj terapijskog odgovora (parametar predikcije) znači da ukoliko su svi ostali (analizirani) parametri konstantni, odnosno neizmenjeni, tada promena vrednosti nezavisnog parametra značajno menja ishod terapijskog odgovora. U ovoj studiji višefaktorska analiza nije primenjena, sa obzirom na mali uzorak suprotnih terapijskih (pod)grupa u pogledu hemio-osetljivosti u odnosu na pacijentkinje sa rezidualnim tumorom, zbog statističke jačine.

Prikazani rezultati podržavaju opšti koncept da tumori sa povišenom proliferativnošću ispoljavaju veću osetljivost na dejstvo citotoksičnih lekova (Remvikos *et al.* 1989, Vincent-Salomon *et al.* 2004), a koje podržavaju *in vitro* istraživanja o dejstvenosti citotoksičnih lekova na brzo proliferišuće ćelije (Drewinko *et al.* 1981), uključujući i dejstvo doxorubicina na ćelijske linije karcinoma dojke (Campiglio *et al.* 2003). Ovi rezultati su u skladu sa objavljenim studijama koje izводе zaključak da je povišena proliferativna aktivnost malignih ćelija pre terapije, povezana sa povoljnijim terapijskim odgovorom karcinoma dojke koji je procenjen na osnovu patoloških (Colleoni *et al.* 1999, Wang *et al.* 2002, Pohl *et al.* 2003, Faneyete *et al.* 2003, Ogston *et al.* 2004, Vincent-Salomon *et al.* 2004, Prisack *et al.* 2005, Bozzeti *et al.* 2006, Penault-Llorca *et al.* 2008, Fasching *et al.* 2011) ili kliničkih kriterijuma (MacGrogan *et al.* 1996, Chang *et al.* 2000, Parton *et al.* 2002, Archer *et al.* 2003, Petit *et al.* 2004, Bozzeti *et al.* 2006). Naglašava se da visoka „bazična“ proliferativnost, vrednosti Ki-67 > 20 % (Petit *et al.* 2004), a i više od 40 % (Mauriac *et al.* 1999) doprinose poboljšanom kliničkom odgovoru tumora na dejstvo hemioterapije. Štaviše, frakcija rasta malignih ćelija koja je određena ekspresijom Ki-67 antigena pre otpočinjanja terapije, izdvaja se kao „nezavisan faktor“ predikcije objektivnog terapijskog odgovora tumora (MacGrogan *et al.* 1995, Petit *et al.* 2004, Bozzeti *et al.* 2006). Nalaz da Ki-67 indeks pokazuje prediktivni značaj u ovoj kohorti pacijentkinja za procenu dejstvenosti antraciklinskog citotoksičnog načina lečenja je uporediv sa prethodnim nalazima (Petit *et al.* 2004, Vincent-Salomon *et al.* 2004, Colleoni *et al.* 1999, Faneyete *et al.* 2003, Campiglio *et al.* 2003, Prisack *et al.* 2005, Bozzeti *et al.* 2006, Penault-Llorca F, Abrial C *et al.* 2008). Proliferativni status čini maligne ćelije osetljivijim na dejstvo citotoksičnih lekova: strukturalna oštećenja tokom DNK sinteze, a koja su indukovana izloženošću citotoksičnim kombinacijama baziranim na

antraciklinskim lekovima, snižavaju viabilnost novo nastalih malignih ćelija (Collecchi *etal.* 1998, Billgreen *et al.* 1999, Makris *et al.* 1999)

Novija istraživanja bazirana na separacionoj analizi ekspresije mnogobrojnih gena (*eng. gene set enrichment analysis*) potvrđuju da se izdvaja povišena ekspresija gena povezanih sa proliferisanjem malignih ćelija, genski zapis (*eng. gene signature*) koji se odnosi na proliferativnost izražen je (*eng. enrich*) u tumorima sa izrazitom osetljivošću na citotoksične lekove, odnosno sa kompletnom patološkom regresijom karcinoma dojke (Tordai *et al.* 2008). Istaknuto je da proliferativna aktivnost, u načelu, doprinosi osetljivosti karcinoma dojke na hemioterapiju. Obrnuto, rezistentne klonove malignih ćelija karakteriše svojstvo niske proliferativne stope (Linn *et al.* 1997).

Ipak, nije zanemarljiv broj objavljenih studija koje ne potvrđuju prediktivnu značajnost Ki-67 indeksa kao individualnog pokazatelja frakcije rasta ćelija; od studija u kojima nije utvrđena povezanost Ki-67 indeksa sa patološkom (Estévez *et al.* 2003, von Minckwitz *et al.* 2008, Lee *et al.* 2008, Zhou *al.* 2008, Burcombe *et al.* 2005, 2006) ili kliničkom regresijom karcinoma dojke (Makris *et al.* 1997, Collecchi *et al.* 1998, Chang *et al.* 2000, Bottini *et al.* 2001, Bonnefoi *et al.* 2003, Takada *et al.* 2004, Kariya *et al.* 2005, Arpino *et al.* 2005, Burcombe *et al.* 2005, 2006) pod uticajem hemioterapije, do nalaza koji ukazuju da je visoka proliferativnost povezana sa slabijim kliničkim odgovorom tumora (Aas *et al.* 2003, Sjöström *et al.* 2000). Osim već navedenih razloga koji dovode do različitosti objavljenih rezultata (kriterijumi procene terapijskog odgovora tumora, primenjen citotoksični način lečenja i karakteristike analizirane grupe pacijentkinja), dodatno, primena različitih graničnih vrednosti (*eng. cut-offs*) za definisanje statusa Ki-67 kao graničnog nivoa visoke odnosno niske proliferativnosti tumora (Spyratos *et al.* 2002.), takođe doprinose protivrečnim nalazima. Način određivanja graničnih vrednosti može biti arbitraran (unapred izabrana vrednost), dobijen na osnovu analize kliničkog toka bolesti (*eng. outcome oriented*) ili na osnovu detektovanih vrednosti biomarkera u datoj studiji (*eng. data oriented*). Nijedan od navedenih metoda ili kriterijuma za izbor granične vrednosti se ne može navesti kao najbolji pristup (Tambasco *et al.* 2010). Arbitrarni izbor granične vrednosti za Ki-67 indeks je učestao, sa izabranim vrednostima koje čine opseg od 5 do 40 %, a to onemogućava poređenje objavljenih rezultata. U tom smislu se ističe važnost evaluacije Ki-67 indeksa kao kontinuirane varijable, tj. analizom svih dobijenih vrednosti

(Urrutichea *et al.* 2005), a to je i urađeno u ovoj studiji (Tabela IV.3.1). Status Ki-67 indeksa koji je dobijen primenom medijane kao granične vrednosti („*data oriented*“ pristup), takođe potvrđuje povezanost proliferativnosti sa terapijskim odgovorom tumora u ovoj studiji ($p = 0.029$, Tabela IV.6.4.a). Međutim, razlikovanje terapijskog ishoda tumora na osnovu statusa Ki-67, utvrđuje se jedino između dijametralno različitih hemio-osetljivih tumora (pKR vs. PB/SB; $p = 0.021$, Tabela IV.6.4.b). Sa obzirom na nalaz negativnog statusa, odsustva Ki-67 u podgrupi pacijentkinja sa progresijom bolesti, a imajući u vidu mali broj pacijentkinja (5 %), ove rezultate treba interpretirati sa obazrivošću. Sa obzirom da je primenjena granična vrednost od 14.68 % (Medijana), bliska vrednosti od 20 % koja se najčešće pojavljuje kao arbitrarna granična vrednost za Ki-67 u objavljenim studijama, rezultati dobijeni u ovoj studiji se mogu smatrati uporedivim. Ali, samo u svrhu primera, u situaciji primene granične vrednosti od 20 % za Ki-67, učestalost pozitivnog statusa Ki-67 u ovoj grupi pacijentkinja ($n = 106$) je u 36 (34 %) pacijentkinja; analiza pokazuje značajnu povezanost sa terapijskim odgovorom tumora ($p = 0.014$) i mogućnošću razlikovanja pacijentkinja sa parcijalnom, od onih sa kompletnom regresijom tumora primenom statusa Ki-67 indeksa ($p = 0.042$, nije prikazano), a to odstupa od prikazanih rezultata (Tabela IV.6.4.b).

Odsustvo prediktivnog značaja preterapijskih vrednosti AI za stepen regresije tumora na dejstvo citotoksičnih lekova ($p = 0.29$, Tabela IV.3.1.), u skladu je sa nalazima većine autora koji su terapijski odgovor tumora procenjivali, predominantno na osnovu kliničkih (Frassoldati *etal.* 1997, Ellis *et al.* 1998, Kandioler-Eckersberger *et al.* 2000, Archer *et al.* 2003, Arpino *et al.* 2005, Tiezzi *et al.* 2006.), a manji broj na osnovu patoloških kriterijuma (Rein *et al.* 2000, Buchholz *et al.* 2003, Burcombe *et al.* 2006, Vargas-Roig *et al.* 2008). Sa druge strane, a saglasno detekciji značajno nižih vrednosti AI u tumorima sa parcijalnom regresijom, status AI pokazuje prediktivnu vrednost ($p = 0.005$, Tabela IV.6.4.a). Preciznije, status AI izdvaja pacijentkinje sa tumorima koji pokazuju parcijalnu regresiju u odnosu na obe podgrupe pacijentkinja, sa kompletnom regresijom tumora ($p = 0.027$) i sa progresijom bolesti ($p = 0.021$). Međutim, bitan nalaz je da preterapijske vrednosti AI, analizirane kao kontinualne vrednosti i kao status, ne doprinose razlikovanju karcinoma dojke sa izrazitom hemio-osetljivošću (pKR) naspram tumora sa rezistencijom na dejstvo citotoksičnih lekova (PB/SB) (SI.IV.3.2.3.). Zbog toga ovaj nalaz ukazuje da rezistencija tumora nije

povezana sa odsustvom apoptoze, a i da osetljivost tumora nije povezana sa prisustvom apoptoze. Slične rezultate objavljuju Kandioler-Eckersberger i sar. 2000. koji ističu da prisustvo apoptoze, pozitivan status AI jeste povezan sa neizmenjenim p53 i da oba biomarkera ukazuju na kliničku regresiju karcinoma dojke na dejstvo antraciklinske hemioterapije. Takođe Stearns *et al.* 2003. navodi da su više, „bazalne“ vrednosti AI i Ki-67 indeksa značajno povezane sa poboljšanom patološkom regresijom karcinoma dojke, ali koja je procenjena samo evaluacijom tkivnih isečaka resekovanog tkiva dojke. Rezultati ove studije ukazuju da je visoka proliferativnost pre terapije, dominantno povezana sa kompletnom patološkom regresijom tumora na primenjeni antraciklinski pristup citotoksičnog lečenja, iako može biti praćena sa visokom apoptotskom aktivnošću malignih ćelija.

U grupi pacijentkinja analiziranih u studiji, više preterapijske vrednosti AI povezane su sa višim vrednostima Ki-67 indeksa i p53 proteina (*p53 vs AI* $p = 0.009$, Tabela IV.2.1.), a sa sniženim vrednostima bcl-2 proteina (*AI vs. bcl-2*, $p = 0.0001$, Tabela IV.2.1.). Ovaj nalaz, izuzev povezanosti Ki-67 indeksa i AI, održava se i analizom podgrupe tumora sa parcijalnom regresijom na dejstvo hemioterapije (*pPR; p53 vs AI* $p = 0,036$; Sl. IV.2.2.3, *AI vs. bcl-2* $p = 0.01$, Sl.IV.2.2.1. Tabela IV.2.2.). Izrazitija apoptotska aktivnost je povezana sa povišenom ekspresijom mutiranog p53, a sa sniženom ekspresijom bcl-2 (Lipponen P. 1999, Liu *et al.* 2001, van Slooten *et al.* 1998). Sniženje ekspresije bcl-2 povezano je sa porastom vrednosti apoptotskog indeksa, a to je saglasno molekularnoj funkciji ovog proteina (Uvod I.4.I.2.) i u skladu sa nalazima drugih autora (Mustonen *et al.* 1997, van Slooten *et al.* 1998, Lipponen P. 1999, Ellis *et al.* 1998, Parton *et al.* 2002, Archer *et al.* 2003, Tiezzi *et al.* 2006, Vargas-Roig *et al.* 2008). Samo su pojedinačne studije u kojima se objavljuje odsustvo povezanosti apoptoze i ekspresije bcl-2 (Berardo *et al.* 1998). Izrazitija apoptoza u primarnom tumoru može nagoveštavati snižen prag za pokretanje apoptotskog programa koji može biti pokrenut delovanjem citotoksičnih lekova, dok nedostatak bcl-2 proteina doprinosi mogućoj sklonosti malignih ćelija prema apoptozi (Daidone *et al.* 1999), a saglasno teoretskim saznanjima o regulatornim mehanizmima apoptoze. *In vitro* nalazi na ćelijskim kulturama karcinoma dojke ukazuju da apoptoza usled dejstva doxorubicin-a nastaje u bcl-2 negativnim ćelijskim linijama (Knowlton *et al.* 1998). Sa druge strane, pokazano je da abnormalna, povišena ekspresija bcl-2 proteina ujedno sa

inhibicijom apoptoze, može biti mehanizam kojim maligne ćelije karcinoma dojke stiču agresivna svojstva - ekspresija *bcl-2* dozvoljava ćelijama da duže opstanu i na taj način doprinosi nastanku i akumulaciji genetskih poremećaja (Sierra *et al.* 2000). Paradoksalno, povišena ekspresija *bcl-2* u karcinomu dojke je povezana sa indolentnim, dobro diferentovanim tumorima, a samo retko sa tumorima agresivnijeg kliničkog toka (Hamilton A. *et Piccart M.* 2000). U tom smislu, snižena, nishodna regulacija ekspresije *bcl-2*, uglavnom, pokazuje povezanost sa nižim sadržajem steroidnih receptora, višim histološkim i nuklearnim gradusom, kao i sa višim KI-67 indeksom (Park *et al.* 2002). U ovoj studiji, nije utvrđena povezanost AI i *bcl-2* proteina u (pod)grupama pacijentkinja sa kompletnom regresijom tumora (pKR) i progresijom bolesti, PB/SB (Tabela IV.2.4.). Moguće je da ovaj nalaz odražava mali broj analiziranih pacijentkinja u ovim podgrupama pacijentkinja. Isto tako, to je razlog koji može uticati na smanjenu vrednost verovatnoće povezanosti AI i *bcl-2* u situaciji analize predominantne podgrupe tumora sa parcijalnom regresijom u odnosu na analizu svih vrednosti ($p = 0.01$, Tabela IV.2.2 vs. $p = 0.0001$, Tabela IV.2.1.). U prilog tome je i nalaz značajno niže ekspresije *bcl-2* u pacijentkinja sa kompletnom regresijom tumora (pKR; Med 0.28, IK opseg 0.18 – 1.15; Tabela IV.4.) u odnosu na pacijentkinje sa parcijalnom regresijom tumora, pPR ($p = 0.016$). Ipak, nivo ekspresije *bcl-2* u pacijentkinja sa pKR se ne razlikuje od nivoa ekspresije *bcl-2* u pacijentkinja sa progresijom bolesti (PB/SB; Med 0.70, IK opseg 0.26 – 1.50, Tabela IV.4.1) koje istovremeno ispoljavaju slične, visoke vrednosti AI.

Potrebno je ukazati na rezultat da Ki-67 indeks i indeks rasta tumora ispoljavaju prediktivnu vrednost samo u situaciji snižene ekspresije *bcl-2*, odnosno u situaciji negativnog statusa *bcl-2* (Tabela IV.6.6.). Ovaj nalaz je od statističke vrednosti, sa obzirom na to da nije utvrđena varijabilnost vrednosti Ki-67 indeksa u odnosu na nivo ekspresije *bcl-2* ($p = 0.22$, Tabela IV.6.8.). Imajući u vidu izrazitu različitost vrednosti Ki-67 između pacijentkinja sa kompletnom regresijom tumora (visoke vrednosti) i pacijentkinja sa progresijom bolesti (niske vrednosti) kao dijametralno suprotnim hemio-osetljivim tumorima, prediktivni značaj Ki-67 koji je utvrđen u situaciji snižene ekspresije *bcl-2*, u osnovi odgovara detektovanim niskim nivoima ekspresije *bcl-2* u ovim (pod)grupama tumora. Nije utvrđena povezanost ekspresije *bcl-2* sa proliferativnim indeksom (*bcl-2* vs *Ki-67*) i u situaciji analize svih vrednosti pre terapije (Tabela IV.2.1.), a niti analizom vrednosti u podgrupama pacijentkinja sa različitim

terapijskim odgovorom tumora (Tabela IV.2.2., Tabela IV.2.4.). Saglasno iznesenim rezultatima, u ovoj ispitivanoj grupi pacijentkinja, vrednosti Ki-67 i indeksa rasta tumora pokazuju povezanost sa terapijskim odgovorom tumora u situaciji snižene ekspresije bcl-2 proteina.

Neoadjuvantne studije primene citotoksičnih lekova koje su prevashodno usmerene na analizu značaja ekspresije bcl-2 u odnosu na terapijski odgovor karcinoma dojke, ukazuju da je snižena ekspresija ili odsustvo bcl-2 u netretiranim tumorima povezana sa povećanom osetljivošću tumora na dejstvo hemioterapije (Ellis *et al.* 1998, Buchholtz *et al.* 2005, Ogston *et al.* 2004, Puztai *et al.* 2004, Prisack *et al.* 2005, von Minckwitz *et al.* 2008), štaviše izdvaja se kao nezavisan parametar predikcije (Ogston *et al.* 2004, von Minckwitz *et al.* 2008). Ekspresija bcl-2 proteina detektovana u ovoj studiji, u pacijentkinja sa kompletnom regresijom tumora je izrazito snižena (pKR; Med 0.28, IK opseg 0.18 – 1.15), posebno u odnosu na pacijentkinje sa parcijalnom regresijom tumora (Tabela IV.4.). U tom kontekstu, pojedini autori prikazuju da nedostatak ekspresije bcl-2 može biti povezan sa boljom patološkom regresijom tumora na dejstvo antraciklinske hemioterapije (Ogston *et al.* 2004, Bonetti *et al.* 1998). Rezultati ove studije saglasni su sa hipotezom da odsustvo, snižena ekspresija bcl-2 može činiti maligne ćelije osetljivijim na dejstvo hemioterapije.

Ekspresija bcl-2 proteina, analizirana i kao kontinualne vrednosti i u okviru statusa (odsustvo vs. prisustvo) nije povezana sa terapijskim odgovorom karcinoma dojke na primenjeni citotoksični način lečenja (Tabela IV.3.1., Tabela IV.6.4.a). Odsustvo prediktivne vrednosti bcl-2 proteina u okviru neoadjuvantnog modaliteta hemioterapije, objavljuje većina autora koji procenjuju terapijski odgovor karcinoma dojke na osnovu kliničkih (Tiezzi *et al.* 2006, Rein *et al.* 2000, Bottini *et al.* 2000, Frassoldati *et al.* 1997, Collechi *et al.* 1998, Kariya *et al.* 2005, Vargas-Roig *et al.* 2008) ili patoloških kriterijuma (Stearns *et al.* 2003, Buchholz *et al.* 2003). Prikazan je i suprotan nalaz da povišena ekspresija bcl-2 može biti povezana sa kompletnom patološkom regresijom tumora (Schneeweiss *et al.* 2004). Sa druge strane se navodi da, uprkos odsustva značaja bcl-2 proteina za kliničku procenu terapijskog odgovora karcinoma dojke na antraciklinsku hemioterapiju, povišena ekspresija bcl-2 u post-terapijskim, rezidualnim uzorcima ukazuje na povoljniji klinički tok i ishod bolesti (Vargas-Roig *et al.* 2008). Način interpretacije imunoreaktivnosti, odnosno

nejedinstveni „scoring sistem“ za procenu detekcije ekspresije ovog proteina je jedan od često iznetih razloga za pojavu protivrečnih nalaza. Sa teorijskog aspekta, u saglasnosti sa saznanjima da je apoptotska sklonost maligne ćelije određena relativnim odnosom brojnih članova bcl-2 familije (Uvod I.4.1.), a koja može bitno uticati na hemioosetljivost date ćelije, verovatno je da odnos pojedinih članova ove familije, pre, od bilo kog pojedinačnog proteina, bolje određuje sklonost ćelije ka apoptozi na stimulus kao što je dejstvo citotoksičnih lekova (Reed JC. 1999). Ipak, kliničke studije koje procenjuju međusobni odnos bcl-2 i Bax biomolekula, kao pokazatelja osetljivosti na hemioterapiju, nisu doprinele nastanku preciznijeg stava o prediktivnoj vrednosti molekula bcl-2 familije (Tewari *et al.* 2008, Cleator *et al.* 2002).

Dalja analiza povezanosti biomarkera, prikazuje pozitivnu korelaciju Ki-67 sa p53 imunoreaktivnošću, analizom svih vrednosti pre terapije (Tabela IV.2.1. *p53 vs Ki-67* $p = 0,0001$.) i vrednosti u podgrupi pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora (Tabela IV.2.2. *p53 vs Ki-67*, $p = 0.002$, Sl. IV.2.2.2.). Dakle, mutacije TP53 gena - izmenjena funkcionalnost p53 proteina povezana je sa izrazitijom proliferativnom (Ki-67) i apoptotskom aktivnošću (AI) malignih ćelija u netretiranom karcinomu dojke, saglasno prethodnim nalazima (Liu *et al.* 2001, Aas *et al.* 2003, Borensen-Dale AL. 2003). Vrednosti Ki-67 su značajno više (Med 17.72, IK opseg 9.51 – 31. 27) u tumorima koji ispoljavaju ma koji stepen p53 imunoreaktivnosti tj. pozitivni status p53 ($p = 0.013$, Tabela IV.6.8.). Ipak, Ki-67 indeks pokazuje prediktivnu značajnost nezavisno od imunoreaktivnosti p53 (Tabela IV.6.7.). Vrednosti AI su značajno više sa detekcijom p53 imunoreaktivnosti (pozitivan status p53), a značajno niže sa povišenom ekspresijom bcl-2 (pozitivan status bcl-2, Tabela IV.6.8). Visoka proliferativna aktivnost malignih ćelija može biti povezana sa inaktivacijom p53 koja može dovesti do izostanka kontrole ćelijskog ciklusa na G1/S kontrolnoj tački i/ili inhibicije izlaska ćelije iz G2 faze (Uvod I.4.2.5.) sa gubitkom kontrole održanja integriteta genoma. Čini se da je apoptoza posredan ishod patološke regulacije mašinerije ćelijskog ciklusa (Evan GI. *et Vousden* KH. 2001, Uvod. I.3.1.). Izmene koje zaobilaze ili remete kontrolu ćelijskog ciklusa na kontrolnim tačkama, npr. inaktivacijom funkcije p53, često su kritičnije povezane sa povišenim apoptotskim potencijalom ćelije nego sa većom učestalošću proliferisanja (Abrams JM. *et White* MA. 2004). Još uvek su nedovoljna saznanja o tome, da li mutacije TP53 gena predstavljaju primarni uzrok povišene

proliferativnosti ili brza proliferativna aktivnost može potpomognuti nastanak mutacija, i tako povećati stopu rasta tumora (Aas *et al.* 2003).

Dodatno, u netretiranim tumorima nije utvrđena povezanost ekspresije *bcl-2* sa *p53* (*bcl-2* vs. *p53*), a niti sa *Ki-67* (*bcl-2* vs. *Ki-67*) analizom svih vrednosti (Tabela IV.2.1.) i u podgrupama tumora sa različitom osetljivošću na hemioterapiju (Tabela IV.2.2., Tabela IV.2.4.). Sa obzirom na funkcionalnu povezanost odnosno antagonističku regulaciju *bcl-2* proteina pod uticajem wt *p53* proteina (Uvod I.4.1.2., I.4.2.4.), očekivalo bi se da je prisustvo mutiranog *p53* povezano sa povišenom ekspresijom *bcl-2*. Odsustvo povezanosti ovih biomarkera u karcinomu dojke je nalaz koji je publikovan ranije u jednoj studiji (Ellis *et al.* 1998).

Ova studija prikazuje da „bazične“ vrednosti *p53* proteina kao pokazatelja izmenjenog, afunkcionalnog *p53* proteina, analizom svih vrednosti (Tabela IV.3.1.) ili kao statusa, (Tabela IV.6.4.a.) nemaju značaj za procenu patološke regresije karcinoma dojke na primenjeni citotoksični način lečenja. Odsustvo prediktivne vrednosti *p53* proteina, u saglasnosti je sa većinom objavljenih studija koje intaktnost *p53* određuju primenom IHC tehnike (MacGrogan *et al.* 1996, Makris *et al.* 1997, Frassoldati *et al.* 1997, Bonneti *et al.* 1998, Sjostrom *et al.* 2000, Stearns *et al.* 2003, Buchholz *et al.* 2003, Penault-Llorca *et al.* 2003, Pohl *et al.* 2003, Ogston *et al.* 2004, Prisack *et al.* 2005, Kariya *et al.* 2005, Tiezzi *et al.* 2006, 2007; Keam *et al.* 2007, Bo *et al.* 2008, von Minkckwitz *et al.* 2008.). Manji broj autora prikazuje oprečnu prediktivnu značajnost *p53* imunoreaktivnosti; kao biomarkera čije prisustvo doprinosi rezistenciji ćelija na različite citotoksične lekove (Bottini *et al.* 2000, Kandioler-Eckersberger *et al.* 2000, Anneli *et al.* 2003), ili čije prisustvo doprinosi povoljnijem terapijskom odgovoru karcinoma dojke (Colleoni *et al.* 1999), posebno patološki procenjene regresije tumora (Faneyte *et al.* 2003) posle primarne hemioterapije.

Učestalo se navodi da vrsta, kombinacija i doza citotoksičnih lekova koji su primenjeni čine odlučujući činilac u proceni značaja funkcionalnosti *p53* za terapijski odgovor karcinoma dojke, odnosno njegove prediktivne vrednosti. U ovoj studiji, pacijentkinje su preoperativno lečene sa 3 - 4 ciklusa kombinovanog citotoksičnog tretmana, baziranog na antraciklinskom leku doxorubicinu (5-fluorouracil /doxorubicin /ciklofosamid) - FAC kombinaciji koja odgovara „intermedijarnom“ doznom režimu. Doxorubicin ispoljava citotoksičnost raznovrsnim mehanizmom dejstva, a čini se da je

primarno dejstvo na enzim topoizomerazu II α što blokira prelazak ćelije na G2-M kontrolnoj tački ćelijskog ciklusa (Gerwitz DA. 1999), dok je timidilat sintetaza ciljno mesto dejstva 5-fluorouracil(a) koji blokira progresiju ćelije kroz S-fazu (Longley DB. 2003).

Pregled literature o prediktivnoj vrednosti p53 funkcionalnog statusa u odnosu na odgovor karcinoma dojke na preoperativnu antraciklinsku terapiju, daje protivrečne rezultate. Većina studija ne nalazi povezanost između ekspresije p53 proteina i tumorskog odgovora na antracikline (Mac Grogan *et al.* 1996, Makris *et al.* 1997, Rozan *et al.* 1998, Järvinen *et al.* 1998, Prisack *et al.* 2005). Drugi autori prikazuju da je terapijski odgovor verovatniji u pacijentkinja sa karcinomom dojke sa intaktnim - neizmenjenim TP53 genom (Aas *et al.* 2003, Geisler *et al.* 2001, Kandioler-Eckersberger *et al.* 2000). Kao interesantan nalaz, Aas *et al.* 2003. objavljuju da je visoka proliferativnost ćelija, procenjena na osnovu učestalosti mitozu a ne i Ki-67 indeksa, povezana sa rezistencijom na doxorubicin, samo u tumorima sa intaktnim TP53 genom. Suprotni nalazi ukazuju da je pojava rezistencije karcinoma dojke na dejstvo doxorubicina kao jedinog leka (Bonnefoi *et al.* 2002), ili fluorouracil / epirubicin / cyclophosphamide (FEC) tretmana (Kandioler-Eckersberger *et al.* 2000), povezana sa prisustvom mutiranog p53 proteina. Primenom tehnika za određivanje izmenjenosti p53 na nivou gena, pokazano je da specifične mutacije unutar DNK-vezujućeg domena TP53 gena (Uvod I.4.2.1.) mogu biti u vezi sa primarnom rezistencijom karcinoma dojke na doxorubicin, a ujedno sa povišenim rizikom za ponovno javljanje bolesti (*eng.relapse*) (Geisler *et al.* 2001). Kompletno sekvenciranje TP53 gena sa detektovanim mutacijama, ukazuje na rezistenciju na antracikline (FEC), ali osetljivost na taxane (Kandioler-Eckersberger *et al.* 2000). Objavljeno je da je prisustvo mutacija TP53 gena povezano sa rezistencijom na antraciklinsku hemioterapiju primenjenu u niskoj dozi (Aas *et al.* 2003, Børresen-Dale *et al.* 2003). U pacijentkinja sa metastatskim karcinomom dojke lečenih endokrinom terapijom (tamoxifen) ili prethodnom antraciklinskom hemioterapijom, nađeno je da su mutacije unutar DNK vezujućeg domena TP53 gena povezane sa rezistencijom na tamoxifen, a i sa (mada ne i statistički značajno) slabijim odgovorom tumora na antraciklinsku terapiju (Berns *et al.* 2000). Rahko i sar. 2003. iznose nalaz da je odgovor metastatskog karcinoma dojke na antraciklinsku hemioterapiju smanjen u situaciji kada se u primarnom tumoru detektuje

p53 imunoreaktivnost. Ukazano je i da status poliformizma kodona 72 (Arg/Pro), u okviru TP53 gena (Uvod I.4.2.3.), može uticati na osetljivost ćelije na hemioterapiju, tako što nezavisno od stanja izmenjenosti p53, Pro/Pro varijanta gena ispoljava manju senzitivnost na neoadjuvantnu antraciklinsku hemioterapiju (Xu *et al.* 2005).

Osim ovih studija koje prikazuju da prisustvo mutacija TP53 gena ukazuje na rezistenciju u vezi sa antraciklinskim hemioterapijskim pristupom lečenja, drugi autori navode izrazitiju osetljivost karcinoma dojke sa TP53 mutacijama na dejstvo terapije bazirane na antraciklinima. Detekcija statusa TP53 gena, primenom funkcionalne analize ovog gena koja podrazumeva analizu nivoa transkripcione aktivnosti (*eng. yeast functional assay*), za koju je izneto da detektuje 90 % od utvrđenih mutacija u karcinomu dojke (Bonnetfoi *et al.* 2002), naglašava da je prisustvo mutacija TP53 gena povezano sa osetljivošću na hemioterapiju, ukazujući na prediktivnu vrednost TP53 mutacija za postizanje kompletne patološke regresije (Bertheau *et al.* 2007). Prikazan je i kao suprotnost ovom nalazu, jasan trend pojave kompletne kliničke regresije tumora u wt p53 (neizmenjenom genu) koji je procenjen ovom metodom na dejstvo kombinovane antraciklin/taxan-ske hemioterapije (Deissler *et al.* 2004). Funkcionalnost p53, analizirana IHC metodom, odnosno povišena p53 imunoreaktivnost se povezuje sa većom osetljivošću karcinoma dojke na antraciklinsku terapiju (Colleoni *et al.* 1999, Bottini *et al.* 2000, Faneyete IF *et al.* 2003, Mieog *et al.* 2006) ili kombinovanu hemioterapiju (Anneli *et al.* 2003).

Neusaglašenost objavljenih rezultata učestalo se pripisuje metodološkim razlikama u određivanju funkcionalnog statusa TP53 gena. Detekcija mutacija TP53 gena metodom imunoenzimske reakcije (IHC) uključuje primenu različitih primarnih antitela, procedura, a i shema za interpretaciju stepena imunoreaktivnosti (*eng. score*). Nije prisutan standardni kriterijum za definisanje pozitivne (povišene) p53 imunoreaktivnosti, tako da je status p53 varijabilan: tumori koji su u jednoj studiji klasifikovani kao mutirani (izmenjeni) mogu u drugoj studiji biti označeni kao wt p53 (intaktan, neizmenjen p53). U tom smislu je i razumljiv varijabilitet nalaza učestalosti p53 imunoreaktivnosti u literaturi, od 20-50%, a po nekim autorima i do 70 % u lokalno uznapredovalom stadijumu karcinoma dojke (Børresen-Dale *et al.* 2003). Povrh toga, ne dovode sve mutacije do stabilizacije proteina (sa mogućnošću akumulacije i imunodetekcije, Uvod I.4.2.5.), a neke mutacije koje menjaju okvir čitanja (*eng.*

frameshift) ili koje dovode do prevremenih stop kodona (*eng. nonsense*), a dovode i do odsustva sinteze ili aberantne sinteze skraćenih proteina se ne detektuju sa IHC metodom i mogu doprineti pojavi lažno-negativnih rezultata (*eng. false-negative*). Pojedini autori navode učestalost i do 47 % ovih izmena TP53 gena sa posledičnim nestabilnim promenama, od svih prisutnih mutacija u karcinomu dojke. Sa druge strane, wt p53 se može akumulirati u nekim tumorima kao rezultat odgovora na DNK oštećenje, ili vezivanjem za druge ćelijske proteine, što se detektuje kao pozitivno imunoobojenje a koje nije nastalo usled mutacije TP53 gena (lažno-pozitivni nalaz). U tom smislu se navodi superiornost određivanja p53 na genskom nivou, posebno kompletno sekvenciranje TP53 gena, imajući u vidu saglasnost nalaza između p53 akumulacije na osnovu IHC detekcije i mutacija TP53 gena sekvenciranjem u manje od 75 % slučajeva (Bertheau *et al.* 2008). Međutim, analiza sekvenciranja TP53 gena je skupa, zahteva vreme i osetljiva je na kontaminaciju ne-malignim ćelijama što zahteva tkivnu mikrodisekciju. Alternativna tehnika je „*yeast functional assay*“ koja pokazuje da li komplementarna DNK p53 gena izolovana iz tumorskih ćelija ispoljava transkripcionu aktivnost, a na taj način i da li je p53 wt (intaktan) ili mutiran. Prednost ove analize je mogućnost razlikovanja tkz. „*silent*“ mutacija od onih koje remete transkripciju p53 gena, ali zahteva ukupnu RNK i svež (*eng. fresh frozen*) tkivni uzorak. Studije koje primenjuju različite tehnike, odnosno varijacije u okviru iste metode, očigledno doprinose kontroverznosti rezultata i usvajanju opšteg, postojanog stava o prediktivnoj vrednosti p53 statusa.

Sa teorijskog aspekta, aktivacija TP53 gena pokreće raznovrsne biološke odgovore koji mogu imati suprostavljene efekte za tumorski odgovor na dejstvo citotoksične terapije (McGill G. *et Fisher* DE. 1999); od reverzibilnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa (u G1 i/ili G2 fazi) u cilju ispravljanja nastalog oštećenja DNK, odnosno ireverzibilnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa (*eng. senescence*) ili mitotske katastrofe, do smrti ćelije u formi apoptoze (Uvod I.4.2.4.). Uticaj mutacija p53 u *in vivo* uslovima, odnosno njihova značajnost u kliničkim okvirima može biti određena dejstvom koji predomina (Wallace-Brouder RR *et Lowe* SW. 1999). *In vitro* istraživanja podržavaju mogućnost da mutirani p53 koji je defektan u trans-aktivacionoj funkciji, izaziva apoptozu bez indukcije zastoja ćelijskog ciklusa (Kokontis *et al.* 2001). Sa druge strane, povišena ekspresija wt p53 indukuje samo zastoj ćelijskog ciklusa

posredstvom trans-aktivacije p21 (Uvod I.4.2.5.) koja u situaciji popravke DNK oštećenja dovodi do proliferacije i obnavljanja rasta ćelija. Osim toga, zastoj ćelijskog ciklusa indukovana sa wt p53, takođe štiti ćelije od dejstva ciklofosfamida koji *in vivo* ubija brzo proliferišuće ćelije. *In vitro* istraživanja pokazuju da citotoksični lekovi koji dovode do oštećenja DNK ostvaruju citotoksičnost zavisnu od p53 i poremećaj funkcionalnog puta p53 čini mnoge humane maligne ćelije osetljivije na apoptozu usled dejstva doxorubicina (O'Connor PM. 1997, Bunz F. 1999). Bunz *et al.* (1999) izveštava da *in vitro* analiza ćelijskih kultura kolorektalnog karcinoma ukazuje da efekat defektnog p53 na osetljivost / rezistenciju ćelija dramatično varira u zavisnosti od primenjenog citotoksičnog leka; izmenjen p53 čini ćelije osetljivijim na dejstvo antraciklina, dok se ispoljava rezistentnost na dejstvo 5-fluorouracila (Uvod I.4.2.7.). Izmenjenost TP53 gena ili p21/CDKN1A kao njegovog transkripcionog regulatora koji dovode do defekta u zastoju ćelijskog ciklusa na dejstvo citotoksičnih lekova, dramatično povećavaju ćelijsku smrt usled dejstva antraciklina *ex vivo* (Bunz *et al.* 1999). U situaciji kada prisustvo mutiranog TP53 gena ne dovodi do zastoja ćelijskog ciklusa koji je indukovana oštećenjem DNK, ćelije potom slede mehanizme do nastanka mitotske katastrofe (Bunz *et al.* 1999, Castedo *et al.* 2004).

U tom kontekstu, *in vivo* (neoadjuvantne) studije, takođe ukazuju na mogućnost nastanka različitih nishodnih puteva usled aktivacije p53, zavisno od vrste, doze, i kombinacije citotoksičnih lekova, a posebno od molekularnog podtipa karcinoma dojke (Bertheau *et al.* 2008). Delovanjem terapije bazirane na antraciklinskim citotoksičnim lekovima, čini se da ćelijski odgovor posredovan neizmenjenim wt p53 dovodi do aktivacije kaskade apoptotskog programa i regresije tumora, pre nego do zastoja ćelijskog ciklusa koji u situaciji popravke DNK oštećenja dovodi do proliferacije ćelija i obnavljanja rasta tumora (Bertheau *et al.* 2008). Na taj način se ostvaruje bolji terapijski odgovor tumora sa intaktnim TP53 genom. Ipak, doza leka može biti presudna, sa obzirom na to da je objavljeno da visoke doze u kratkom vremenskom intervalu (*eng. high dose and dose-intense*) antraciklinskog citotoksičnog pristupa, mogu prvenstveno indukovati produženi zastoj ćelijskog ciklusa (Bertheau 2007, 2008). Ovakav nishodni odgovor, dozvoljava oporavak ćelija koje su oštećene citotoksičnim lekom, a i dodatno štiti ćelije od dejstva lekova koji deluju na ćelije u proliferaciji (alkilirajući agensi, 5-

fluorouracil), čime se može objasniti odsustvo terapijskog odgovora tumora sa normalnim wt p53 proteinom.

Intrigantan nalaz u ovoj studiji je da, su preterapijske vrednosti AI (visoke) i bcl-2 proteina (niske) slične, u tumorima dijametralno suprotne osetljivosti na citotoksične lekove. U tumorima sa ekstremnom hemio-osetljivošću tj. u pacijentkinja sa kompletnom regresijom tumora (pKR) su detektovane značajno više vrednosti 53 proteina (Med 23.56, IK opseg 2.50 – 57.22) uporedo sa visokim vrednostima AI i sniženom ekspresijom bcl-2, ali i sa izrazito visokim vrednostima KI-67, a to odgovora međusobnim korelacijama ovih biomarkera. Sa druge strane, u rezistentnim tumorima (PB/SB), detektuje se izrazito niska p53 imunoreaktivnost odnosno relativno intaktni p53 (Med 2.76, IK opseg 0 – 21.66), uporedo sa izrazito niskim vrednostima Ki-67 i visokim vrednostima AI, a sa niskom do intermedijarnom ekspresijom bcl-2 (Med 0.70, IK 0.26 – 1.50). Prisustvo mutiranog p53 i vrednosti proliferativnog indeksa (Ki-67 indeks) čine osnovnu razliku između tumora sa dijametralno različitom hemio-osetljivošću (kompletna regresija vs. progresija tumora) na dejstvo intermedijarnog doznog režima antraciklinske (FAC) hemioterapije.

Za prikazane rezultate moguće je navesti nekoliko obrazloženja. U studiji Bertheau i sar. 2002, 2007, naglašava se izrazita prediktivna vrednost mutiranog TP53 gena, a koja nije povezana sa tipom mutacije, za nastanak kompletne patološke regresije karcinoma dojke pod uticajem intenzivnog epirubicin/ciklofosamid citotoksičnog lečenja. Dodatna analiza genskog ekspresionog profila je pokazala da većina osetljivih tumora, odgovara „c-ERBb-2“ ili „bazalnom“ fenotipu karcinoma dojke (Bertheau *et al.* 2007), nalaz koji je saglasan sa drugim studijama koje prikazuju veću senzitivnost ovih tumora na citotoksičnu terapiju (Carey *et al.* 2007, Rouzier *et al.* 2005). Bazalni molekularni fenotip karcinoma dojke karakteriše svojstvo visoke proliferativnosti i povezanost sa pokazateljima povišene proliferativnosti kao što je Ki-67 (Rahka *et al.* 2008), a to doprinosi osetljivosti na citotoksične lekove (Banerjee *et al.* 2006). Inaktivacija funkcije p53 češće nastaje u karcinomima dojke koji ispoljavaju „bazalni“ fenotip, a i BRCA1 mutacije (Foulkes *et al.* 2004, Troester *et al.* 2006), podtipa karcinoma dojke koji je izrazito osetljiv na antraciklinsku hemioterapiju (Rouzier *et al.* 2005). Objavljen je i podatak da wt p53 indukuje apoptozu usled dejstva antraciklina u „luminalnom“ podtipu, ali ne i u „bazalnom“ podtipu karcinoma dojke (Andre F. *et*

Pusztai L. 2006). To sugerše da mutirani p53 može biti povezan sa rezistencijom u luminalnom podtipu, ali sa efikasnošću u bazalnom podtipu na dejstvo antraciklinskih citotoksičnih lekova. Imajući u vidu molekularnu heterogenost karcinoma dojke i klasifikaciju na genetski homogene (pod)tipove – fenotipove, za koje se pretpostavlja da vode poreklo od različitih progenitornih ćelija (Sorlie *et al.* 2001), posebno „bazalni“ podtip karcinoma dojke „grubo“ odgovara klinički opisanim „triple-negativnim“ tumorima koji pokazuju negativnu imunoreaktivnost za ER α , PR i c-erbB2/HER-2, a izrazitu osetljivost na citotoksične lekove (Rouzier *et al.* 2005).

U kom kontekstu se rezultati ove studije mogu uklopiti sa nalazima navedenih istraživanja? Na osnovu baze podataka ove studije, u 6 od 8 tumorskih uzoraka koji su na dejstvo citotoksične terapije ispoljili kompletnu regresiju (pKR) detektovana je p53 imunoreaktivnost, izrazito visokih vrednosti (Med 44.72, IK opseg 14.96 – 61.48, u opsegu od 5 do 92 %). Izrazita hemio-osetljivost se ispoljava u tumorima sa višim vrednostima p53 proteina odnosno sa izmenjenim p53, uporedo sa visokom proliferativnošću. Bez obzira na tačan mehanizam(e) koji su uključeni u odgovor malignih ćelija na dejstvo citotoksičnih lekova, ekstremna sezivnost tumora sa mutiranim p53 više govori u prilog hipoteze da aktivacija intaktnog TP53 gena uglavnom dovodi do blokade zastoja ćelijskog ciklusa, pre nego do aktivacije apoptotskog programa. Odnosno, u situaciji inaktivacije p53 delovanjem „intermedijarnog“ antraciklinskog pristupa hemioterapije, verovatnije je da je pokrenut apoptotski program, dok je zastoj ćelijskog ciklusa defektan; visoka proliferativnost doprinosi većoj osetljivosti na dejstvo kombinacije fluorouracil / ciklofosamid. Dodatno, studija Mieog i sar. 2006. pokazuje da pozitivan status p53 (imunoreaktivnost), predstavlja nezavisan parametar predikcije patološke i kliničke regresije karcinoma dojke na „sub-optimalnu“ dozu antraciklinske (FEC) terapije. Karakteristike tumora sa kompletnom regresijom na dejstvo hemioterapije u ovoj studiji, dodatno, opisuje nalaz negativnog sadržaja steroidnih receptora (ER α i PR) u 7/8 tumorskih uzoraka, a i visoka proliferativnost malignih ćelija. Pokazano je da Ki-67 indeks veći od 20 % nije samo pokazatelj patološki procenjene regresije karcinoma dojke (faktor predikcije) već identifikuje „triple-negativne“ karcinome sa većom verovatnoćom za dostizanjem kompletne patološke regresije tumora na dejstvo primarne hemioterapije (Darb-Esfahani *et al.* 2009). Sa obzirom na to da nije rađena

detekcija biomarkera c-erbB-2/HER-2 a niti markera bazalnog fenotipa, moguće je samo spekulirati da tumori sa kompletnom regresijom mogu „više“ odgovarati „triple-negativnom“ ili „c-erbB-2+“ odnosno „bazalnom“ fenotipu karcinoma dojke, za koje je pokazano da su povezani sa većom verovatnoćom nastanka kompletne kliničke (Carey *et al.* 2007) ili patološke regresije na antraciklinsku hemioterapiju (Rouzier *et al.* 2005). Pokazano je da je p53 imunoreaktivnost povezana sa tendencijom pojave kompletne patološke regresije u „triple-negativnim“ tumorima, sa zaključkom da p53 status može ispoljiti različitu prediktivnu vrednost za efikasnost kombinovane antraciklin/alkilirajuće hemioterapije u odnosu na različite molekularne potklase, fenotipove karcinoma dojke (Bidard *et al.* 2008). Ova postavka može činiti osnovu objašnjenja za različitost dobijenih rezultata o prediktivnoj vrednosti p53 u literaturi.

Kada se govori o istraživanjima neoadjuvantnog modaliteta primene citotoksičnog načina lečenja, nameće se pitanje da li kompletna patološka regresija samo identifikuje pacijentkinje koje imaju biološki predodređenu dobru prognozu bolesti, ili rano započinjanje sistemske terapije može izmeniti tok bolesti? Opšti stav jeste da je osetljivost tumora na delovanje citotoksičnih lekova povezan sa dužim preživljavanjem. Međutim, paradoksalno svojstvo tkz. „triple-negativnog fenotip“-a (ER α -, PR-, Her-2 -) karcinoma dojke ispoljava se u inicijalno većoj osetljivosti na citotoksične lekove koja nema uticaja na duže preživljavanje (Keam *et al.* 2007). Tumori koji ne ispoljavaju „triple-negativni“ fenotip, a i koji ne pokazuju izražen terapijski odgovor pod uticajem hemioterapije, ipak progrediraju sporije. Ova paradoksalna osobina je u skladu i sa istraživanjima „bazalnog“ podtipa karcinoma dojke, koji čini 80-90 % triple-negativnog fenotipa (Rahka *et al.* 2007), a ispoljava slično kliničko ponašanje (Sorlie *et al.* 2001). Uprkos izrazite osetljivosti na hemioterapiju, ovi podtipovi karcinoma dojke, „triple-negativni“ i „bazalni“ ispoljavaju lošiju prognozu (Carey *et al.* 2007, Banerjee *et al.* 2007.). Paradoksalno svojstvo navedenih fenotip-ova karcinoma dojke da ispoljavaju povišenu osetljivost na antraciklinsku hemioterapiju, a imaju lošu prognozu, učestalo se objašnjava povišenom sklonošću za pojavu relapsa u pacijentkinja u kojih „zaostaje“ rezidualni tumor nakon primenjene hemioterapije (Rahka *et al.* 2003, Carey *et al.* 2007).

Ispitivanje relevantnih biomarkera u cilju karakterizacije fenotipa karcinoma dojke u pacijentkinja koje su uključene u ovu studiju, a posebno u situaciji kompletne

regresije tumora na dejstvo primenjene terapije, sa analizom daljeg kliničkog toka bolesti će svakako biti predmet daljeg istraživanja koja će upotpuniti interpretaciju dobijenih rezultata.

Dodatno objašnjenje, posebno za pacijentkinje čiji su tumori rezistentni na antraciklinsku terapiju (PB/SB), odnosilo bi se na predominaciju populacije mirujućih (Go) malignih ćelija usled detekcije izrazito niskih vrednosti Ki-67 indeksa (Med 0.70, IK opseg 0.46 - 4.13) uporedo sa niskim vrednostima indeksa rasta (Med 0.37, IK opseg 0.28 – 1.75). Nishodna regulacija topoizomerase II α , ciljnog enzima dejstva antraciklina u ćelijama koje se ne dele (Morrow CS *et* Cowan KH. 2000), može doprineti neosetljivosti na primenjeni citotoksični pristup lečenja, s obzirom na značajnu proporciju mirujućih ćelija. U rezistentnim tumorima su detektovane niske vrednosti izmenjenog p53 proteina (u 2 uzorka je prisutan wt p53, a u 2 se nalaze vrednosti na granici detektabilnosti < 3 %, dok jedan uzorak pokazuje izrazitu imunoreaktivnost od 78 %), što bi ukazivalo na izraženiju intaktnost funkcionalnog puta p53, odnosno efikasniji „mehanizam ispravke“ nastalog oštećenja DNK koji može biti povezan sa zastojem ćelijskog ciklusa i sledstvenim nastavljanjem proliferisanja ćelija, što bi u krajnjem ishodu govorilo o rezistenciji na nastalo citotoksično oštećenje.

Mutacije ili izmenjena ekspresija nishodnih efektor funkcionalnog puta p53 (Bax, Bak, kaspaze-3, 9, Apaf-1) ili ushodnih regulatora (ATM, Mdm-2) je učestala, i komplikuje sliku u smislu da prisustvo wtp53 ne mora obavezno ukazivati na intaktnost funkcionalnog puta p53 (Johnstone *et al.* 2002). Mali broj analiziranih uzoraka tumora u podgrupama pacijentkinja sa tumorima dijametralno različite osetljivosti na primenjeni citotoksični način lečenja ne dozvoljava donošenje postojanijeg zaključka.

V.2.1. Značaj „dihotomnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina.

Saglasno funkcionalnoj ulozi gena uključenih u kompleksnu regulaciju apoptotskog procesa, a koji mogu biti od važnosti za fenomen osetljivosti/rezistencije tumora na dejstvo citotoksičnih lekova, analizirana je kombinovana ekspresija TP53 i bcl-2 gena (Rezultati IV.7.). P53 - (negativan) / bcl-2+ (pozitivan) status imunoreaktivnosti, zapažen kao fenotip u normalnom tkivu dojke i benignim lezijama, može biti razmatran kao „fiziološka“ kombinacija (Siziopikou KP *et* Schnitt SJ. 2000).

Za razliku od ovog fenotipa, pretpostavljeno je da „aberantne“, preostale kombinacije ekspresije bcl-2 i p53 gena, nagoveštavaju da kontrolni mehanizmi apoptoze mogu biti poremećeni. Većina tumora 69/98 (70.4 %) ispoljava „aberantni“ fenotip, Tabela IV.7.2. što bi u skladu sa polaznim gledištem ukazivalo na odsustvo fizioloških - „normalnih“ kontrolnih mehanizama koji se odnose na regulaciju ćelijske smrti u formi apoptoze. U okviru „aberantnog“ fenotipa su vrednosti bcl-2 značajno niže sa prisustvom izmenjenog p53 proteina u poređenju sa „fiziološkim“ fenotipom, a to opravdava podelu kombinovane ekspresije ovih gena na dva različita odnosno dihotomna fenotipa (Tabela IV.7.1.). Prisustvo „aberantnog“ fenotipa je povezano sa nalazom značajno viših vrednosti AI (Med 1.450, IK opseg 0.836 – 1.957; Tabela IV.7.8.1, Tabela IV.7.9.1) u odnosu na vrednosti detektovane u okviru „fiziološkog“ fenotipa. Nalaz visokih vrednosti AI u okviru aberantnog fenotipa, na nivou svih vrednosti, može se pripisati nalazu značajno viših vrednosti AI u podgrupama pacijentkinja sa tumorima koji pokazuju izrazitu osetljivost (pKR) ili rezistenciju (PB/SB) na primenjeni citotoksični način lečenja. Međutim, uticaj fenotipa p53/bcl-2 na vrednosti AI u predominantnoj podgrupi tumora sa parcijalnom regresijom na hemioterapiji (pPR) u kojoj se detektuje i „fiziološki“ fenotip, pokazuje izraziti trend značajnosti ($p = 0.053$, Tabela IV.7.9.1.), tendenciju nalaza viših vrednosti AI u okviru „aberantnog“ fenotipa, sa sličnom učestalosti statusa AI (+ vs. -) u okviru svakog od fenotipa p53/bcl-2 (Tabela IV.7.6.1.).

Tumore sa kompletnom regresijom, a i tumore sa progresijom karakteriše nalaz „aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina, a to ukazuje da prisustvo ovog fenotipa nema uticaja na osetljivost tumora na citotoksične lekove, a to dovodi u pitanje i mogućnost analize značaja fenotipa p53/bcl-2 proteina u predviđanju terapijskog odgovora tumora. Sa obzirom na to da je detektovan „aberantni“ fenotip u tumorima dijametralno različite osetljivosti na hemioterapiju, kao i na činjenicu da je ovaj fenotip preovlađujući u tumorima sa parcijalnom regresijom (67.1 %, Tabela IV.7.2.1), nalaz da dihotomni fenotip kao združeni status p53 i bcl-2 proteina nema (prediktivnu) vrednost za terapijski odgovor karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova je očekivan ($p = 0.13$, Tabela IV.7.3., kao i $p = 0.24$, *Spearman-ov test*-nije prikazano).

Značaj fenotipa p53/bcl-2 proteina u smislu povezanosti aberantnih kombinacija sa višim vrednostima Ki-67 i AI, pokazan je analizom svih vrednosti (Tabela IV.7.8.1).

Uticaj fenotipa na vrednosti Ki-67 pokazuje graničnu značajnost ($p = 0.049$), sa obzirom na odsustvo varijabilnosti ovog biomarkera između „fiziološke“ i „aberantnih“ kombinacija p53/bcl-2 (Tabela IV.9.1.). Sa druge strane, prisustvo „aberantnog“ fenotipa je jasno povezano sa višim vrednostima AI ($p = 0.009$, Tabela IV.7.8.1.) u poređenju sa vrednostima AI koje su detektovane unutar „fiziološkog“ fenotipa (Tabela IV.7.9.1.). Saglasno prethodno iznetom nalazu da na vrednosti indeksa rasta izrazitiji uticaj imaju vrednosti KI-67 indeksa, vrednosti indeksa rasta tumora, takođe, ne pokazuju varijabilitet između pojedinog od dva fenotipa p53/bcl-2 (Tabela IV.7.9.1.). Evaluacija p53 i bcl-2 proteina u vidu dihotomnog fenotipa u okviru neoadjuvantnog kliničkog modaliteta primene hemioterapije do sada nije publikovana.

U ovoj studiji nije nađena povezanost sadržaja steroidnih receptora sa terapijskim odgovorom karcinoma dojke, suprotno rezultatima prethodnih studija (Colleoni *et al.* 2000, Faneyete *et al.* 2003, Petit *et al.* 2004, Prisacs *et al.* 2005, von Minckwitz *et al.* 2008), mada ima i sličnih nalaza (Kariya *et al.* 2005). Različito metodološko određivanje sadržaja steroidnih receptora u tumorskim uzorcima koji su analizirani u ovoj studiji (biohemijska metoda, predominantno), u odnosu na IHC analizu primenjivanu u objavljenim studijama, može biti jedan od razloga za oprečnost rezultata.

Rezultati analize ove studije ukazuju na to da preterapijski parametri apoptoze, AI kao pokazatelj apoptotske aktivnosti malignih ćelija i molekularni inhibitori apoptoze, kao što je prisustvo mutiranog p53 proteina i povišena ekspresija bcl-2 proteina, nisu pouzdani pojedinačni, pokazatelji individualnog odgovora karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova antraciklinskog modaliteta hemioterapije.

V.3. Promena fenotipa malignih ćelija, okarakterisana profilom biomarkera proliferisanja i apoptoze (Ki-67, AI i indeks rasta, a i p53 i bcl-2 proteina) pod uticajem hemioterapije

Predominantnu podgrupu pacijentkinja sa parcijalnom regresijom karcinoma dojke na dejstvo hemioterapije, karakterišu značajno niže „bazične“, preterapijske vrednosti AI (Med 1.207, IK opseg 0.674 -1.736) koje su praćene sa povišenom ekspresijom bcl-2 (Med 1.74, IK opseg 0.94 – 2.58), a relativno sniženim vrednostima

p53 (Med 0, IK opseg 0 – 16.84) i „intermedijarnim“ vrednostima Ki-67 indeksa (Med 14.68, IK opseg 5.23 – 23.86), Tabela. IV.4.1. U ovoj podgrupi pacijentkinja sa preostalom tumorskom masom, rezidualnim tumorom nakon dejstva citotoksičnih lekova, a time i dostupnom malignim ćelijama posle terapije, bilo je moguće analizirati „zduružene“ uzorke, pre i posle terapije (*eng. matched paired*), u cilju procene postojanosti ili izmene fenotipa malignih ćelija pod uticajem terapije.

Rezidualne maligne ćelije mogu biti razmatrane kao relativno rezistentna populacija ćelija na dejstvo primenjenog citotoksičnog načina lečenja koja omogućava procenu eventualnih izmena bioloških svojstava ćelija u odnosu na preterapijski fenotip, okarakterisan molekularnim biomarkerima (Ellis *et al.* 1998, Loønning PE. 2003). Međutim, nije poznato da li zapažene promene odnosno karakteristike tumorskih ćelija nakon primarne hemioterapije predstavljaju samo varijaciju fenotipa malignih ćelija koje su izložene uticaju citotoksičnih lekova ili ukazuju na pojavu novih neoplastičnih klonova. Dowsett i sar. 2009. ističu da u cilju procene odgovora tumora na dejstvo određenog terapijskog pristupa, promena bazične u odnosu na postterapijsku vrednost je mnogo relevantnija.

Sa stanovišta koncepta da apoptoza predstavlja opšti obrazac smrti za tumorske ćelije podvrgnute klinički delotvornim dozama citotoksičnih lekova, odnosno klinički relevantan mehanizam tumorskog odgovora na dejstvo citotoksičnih lekova (Uvod 1.3.1.), upoređenje apoptotskih vrednosti u tumorskim uzorcima pre i nakon dejstva hemioterapije može biti značajno, jer omogućava razlikovanje „endogene“ apoptotske aktivnosti tumora od nivoa apoptotske aktivnosti koji je pokrenut dejstvom hemioterapije (Shao *et al.* 1999). Iako se nemogućnost izvođenja apoptotskog programa razmatra kao bitan obrazac pojave rezistencije na citotoksične lekove, potvrda značaja ovog mehanizma osetljivosti/rezistencije u kliničkim uslovima još uvek nije dovela do nedvosmislenog stava. Nekoliko studija je ukazalo na očigledan porast vrednosti AI odnosno indukciju apoptoze usled dejstva hemioterapije u post-terapijskim uzorcima karcinoma dojke (Frassoldati *et al.* 1997, Takada *et al.* 2004, Tiezzi *et al.* 2006). Promena AI može biti pokazatelj nivoa tumorske zaštite protiv oštećenja DNK izazvanog citotoksičnim lekovima; što je izraženija promena AI, rezistencija tumorskih ćelija je manje ispoljena (Tiezzi *et al.* 2006). Osnovni nalaz predstavlja studija Ellis i sar. 1997. koja prikazuje značajan, veći od 50 % porast vrednosti AI u tumorima nakon

24h od otpočinjanja terapije. Kasnije studije potvrđuju nalaz „rane“ indukcije apoptoze, odnosno porasta AI u okviru 24 – 48h od primene hemioterapije (Chang *et al.* 2000, Archer *et al.* 2003, Parton *et al.* 2002, Buchholz *et al.* 2003, Davis *et al.* 2003), ili nešto kasnije, 4. dana (Symmans *et al.* 2000) odnosno 7. dana nakon otpočinjanja terapije (Arpino *et al.* 2005, Tiezzi *et al.* 2006). Pojedini autori ukazuju na neusklađenu shemu promene apoptoze i proliferativnosti u toku delovanja primarne hemioterapije (Burcombe *et al.* 2006), mada je objavljeno i da AI ne pokazuje promene usled dejstva primarne hemioterapije (Vargas-Roig *et al.* 2008). Ponovljene biopsije tumora tokom primarne hemioterapije daju mogućnost procene bioloških efekata hemioterapije na tumorsko tkivo, a posebno analizu povezanosti „ranih“ promena apoptoze (i drugih biomarkera) sa terapijskim odgovorom karcinoma dojke. Objavljeni podaci, ipak, ne označavaju specifični trenutak (dan) koji je idealan za analizu tumorskih uzoraka, sa obzirom na varijabilnost apoptotskog i proliferativnog profila kao individualnog terapijskog odgovora tumora na različite citotoksične lekove. Do sada nije bilo moguće pouzdano odrediti tačan vrh („eng. peak“) odnosno trenutak ćelijskog odgovora na dejstvo citotoksičnog leka (Burcombe *et al.* 2005). Pojedini autori ukazuju da ponavljano uzimanje tumorskih uzoraka, tokom trajanja terapije, predstavlja traumatski događaj koji može uticati na promenu dinamike kliničkog toka bolesti u odnosu na pojavu recidiva bolesti i metastaza karcinoma dojke (Retsky *et al.* 2001, Baum *et al.* 2005). Navedene studije saopštavaju različitu važnost „ranih“ promena apoptoze pod uticajem hemioterapije za procenu objektivnog terapijskog odgovora karcinoma dojke; porast apoptoze, sa značajnim promenama vrednosti AI tokom hemioterapije povezan je sa boljom patološkom (Buzzholtz *et al.* 2003), ili kliničkom (Chang *et al.* 2000, Stearns *et al.* 2003, Arpino *et al.* 2005) regresijom tumora, ili povezanost nije uočena (Archer *et al.* 2003.). Iako nije utvrđena povezanost preterapijskih nivoa AI sa objektivnom regresijom tumora (Buzzholtz *et al.* 2003, Tiezzi *et al.* 2006.), više rezidualne vrednosti AI posle primarne hemioterapije povezane su sa kliničkom regresijom tumora i boljim kliničkom tokom bolesti (Shao *et al.* 1999, Takada *et al.* 2004). Ipak, objavljeni nalazi promene, prevashodno utvrđene indukcije apoptoze, sa porastom vrednosti AI usled primene raznovrsnih hemioterapijskih pristupa, upućuju na to da apoptoza čini opšti mehanizam ćelijske smrti za citotoksične lekove različitog mehanizma dejstva. Ovi rezultati mogu biti dokaz terapijskog odgovora tumora *in vivo* na dejstvo citotoksičnih

lekova i oblik modifikacije fenotipa ćelija delovanjem različitih agenasa (Cleator *et al.* 2002).

Ispitivanjem varijabiliteta vrednosti AI, u ovoj studiji, na dejstvo citotoksične terapije utvrđeno je značajno sniženje AI u rezidualnim tumorima posle hemioterapije ($p = 0.035$, Tabela IV.5.I.1.), pri čemu je medijana rezidualnih vrednosti 0.827 (IK opseg, 0.504 – 1.263) znatno niža u odnosu na početne vrednosti (Med 1.207, IK opseg 0.674 – 1.736). Za razliku od prethodno navedenih studija u kojima je utvrđen „sveukupni“ statistički porast AI na dejstvo citotoksične terapije, ova studija obuhvata analizu pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora (pPR) usled dostupnosti tumorskih uzoraka, a to može biti razlog oprečnog rezultata. Izbor trenutka analize tumorskog tkiva, u toku odnosno posle primarne hemioterapije tkz. „rano“ određivanje AI u odnosu na određivanje po završetku terapije, može biti od važnosti za kvantifikaciju porasta vrednosti AI na dejstvo hemioterapije (Archer *et al.* 2003). Većina studija razmatra promenu apoptotske aktivnosti u odnosu na objektivni terapijski odgovor na osnovu kliničkih kriterijuma, što dozvoljava analizu tumorskog tkiva u svim kategorijama terapijskog odgovora. Međutim, u pilot studiji Ellis i sar. 1998., takođe saopštavaju rezultate o značajnom „sveukupnom“ sniženju vrednosti AI i Ki-67 posle hemioterapije, ističući izrazito sniženje AI u tumorima koji pokazuju parcijalnu kliničku regresiju, ali ne i u tumorima sa kompletnom kliničkom regresijom posle hemioterapije.

Dalja analiza, pojednostavljenim izračunavanjem razlike između preterapijskih i rezidualnih vrednosti, pokazala je „apsolutno“ sniženje vrednosti AI u 52 (58 %) tumora, pri čemu je medijalna vrednost sniženja 0.636 (IK opseg, 0.222 – 1.148). Manji broj dosadašnjih studija su ispitivale promenu vrednosti biomarkera na dejstvo hemioterapije posebnim pristupom, odnosno kalkulacijom relativno/procentualne promene vrednosti biomarkera u pojedinačnog pacijenta (Deo IV.5.II.). Ovakav način izračunavanja izmene rezidualnih vrednosti biomarkera u odnosu na njihove preterapijske vrednosti, daje informaciju o smeru (sniženje/porast) i stepenu odnosno „udelu“ promene rezidualnih vrednosti u odnosu na analogne preterapijske vrednosti (Ellis *et al.* 1998, Parton *et al.* 2002, Assersohn *et al.* 2003, Vincent-Salomon *et al.* 2004, Burcombe *et al.* 2005, Dowsett *et al.* 2006). Primenom ovakvog načina analize promene vrednosti biomarkera na dejstvo hemioterapije, u ovoj studiji utvrđeno je sniženje vrednosti AI u 57 % tumorskih uzoraka posle terapije, pri čemu snižene

vrednosti „prosečno“ (medijana) čine 52 % (IK opseg, 30 - 72 %) odgovarajućih preterapijskih vrednosti (Tabela IV.5.II.1.). U situaciji sniženja rezidualnih vrednosti AI, sa nešto većom učestalošću (37 %) se detektuje sniženje od 25 % do 50 %, a u 41 % slučajeva sniženje je više od 50 % (Tabela IV.5.II.2). Suprotno, u 38 (43 %) tumora se detektuje porast vrednosti AI posle terapije, sa prosečnim porastom od 0.47 „dela“ (IK opseg, 0.20 – 0.83), Tabela IV.5.II.1., što ukazuje da su rezidualne vrednosti AI prosečno više za polovinu od analognih preterapijskih vrednosti. Porast rezidualnih vrednosti AI je ravnomeran u okviru analiziranih kvartalnih intervala, pri čemu je porast veći od 50 % detektovan u 17 (45 %) ovih tumora u odnosu na analogne vrednosti pre terapije (Tabela IV.5.II.2.). Nalaz koji ukazuje na povišenu rezidualnu apoptotsku aktivnost, sa obzirom na povezanost viših vrednosti AI sa smanjenom ekspresijom bcl-2 proteina a sa višom proliferativnošću (Ki-67), Tabela IV.2.2., može se indirektno razmatrati kao pokazatelj nepovoljnijeg kliničkog toka ovih tumora (Cleator *et al.* 2002); iako vrednosti AI nisu potvrđene kao nezavisani prognostički parametar (Lipponem P.1999, Parton *et al.* 2002). Utvrđen je trend pozitivne korelacije između preterapijskih vrednosti Ki-67 i procentualne promene vrednosti AI (*pre- Ki-67 vs. %prom. AI, n = 88, $\rho = 0.209, p = 0.051$, nije prikazano*) koja sugerise da viši preterapijski nivoi proliferativnosti pokazuju tendenciju ispoljavanja više apoptotske aktivnosti rezidualne maligne ćelijske populacije posle hemioterapije. Ovaj nalaz se može odnositi na izrazitiji efekat hemioterapije u brzo proliferativnih tumora. U skladu sa konceptom da tumori sa višom proliferativnošću ispoljavaju veću osetljivost na dejstvo hemioterapije, u tumora sa višim vrednostima Ki-67 pre terapije postoji tendencija nalaza viših rezidualnih vrednosti AI, kao pokazatelja indukcije apoptoze pod uticajem citotoksičnih lekova. Na indirektan način se može govoriti, da je visoka proliferativnost pre terapije povezana sa uspešnijim terapijskim odgovorom karcinoma dojke koji je sagledavan sa aspekta apoptotske aktivnosti, a to pojačava prediktivnu vrednost Ki-67 indeksa. Utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između preterapijskih vrednosti AI i vrednosti procentualne promene Ki-67 indeksa (*pre- AI vs. %prom. AI, n = 91, $\rho = 0.262, p = 0.012$, nije prikazano*) što ukazuje da je viša apoptoza pre terapije povezana sa porastom proliferativnosti u rezidualnim tumorskim uzorcima posle terapije.

S obzirom na „sveukupno“ značajno sniženje vrednosti apoptotskog indeksa, očekivao bi se nalaz promene ekspresije bcl-2 i statusa p53 posle hemioterapije. Međutim, nije utvrđena statistički značajna promena njihovih vrednosti što može ukazivati da mutacije p53, a i ekspresija bcl-2 gena predstavljaju stabilan fenotip malignih ćelija na delovanje hemioterapije (Tabela IV.4.I.1.). Sugerisano je da oštećenje DNK usled dejstva citotoksičnih lekova može predisponirati nastanak onkogenih mutacija, prvenstveno TP53 (Bottini *et al.* 2000). Uvidom u bazu podataka, od 55 (93) tumora u kojih je detektovan wt p53 pre terapije, u 11 (55) se detektuje „shift“ – pomak ka nastanku mutiranog p53, a u ostalih 44 (55) uzoraka je status p53 neizmenjen (wt p53, vrednost = 0); u tumorima sa mutacijom p53 se ne utvrđuje značajna promena vrednosti imunoreaktivnosti ($p = 0.66$, nije prikazano). Ovaj nalaz podržava koncept da prisustvo mutacija p53 na nivou rezidualne ćelijske populacije odražava, pre proces klonalne selekcije ćelija koji se odigrava u okviru populacije malignih ćelija i da nisu indukovane dejstvom 3 - 4 ciklusa primenjenog antraciklinskog hemioterapijskog pristupa. Nalaz pozitivne korelacije između viših preterapijskih vrednosti p53 i vrednosti procentualne promene indeksa rasta tumora u smeru sniženja ($p = 0.02$, Tabela IV.5.II.5. Sl.IV.5.II.1.) ukazuje da je prisustvo izmenjenog p53 pre terapije povezano sa izrazitijim sniženjem indeksa rasta tumora posle hemioterapije.

Nalaz o postojanosti fenotipa p53 i bcl-2, objavljuje većina autora koji analiziraju izmenu ekspresije bcl-2 (Colleoni *et al.* 1999, Bottini *et al.* 2000,2001, Faneyete *et al.* 2003, Stearns *et al.* 2003, Vargas-Roig *et al.* 2008, Tiezzi *et al.* 2006.) i p53 (Colleoni *et al.* 1999, Bottini *et al.* 2000, Faneyete *et al.* 2003, Stearns *et al.* 2003, Arens *et al.* 2005, Vargas-Roig *et al.* 2008) na dejstvo primarne hemioterapije. Ipak, postoje studije koje prikazuju suprotno, u smislu sniženja ekspresije bcl-2 (Koda *et al.* 2007.) odnosno porasta bcl-2 (Ellis *et al.* 1998, Frassoldati *et al.* 1997, Collecchi *et al.* 1998) posle hemioterapije. Povrh toga, nađeno je da „rano“ sniženje ekspresije bcl-2, posle 24-48 h (Buchholtz *et al.* 2003) odnosno, posle drugog ciklusa od otpočinjanja hemioterapije (von Minckwitz *et al.* 2008.) jeste povezano sa kompletnom patološkom regresijom. Promene ekspresije p53 posle hemioterapije u smislu sniženja (Tiezzi *et al.* 2006) ili, oprečno porasta (Pohl *et al.* 2003, Penault-Llorca *et al.* 2003) posebno u okviru inicijalno pozitivnog statusa p53 koje su povezane sa kliničkom regresijom

tumora (Tiezzi DG. *et al.* 2006), doprinose varijabilnosti objavljenih rezultata i nemogućnosti usvajanja postojanog stava o kliničkoj primenljivosti ovih biomarkera.

U skladu sa predloženom shemom dinamike rasta tumora, da proliferisanje malignih ćelija čini glavni protivtežni proces apoptozi (Uvod. I.5.), analiziran je varijabilitet proliferativnosti odnosno izmena Ki-67 indeksa pod uticajem citotoksičnih lekova u više studija neoadjuvantnog modela istraživanja. Takođe, nailazi se na protivrečnost objavljenih nalaza u pogledu *in vivo* efekta citotoksičnih lekova na proliferativnost, kao i u odnosu na klinički značaj uočenih izmena. Najčešće se saopštava da posle hemioterapije dolazi do sniženja Ki-67 indeksa (Makris *et al.* 1996, Ellis *et al.* 1998, Chang *et al.* 1999, Colleoni *et al.* 1999, Bottini *et al.* 2001, Faneyete *et al.* 2003, Salomon-Vincent *et al.* 2004, Aas *et al.* 2005, Takada *et al.* 2004, Burcombe *et al.* 2005, Koda *et al.* 2007, Lee *et al.* 2008). Međutim, značaj uočenog sniženja rezidualne proliferativnosti nije istovetan: sniženje Ki-67 indeksa povezano je sa kliničkom regresijom tumora, iako preterapijske vrednosti ovog biomarkera nemaju prediktivnu vrednost (Chang *et al.* 1999, Bottini *et al.* 2001), štaviše izrazitije sniženje vrednosti Ki-67 je prisutno u tumorima sa izraženijom kliničkom (Bottini *et al.* 2001, Takada *et al.* 2004) ili patološkom regresijom (Burcombe *et al.* 2005) naspram tumora sa manje izraženim sniženjem KI-67 koji pokazuju veći stepen rezistencije na hemioterapiju. Objavljeno je da sniženje Ki-67, za više od 50 % (Colleoni *et al.* 1999) ili 75 % (Burcombe *et al.* 2005) u odnosu na preterapijske nivoe, ukazuje na bolji terapijski odgovor. Različito od prethodno navedenog, redukcija proliferativnosti posle hemioterapije ne pokazuje povezanost sa kliničkom i patološkom regresijom tumora (Lee *et al.* 2008). Drugi autori prikazuju da posle primarne hemioterapije dolazi do porasta Ki-67 (Penault-Llorca F. *et al.* 2003) ili da Ki-67 čini stabilan fenotip pod uticajem hemioterapije (MacGrogan *et al.* 1996, Frassoldati *et al.* 1997, Bottini *et al.* 2000, Pohl *et al.* 2003, Arens *et al.* 2005), a to doprinosi neujednačenosti literaturnih podataka.

Neke studije su fokusirane na ispitivanje „ranih“ promena proliferativnosti pod uticajem citotoksičnih lekova, analizom Ki-67 indeksa u ponavljanim tumorskim uzorcima uzetim u različitim vremenskim intervalima tokom hemioterapije, a pod pretpostavkom da je moguće rano predvideti terapijski odgovor tumora sa detekcijom promena proliferativne frakcije tokom terapije. Opšti nalaz je redukcija ekspresije Ki-67

pod uticajem hemioterapije, ali ne i sa podjednakim kliničkim značajem; sniženje Ki-67 nakon hemio-endokrine terapije analizom citološkog materijala, daje mogućnost predikcije kliničke regresije tumora (Chang *et al.* 1999, Makris *et al.* 1999) ili „rano“ sniženje posle 24 h na biopsijskom materijalu ujedno sa sniženjem indeksa rasta tumora, nema značaja za procenu kliničkog odgovora tumora (Archer *et al.* 2003). Nadalje, pad proliferativnosti 1. 7. i 84. dana, nema značaja za kliničku procenu odgovora karcinoma dojke na antracikline (Arpino *et al.* 2005). Burcombe i sar. 2006. objavljuju da sniženje Ki-67 nakon 21. dana od početka hemioterapije ukazuje na bolji klinički odgovor tumora, ali, pri tome je nađeno da su više medijalne vrednosti Ki-67 (21. dana posle prve terapije) povezane sa poboljšanom patološkom regresijom tumora. Pokazano je da i nivo sniženja vrednosti ima uticaja: sniženje od 36 % (21.dana) je pokazatelj kliničke regresije tumora (Assersohn *et al.* 2003), odnosno sniženje Ki-67 za više od 25 % nakon prvog ciklusa hemioterapije značajno smanjuje rizik za pojavu relapsa, ali nema značaja za procenu terapijskog odgovora tumora (Billgren *et al.* 1999). Nalaz sniženja proliferativnosti se održava tokom vremena do hiruškog odstranjenja tumora (Parton *et al.* 2003, Burcombe *et al.* 2005, Arpino *et al.* 2005). Do sada nije usvojen postojan stav koji se odnosi na kliničku primenljivost „ranih“ izmena ekspresije biomarkera u toku citotoksične terapije, a nije poznato niti koji je vremenski period od otpočinjanja terapije adekvatan za analizu biomarkera.

Rezidualne vrednosti Ki-67 indeksa pod uticajem citotoksičnih lekova, u pacijentkinja analiziranih u ovoj studiji, statistički su značajno snižene u odnosu na početne, preterapijske vrednosti ($p < 0.001$, Tabela IV.5.II.1.). Vrednost medijane Ki-67 indeksa od 14.68 (IK opseg 5.23 – 23.86) je snižena do vrednosti 5.21 (IK opseg, 1.60 – 13.34). Apsolutno sniženje vrednosti je detektovano u 64 (70 %) pacijentkinja sa medijanom sniženja od 12.87 (IK opseg, 4.50 – 18.38). Procentualno sniženje vrednosti (IV.5.II.1.), pokazuje da u 73 % uzoraka nastaje medijalno sniženje vrednosti za 0.72 dela (IK opseg, min -0.5 max -0.9), odnosno da snižene vrednosti prosečno iznose 28 % (IK opseg, 10% - 50 %) od analognih vrednosti pre terapije. U približno polovini (46 %) ovih tumora, rezidualne vrednosti Ki-67 su snižene za više od 75 % (Tabela IV.5.II.2.). Redukovane vrednosti Ki-67 indeksa mogu bar, delimično biti rezultat selekcije manje proliferativne, rezidualne ćelijske populacije na dejstvo hemioterapije (Chang *et al.* 2000). Suprotno ovom analizom (Tabela IV.5.II.1.), utvrđen je porast Ki-67 indeksa u

28 (37 %) rezidualnih tumora sa medijanom „apsolutnog“ porasta od 6.26 (IK opseg, 1.83 – 10.97). Povišene vrednosti Ki-67 „prosečno“ su 1.3 puta više u odnosu na odgovarajuće preterapijske vrednosti (Med 1.3, IK opseg, 1.50 – 4.17). Porast vrednosti Ki-67 koji je veći od 100 % je najučestaliji, u 56 % rezidualnih uzoraka u kojih je detektovan porast ovog biomarkera (Tabela IV.5.II.2.).

Pomak „eng. shift“ promene AI i Ki-67 indeksa u smeru sniženja, između pre- i post- terapijskih vrednosti, analiziranih u ovoj studiji, jasno ukazuje da su ove promene izazvane preoperativnom hemioterapijom. Upadljivo snižena proliferativnost, a i apoptoza u rezidualnoj malignoj populaciji ćelija, saglasna je sa scenarijom da su sporo proliferišuće ćelije selektivno očuvane tokom dejstva citotoksičnih lekova (Ellis *et al.* 1998). Utvrđena povezanost između proliferativnosti i apoptoze u netretiranim tumorima (*Ki-67 vs. AI, p = 0.041, Tabela IV.2.1.*), dodatno pokazuje, da je ova međuzavisnost održana, čak i izrazitija nakon hemioterapije (*Ki-67 vs. AI, p = 0.016, Tabela IV.2.3., Sl.IV.2.3.4.*). To navodi na zaključak da i u ovim rezidualnim malignim ćelijama, koje se mogu smatrati rezistentnim na hemioterapiju, regulatorni kontrolni mehanizam zajednički za oba procesa - proliferativnost i apoptozu, nastavlja da održava delikatan međusobni balans. U tom smislu nameće se i pitanje, da li je sniženje proliferativnosti posle hemioterapije rezultat nishodne regulacije celokupne ćelijske populacije pokretanjem mehanizma isključenja proliferativnih regulatora usled terapije, ili odražava selekciju rezidualnih, manje proliferativnih ćelija koje su konstitutivno (*eng.intrinsically*) manje osetljive na delovanje citotoksičnih lekova i mogu biti očuvane tokom terapije (Cleator *et al.* 2002).

Smanjenje tumora u odgovoru na citotoksičnu terapiju može biti posledica značajno redukovane proliferativnosti, uporedo sa uglavnom očuvanom apoptozom. Sa obzirom na to da su tumori sa višom proliferativnošću generalno povezani sa višom apoptozom, moguće je da prosečno sniženje proliferativnosti sa preterapijski viših nivoa KI-67 na niže vrednosti može biti povezano sa višom rezidualnom apoptozom, nego u tumora u kojih sniženje do istog nivoa Ki-67 polazi sa umerenog (nižeg) nivoa (Dowsett *et al.* 2006). Moguće je da redukcija apoptoze, odnosno AI predstavlja reakciju na izraženi pad proliferativnosti. Očigledno je da je i supresija Ki-67 pod uticajem hemioterapije izrazita, ali vrlo verovatno varijabilna između pacijentkinja; to rezultira u „shemi“ postterapijskih vrednosti Ki-67, u kojoj tumori sa niskim Ki-67 na početku -

uglavnom zadržavaju nisku proliferativnost, ali tumori sa višim nivoima Ki-67 mogu ili ne moraju ispoljiti supresiju proliferativnosti do datog nivoa. Ukoliko ove izmene odslikavaju varijabilni uticaj terapije, ali sa umerenim (do blagim) kliničkim efektom na stepen regresije tumora, tada je malo verovatno da post-terapijsko određivanje vrednosti može imati veću važnost od početnog, bazičnog određivanja. Istovremeno, to nagoveštava da dinamika rasta/regresije dva tumora sa sličnim vrednostima Ki-67 posle terapije, može biti posve različita u zavisnosti od početnog odnosa proliferativnosti i apoptoze (Dowsett *et al.* 2006.). U tom smislu je i nalaz sniženja Ki-67 u 73 % , a porasta AI u 43 % tumora, pri čemu se sniženje indeksa rasta detektuje u 62 % rezidualnih tumora.

U skladu sa navedenim, a shodno konceptu da je primena proliferativnih pokazatelja kao markera osetljivosti/rezistencije tumora, usložnjena usled nesumnjivog uticaja apoptoze u dinamici rasta tumora, primena indeksa rasta tumora koji sumira suprostavljene efekte ova dva procesa,(Uvod I.5.1.) je opravdana. Rezultati analize varijabiliteta vrednosti indeksa rasta tumora (odnos KI-67/AI) pokazuju značajno sniženje vrednosti pod uticajem hemioterapije ($p = 0.008$, Tabela IV.5.I.1.). Vrednosti indeksa rasta pre terapije (Med 10.39, IK opseg 3.90 – 25.21) su snižene na vrednosti (Med 8.22, IK opseg 2.29 – 14.94), Sl. IV.5.I.2., sa medijanom “apsolutnog“ sniženja od 11.4 (IK, 4.44 – 26.83). Relativno/procentualna analiza promene biomarkera (Tabela IV.5.II.1.) prikazuje sniženje vrednosti indeksa rasta u 57 (64 %) tumora, pri čemu snižene vrednosti „prosečno“ odgovaraju 0.25 „delu“ tj. čine 25 % analognih preterapijskih vrednosti (IK, 5 - 51 %). U približno polovini tumora sa detektovanim sniženjem rezidualnih vrednosti indeksa, ovo sniženje je veće od 75 % (Tabela IV.5.II.2.). U situaciji sniženja indeksa rasta tumora pod uticajem hemioterapije, više vrednosti p53 proteina pre terapije su povezane sa manje izraženim sniženjem ovog parametra ($p = 0.02$, Tabela IV.5.II.5.). Dodatno, ekspresija bcl-2 pokazuje izrazitije sniženje, odnosno značajno veći pad rezidualnih u odnosu na početne, preterapijske vrednosti u situaciji sniženja indeksa rasta rezidualnog tumora ($p = 0.026$, Tabela IV.5.II.3.). Sa obzirom na to da je utvrđena negativna korelacija između preterapijskih vrednosti Ki-67 indeksa i vrednosti procentualne promene indeksa rasta tumora ($p = -0.260$, $p = 0.015$, $n = 88$, Tabela IV.2.5.2.), odnosno da su više vrednosti Ki-67 indeksa povezane sa manjim vrednostima (°) promene indeksa rasta, to ukazuje da je viša

proliferativnost netretiranih tumora povezana sa izrazitijim sniženjem indeksa rasta tumora posle terapije.

Utvrđen je porast rezidualnih vrednosti indeksa rasta u 32 (36 %) tumora (Tabela IV.5.II.1.), pri čemu su vrednosti „prosečno“ uvećane za 1.35 „puta“ (IK opseg 0.60 – 4.81) u odnosu na odgovarajuće preterapijske vrednosti. U više od polovine tumora (58 %) u kojih se detektuje porast vrednosti ovog parametra, uvećanje je više od 100 % u odnosu na početne vrednosti (Tabela IV.5.II.2.). Sa obzirom na nalaz da su više rezidualne vrednosti indeksa rasta tumora povezane sa višim post-terapijskim vrednostima p53 ($p = 0.009$, Tabela IV.2.5.1.), najverovatnije, izmenjena dinamika rasta tumora u smislu porasta indeksa rasta pod uticajem hemioterapije, prati klonalnu selekciju rezidualne maligne populacije sa izmenjenim p53.

Povrh toga, utvrđena je pozitivna korelacija između preterapijskih vrednosti AI i vrednosti procentualne promene indeksa rasta (*pre AI vs. % prom. indeksa rasta-IR*, $p = 0.0001$, Tabela IV.2.5.2.), a to ukazuje da je viša apoptotska aktivnost u tumoru pre terapije, povezana sa porastom indeksa rasta tumora posle terapije. Dalja analiza je pokazala značajnu pozitivnu korelaciju između preterapijskih vrednosti AI i procentualne promene vrednosti Ki-67 indeksa (*pre- AI vs. proc.prom. Ki-67*, $\rho = 0.262$, $p = 0.012$, nije prikazano), što sugerise da se u tumorima sa izrazitijom početnom apoptotskom aktivnošću detektuju povišene vrednosti indeksa rasta rezidualnog tumora, a kao posledica porasta proliferativnosti posle terapije. Niže rezidualne vrednosti Ki-67 su, međutim, značajno povezane sa vrednostima koje ukazuju na sniženje indeksa rasta tumora (post Ki-67 vs. IR, $\rho 0.447$, $p = 0.0001$).

Neophodno je naglasiti da je u ovoj studiji bila izvediva analiza promene fenotipa malignih ćelija koje su okarakterisane profilom biomarkera, samo u podgrupi pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora; objavljene studije prikazuju rezultate koji se odnose na različite kategorije terapijskog odgovora tumora, najčešće procenjenih na osnovu kriterijuma kliničke regresije tumora. Podgrupu pacijentkinja sa parcijalnim terapijskim odgovorom tumora koji i inače, čine predominantnu populaciju i u drugim studijama (70-90 %), čine heterogeni tumori u odnosu na stepen regresije, u smislu varijabilnog smanjenja invazivne maligne komponente sa (ili bez) citoloških degenerativnih promena, što odražava manje ili više ispoljenu osetljivost na dejstvo citotoksičnih lekova. Dalji klinički tok bolesti ovih pacijentkinja je varijabilan

(Bonadonna G. *et al.* 1998). Saglasno pregledu studija o prognostičkoj vrednosti različitih metoda procene proliferativnosti u invazivnom karcinomu dojke, povišena proliferativnost je izrazito povezana sa nepovoljnom prognozom (van Diest *et al.* 2004). Poznato je paradoksalno svojstvo visokih vrednosti Ki-67 u netretiranom tumoru na dejstvo neoadjuvantne hemioterapije, u smislu povoljnije prilike za dostizanje kompletne patološke regresije karcinoma dojke, ali i da u situaciji kada se to ne dogodi (rezidualni tumor), a održi se visoko proliferativna bolest, prognoza je izrazito loša. Pokazano je da više vrednosti Ki-67 u tumorima posle dejstva hemioterapije (Bottini *etal.* 2001, Penault-Llorca *et al.* 2003, Aas *et al.* 2005, Lee *et al.* 2008, Jones *et al.* 2009), a i manje izraženo sniženje vrednosti ovog biomarkera (Billgreen *et al.* 1999) može biti izraziti pokazatelj nepovoljnog kliničkog toka bolesti. Takada i sar. 2004. prikazuje da visoka apoptoza, sniženje proliferativnosti i nizak odnos proliferativnost/apoptoza nakon dejstva hemioterapije, ukazuju na bolju prognozu, povoljniji klinički tok bolesti. Visoke rezidualne vrednosti AI su nezavisni pokazatelj smanjene verovatnoće za ponovnu pojavu bolesti (Shao *et al.* 1999). Osborne i sar. 2006. prikazuju da u okviru „bazalnog“ fenotipa karcinoma dojke, nastaje porast medijalnih vrednosti Ki-67 nakon hemioterapije u podgrupi tumora u kojih je uočeno ponovno javljanje bolesti, suprotno od sniženja rezidualnih vrednosti Ki-67 u podgrupi „bazalnih“ tumora bez evidentiranog relapsa. Moguće je da rezidualni status Ki-67 čini kombinovanu vrednost „originalne prognostičke vrednosti“ i „terapijske prognostičke vrednosti“, dok se čini da post-terapijske vrednosti AI više mogu predstavljati „terapijsku prognostičku vrednost“ (Takada *et al.* 2004, Chang *et al.* 2000). Sa obzirom na istraživanja koja ukazuju na značajnost povišene bcl-2 ekspresije za povoljniju prognozu pacijentkinja sa karcinomom dojke (Lee *et al.* 2007, Callagy *et al.* 2008), visoka (pozitivna) ekspresija bcl-2 u rezidualnim uzorcima nakon primarne antraciklinske hemioterapije ukazuje na povoljniji klinički tok bolesti (Vargas-Roig *et al.* 2008). Prisutvo p53 imunoreaktivnosti, u netretiranom tumoru povezano je sa lošijom prognozom (Borensen-Dale *et al.* 2003, Bonnefoi *et al.* 2003). Ukoliko u pacijentkinja sa TP53 mutiranim genom izostane kompletna regresija tumora na dejstvo antraciklinske hemioterapije, njihovo preživljavanje je značajno nepovoljnije (Bertheau *et al.* 2007). U tom kontekstu, ne može se ignorisati nalaz koji pokazuje da se vrednost biomarkera menja u smislu porasta ili sniženja u datom slučaju, sa obzirom da to može ukazivati na

različiti klinički tok bolesti, odnosno dati različite informacije o prognozi pacijentkinja. Dalja analiza kliničkog toka bolesti pacijentkinja u ovoj studiji koja je usmerena na procenu značajnosti varijacije ćelijskog fenotipa (biomarkera) na dejstvo hemioterapije, a u odnosu na klinički relevantne događaje (ponovna pojava bolesti, vreme progresije metastaza i smrtni ishod) kao kliničke parametre terapijskog odgovora tumora, predstavlja imperativ. Procena prognostičkog značaja post-terapijske kinetike tumorskog rasta, indeksa rasta tumora sa konstitutivnim parametrima - apoptozom i proliferativnošću malignih ćelija, uporedo sa analizom izmena fenotipa malignih ćelija posle hemioterapije, može omogućiti sagledavanje značaja sheme modifikacije malignih ćelija pod uticajem primarne antraciklinske hemioterapije. Konačno, tip modifikacije biomarkera na dejstvo neoadjuvantne terapije može usmeriti i izbor citotoksičnih lekova u okviru adjuvantnog režima u svakom pojedinačnom slučaju, što čini individualizaciju terapijskog pristupa kao osnovni cilj translacionih istraživanja.

V.3.1. Povezanost biomarkera u okviru rezidualne populacije malignih ćelija (pPR)

U rezidualnoj populaciji malignih ćelija posle delovanja citotoksičnih lekova, zadržava se nalaz da su više vrednosti AI povezane sa smanjenom ekspresijom bcl-2 ($p = 0.016$, Tabela IV.2.3.) a i da je prisustvo mutiranog p53 povezano sa višom proliferativnošću (Ki-67) malignih ćelija ($p = 0.0001$, Tabela IV.2.3.Sl. IV.2.3.3.) slično međusobnoj povezanosti ovih biomarkera u netretiranim tumorima (Tabela IV.2.2.). Međutim, nalaz koji pokazuje da je viša proliferativnost rezidualnih ćelija povezana sa sniženom ekspresijom bcl-2 (*Ki-67 vs. bcl-2*, $p = 0.012$, Tabela IV.2.3, Sl. IV.2.3.1.), a i sa višom apoptotskom aktivnošću (*Ki-67 vs. AI*, $p = 0.016$, Sl. IV.2.3.4.) nije utvrđen na nivou preterapijskih vrednosti. Prisutan nalaz o značajnoj povezanosti redukovane ekspresije bcl-2 sa višim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa, odgovara opštem nalazu prethodnih studija, što bi indirektno ukazivalo na antiproliferativni efekat bcl-2 proteina (Ellis PA. *et al.* 1998, Bottini A *etal.* 2000, Aas T. *et al.* 2003.).

Na nivou rezidualne populacije malignih ćelija karcinoma dojke posle uticaja citotoksičnih lekova, više vrednosti Ki-67 su povezane sa višim vrednostima izmenjenog p53 proteina i višim AI, a sa sniženim vrednostima bcl-2 proteina. Saglasno ovim nalazima je i utvrđena povezanost viših vrednosti indeksa rasta tumora sa

izaraženijom imunoreaktivnošću p53 koja se detektuje u rezidualnim malignim ćelijama (IV.2.5.1.).

V.4. Pokazatelji osetljivosti/rezistencije na citotoksične lekove novije generacije

U svom ključnom radu Perou i sar. 2000. su pokazali da metoda analize ekspresije brojnih gena u tumorskim ćelijama daje potencijal za karakterizaciju heterogenosti karcinoma dojke sa mogućnošću razlikovanja molekularnih „podtipova“ karcinoma dojke, a na osnovu različitosti ekspresionog profila njihovih gena. Primenom metode hijerarhijskog grupisanja (*eng. hierarchical clustering*) u okviru analize genskog ekspresionog profila, odnosno nivoa iRNK, Sorlie i sar. 2001. daju osnovu klasifikacionog sistema karcinoma dojke u pet karakterističnih, odvojenih molekularnih (pod)tipova, fenotip-ova. Novi pristup kategorizacije karcinoma dojke predstavlja izmenu klasičnog obrasca posmatranja porekla, a posebno klasifikacije karcinoma dojke što je doprinelo savremenom razumevanju biologije ovog maligniteta. U razmatranju problema koji se odnosi na uticaj molekularne heterogenosti karcinoma dojke na prediktivnu vrednost biomarkera, čini se da je prvo značajno pitanje, procena, da li su proteini uključeni u ćelijski odgovor na hemioterapiju različiti između pojedinih podtipova karcinoma dojke (Andre *et al.* 2006.). U tom smislu, *in vitro* istraživanja ukazuju na različiti genski ekspresioni profil koji odgovara terapijskom odgovoru različitih malignih ćelija na dejstvo antraciklinskih citotoksičnih lekova; ćelijski odgovor u luminalnom podtipu uključuje više gena regulisanih aktivacijom p53, a i nastaje inhibicija većeg broja gena koji su uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa i proliferisanja. Različito, predominantna inhibicija gena koji su uključeni u procese diferencijacije, čini odgovor ćelijskih linija „bazalnog“ podtipa na dejstvo antraciklina (Troester *et al.* 2004). To navodi na zaključak da pojedinačni protein/biomarker ne mora posredovati osetljivost odnosno rezistenciju u svim potklasama karcinoma dojke. U delu diskusije koja razmatra značaj prediktivne vrednosti mutacija TP53 gena, ukazano je na mogući pristup razmatranja različitosti terapijskog odgovora karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova u odnosu na molekularni podtip.

Sa mogućnošću analize ekspresije velikog broja (više hiljada) gena u datom tumorskom uzorku, nastala je mogućnost identifikacije brojnih ekspresionih profila tj.

otisaka (*eng. signatures*), kolekcije, skupa gena koje zajednički mogu klasifikovati tumore u različite grupe (Reis-Filho *et al.* 2006). Otuda i prihvatljivost ideje primene genskog ekspresionog profila u cilju pronalaženja novih genskih otisaka (*signature*) ili markera, kao pokazatelja osetljivosti ili rezistencije tumora na dejstvo hemioterapije. Analiza ekspresionog profila multiplih gena u okviru neoadjuvantnog modaliteta primene različitih citotoksičnih pristupa lečenja, daje mnoge potencijalne razloge u prilog koncepta da specifičan ekspresioni profil/otisak može biti povezan sa različitim terapijskim odgovorom karcinoma dojke; u tom kontekstu prikazani su različiti „multigenski setovi“ odnosno otisci varijabilnih gena koji daju mogućnost predikcije kliničke (Folgueira *et al.* 2005) odnosno patološke regresije karcinoma dojke (Ayers *et al.* 2004, Gianni *et al.* 2005, Hess *et al.* 2006) na primenjene citotoksične pristupe lečenja. Pojedini autori naglašavaju značaj kvantitativne ekspresije seta proliferativnih gena kao pokazatelja kompletne patološke regresije tumora (Gianni *et al.* 2005, Tordai *et al.* 2007). Sa druge strane, zapažen je izrazito raznolik, akutni transkripcioni odgovor u toku 24-48 h od otpočinjanja terapije; specifično, nisu utvrđeni pojedinačni geni sa značajnom promenom na konstantan način tokom hemioterapije u jednom tumorskom uzorku, ali sa ekspresionim profilima koji analizirani u različitom vremenu tokom terapije istog tumora pokazuju mnogo veću sličnost, nego što su ekspresioni profili uzoraka iz različitih tumora (Buchholz *et al.* 2002). Iako studija Hannemann i sar. 2005. nije bila u mogućnosti da izdvoji „specifičan“ prediktivni otisak, odnosno dominantni genski ekspresioni profil koji može objasniti razliku u odgovoru tumora na dejstvo hemioterapije, autori prihvataju bolje okarakterisanu definiciju hemio-osetljivosti i prikazuju da tumori koji odgovaraju na neoadjuvantnu hemioterapiju ispoljavaju dramatične promene u genskom ekspresionom profilu, dok nema izmena ekspresionog profila u tumoru koji nije osetljiv.

Važnu oblast novijih istraživanja čini teorija o postojanju transformisane populacije ćelija sa mnogim svojstvima normalnih stem ćelija koje karakteriše svojstvo samo-obnavljanja (*eng. self-renewing*) i sposobnost da ispolje više specifičnih puteva diferencijacije (*eng. multilineage-specific*), a koje su označene kao kancerske stem ćelije (Ponti *et al.* 2006). Ove ćelije jesu minorni deo tumorskih ćelija i odvojene su od više diferentovanih tumorskih ćelija. Smatra se da ove kancerske stem ćelije mogu imati ulogu u nastanku i progresiji kancera, kao i u rezistenciji na konvencionalnu terapiju.

Razumevanje na koji način se hipoteza kancerskih stem ćelija može integrisati u molekularnu klasifikaciju karcinoma dojke (Perou *et al.* 2000) može, bar delimično, objasniti heterogenost karcinoma dojke (Stingl J. *et al.* 2007). Predloženo je da bazalni molekularni podtip karcinoma dojke najviše poseduje svojstva stem ćelija, odnosno, da može poticati od kancerskih stem ćelija. Sa terapijskog aspekta, poznato je da je „tradicionalna“ terapija maligniteta sposobna da smanji masu nekih tumora, ali je često nemoćna da izazove dugotrajnu kliničku remisiju bolesti, verovatno zbog nemogućnosti uništenja kancerskih stem ćelija. Aktuelne spekulacije razmatraju da manje od 0.1 % tumorske mase može biti hemio-rezistentno, zadržavajući svojstva slična stem ćelijama, a koja su sposobna da održe rast i progresiju tumora i da diferenciraju u heterogenu masu populacije tumorskih ćelija sa nastankom metastaza (Patel *et al.* 2010.). Različiti dokazi u okviru modela kancerskih stem ćelija, prikazuju konstitutivnu (*eng. intrinsic*) rezistenciju ovih ćelija na uobičajene citotoksične lekove, zbog niske proliferativne aktivnosti i odbrambenih mehanizama koji uključuju: povišenu ekspresiju gena za transportne molekule za brojne agensa iz ćelije (*eng. drug-efflux*), prisustvo detoksikacionih enzima, kapacitet za aktivnu ispravku oštećenja DNK i rezistenciju na apoptozu. Ova svojstva utiču na terapijski odgovor tumora, odnosno imaju za posledicu izostanak smanjenja populacije kancerskih stem ćelija koje mogu preživeti hemioterapiju i biti odgovorne za nastanak metastaza (Bertolini *etal.* 2010).

U okviru neoadjuvantnog modela, pokazano je da rezidualna tumorska populacija sadrži subpopulaciju kancerskih stem ćelija koja može biti detektovana markerima CD44⁺/CD24^{-low}, a koje ispoljavaju takođe i mezenhimalne karakteristike i da su verovatno odgovorne za nastanak metastaza (Creighton *et al.* 2009). Objavljeno je i da se subpopulacija kancerskih stem ćelija, ali označena markerom aldehidnom dehidrogenazom ALD1/H1, značajno povećava u rezidualnom tumoru posle primarne hemioterapije, a tumori koji ispoljavaju ovaj marker su povezani i sa manjom verovatnoćom kompletne patološke regresije (Tanei *et al.* 2009). Dodatni stepen kompleksnosti kancerskih stem ćelija, sa uticajem na terapijski odgovor tumora ili značaj tj. primenljivost detekcije ovih ćelija u predviđanju terapijskog ishoda, čini veza između epitelno - mezenhimalne tranzicije (EMT) i sticanja karakteristika stem ćelija; maligne epitelne ćelije stiču mezenhimalni fenotip, kao i svojstva stem ćelijskog fenotipa (Tomaskovic-Crook *et al.* 2009). Tokom progresije tumora, ove promene čini

se da pospešuju migraciju tumorskih ćelija kroz bazalnu membranu i invaziju u obližnju mikrosredinu. Koncept epitelno - mezenhimalne „savitljivosti“ sugerirše da kancerske stem ćelije u tumoru ne moraju biti fiksni odeljak, već subpopulacija ćelija unutar tumora u dinamičkoj ravnoteži sa drugim (ne stem) ćelijama koje u odgovoru na stimulse okružujuće mikrosredine stiču fenotip kancerskih stem ćelija (Bertolini *et al.* 2010).

Sa obzirom na kompleksnost fenomena osetljivosti/rezistencije tumora na dejstvo citotoksičnih lekova (Uvod I.1.1.) kvantitativne i /ili kvalitativne izmene ciljnog mesta dejstva citotoksičnih agenasa, čine drugi aspekt istraživanja. Topoizomeraze su enzimi čija je funkcija da razreše topološke probleme koji nastaju tokom različitih procesa metabolizma DNK (Corbett KD. *et Berger JM.* 2004). Topoizomeraza II α (topo II α) je bitna za procese odvajanja i kondenzacije hromozoma koji su replikovani, pri čemu je njena ekspresija zavisna od faze ćelijskog ciklusa; dostiže maksimum na G2/M tački prelaza ćelijskog ciklusa i opada na minimum na kraju mitoze. TopoII α predstavlja ciljni molekul dejstva, klinički značajne grupe citotoksičnih lekova koji su označeni kao inhibitori topoII, a u koje se ubrajaju antraciklini (doxorubicin, epirubicin...) i epipodofilotoksini (etopozide, tenipozide), actinomicin itd. (Li T-K *et Liu LF.* 2001). Smatra se da topoII inhibitori ostvaruju citotoksičnost putem inhibicije funkcije topoII α . *In vitro* studije su pokazale da nivo ekspresije topoII α bitno određuje osetljivost malignih ćelija na topoII-inhibitorne agense; ćelije sa niskom koncentracijom topoII α proteina su manje osetljive na dejstvo citotoksičnih lekova ove grupe, nego ćelije sa visokom koncentracijom ovog molekula. Izmenjenost gena TOP2A, u smislu amplifikacije (povećan broj kopija) ili delecije (odsustvo) što određuje nivo ekspresije proteina topoII α , identifikuje se u karcinomima dojke sa istovremenom amplifikacijom c-erbB2/HER-2 gena, u približno 90 %; izmenjenost TOP2A gena se takođe, zapaža i u tumorima bez amplifikacije HER-2, sa učestalošću i do 10 % (Järvinen 2006.). Saglasno povezanosti nivoa ekspresije topoII α i osetljivosti na citotoksične lekove grupe inhibitora-topoII, amplifikacija TOP2A gena rezultira prekomernom ekspresijom proteina topoII α , što doprinosi relativnoj osetljivosti na antraciklinske citotoksične lekove. Delecija ovog gena dovodi do značajnog smanjenja ekspresije topoII α proteina i time indukuje primarnu rezistenciju na ove lekove. Mogućnost prisustva različitih, susednih populacija ćelija sa suprotnim (amplifikacija vs. delecija) izmenama TOP2A

gena, a u okviru heterogenosti klonova malignih ćelija istog tumora, dodatno usložnjava značaj izmena ovog gena za terapijski ishod na dejstvo citotoksičnih lekova. Poznato je da je nivo proteina topoII α regulisan ćelijskom proliferacijom (Stacey *et al.* 2000), štaviše amplifikacija TOP2A gena je povezana sa prekomernom ekspresijom topoII α proteina u podgrupi visoko proliferativnih tumora (Ki-67 > 25 %), dok istovetna povezanost nije utvrđena u „sporo“ proliferišućih tumora (Durbecq *et al.* 2004).

Nadalje, prediktivna vrednost topoII α ne mora biti istovetna u svim potklasama karcinoma dojke; sa obzirom na predominantni nalaz istovremenih izmena TOP2A gena i HER-2 gena, čini se da je prediktivna vrednost topoII α posebno ispoljena u podgrupi tumora sa prekomernom ekspresijom HER-2, dok je u celokupnoj populaciji karcinoma dojke, značaj topoII α znatno umanjen (Andre *et al.* 2006). U tom smislu, rezultati kliničkih studija o osetljivosti/rezistenciji karcinoma dojke na citotoksične inhibitore-topoII, a u zavisnosti od specifičnog defekta na nivou TOP2A gena koji su učestalo povezani sa izmenama HER-2 gena, kao biomarkera za selekciju hemioterapije nisu dovele do usaglašenog stava (Järvinen TAH *et al.* 2006, Pritchard *et al.* 2008.). Ipak, ukazano je da status proteina topoII α može postati pokazatelj osetljivosti na antraciklinski citotoksični pristup hemioterapije sa velikom pouzdanošću (Di Leo *et al.* 2007).

Osim apoptoze kao forme ćelijske smrti na dejstvo citotoksičnih lekova, saznanja, na osnovu *in vitro* istraživanja prevashodno, ukazuju i na druge kompleksno regulisane mehanizme smrti ćelija u odgovoru na raznovrsne stresne stimulse, uključujući i antikancerske agense (Ricci MC. and Zong W-X. 2006): autofagiju (Amaravadi RK *and* Thompson CB. 2007, Levine B. *and* Yuan J. 2013) i nekrozu (Zong W-X. *and* Thompson CB. 2013). Smrt ćelije predstavlja složen sistem precizno kontrolisanih procesa. Nezavisno od scenarija smrti ćelije, odluka o odgovarajućem načinu smrti ćelije kao i propratne fenotipske promene uslovljene su prirodom stimulusa, genetskom osnovom same ćelije i njenim mikro-okruženjem (Fan Y-J *and* Zong W-X. 2013, Jain MV *et al.* 2013). Različiti mehanizmi smrti ćelija nisu međusobno isključivi – u određenoj situaciji mogu delovati sinergistički ali i biti međusobno suprostavljeni (Lerner-Eisenberg A *et al.* 2009). Predložen je model odgovora ćelije na stimulus kao što je hemioterapija; inicijalni odgovor je autofagija kao citoprotektivni efekat koji može biti povezan sa drugim tipom citoprotektivnog

odgovora ćelije - „senescence“, u nastojanju da ćelija opstane u neproliferativnom statusu. Sa obzirom na heterogenost populacija malignih ćelija u okviru tumora, u nekim ćelijama se mogu neposredno, usled izloženosti prekomernom stresu, pokrenuti procesi ćelijske smrti putem apoptoze ili mitototske katastrofe, a preostale ćelije mogu proći različite prelazne faze autofagije i „senescence“ procesa pre nastanka jednog od vidova smrti ćelije (Gewirtz DA. 2009). Regulatorni molekuli procesa apoptoze - p53 protein, posebno (Maiuri MC. *et al.* 2010) i bcl-2 protein (Pattingre S. and Levine B. 2006), a i Beclin-1 kao član Bcl-2 superfamilije (Kang R. *et al.* 2011) su deo regulatorne mreže procesa autofagije, a i drugih oblika zaustavljenog rasta ili smrti ćelije.

U odgovoru na oštećenje DNK, funkcionalna aktivnost p53 proteina se vezuje za zaustavljanje ćelijskog ciklusa u cilju ispravke nastalog oštećenja ili za proces apoptoze. Na odgovarajuće oštećenje, ćelije mogu odreagovati i procesom ireverzibilnog zastoja ćelijskog ciklusa (*eng. senescence*), (Shay JW *et* Roninson IB. 2004, te Poole RH. 2002). Ovaj zaustavljeni rast ćelije na delovanje terapije, citostatski efekat (*eng. therapy-induced senescence (TIS)*) (Zhang Y and Yang J-ming. 2011) usled dejstva različitih klasa citotoksičnih lekova (agensi koji dovode do dvolančanih prekida DNK – npr. doxorubicin) i γ zračenja karakterišu morfološke promene „senescence“ fenotipa; metabolički aktivne ćelije koje se ne dele, spljoštenog oblika i uvećanih dimenzija, a koje ispoljavaju imunoreaktivnost na β - galaktozidazu. *In vitro* nalazi na ćelijskim linijama karcinoma dojke (Elmore *et al.* 2002.) i analiza uzoraka karcinoma dojke (te Poole *et al.* 2002) potvrđuju da je „senescence“ program specifični obrazac odgovora malignih ćelija usled delovanja citotoksičnih agenasa. Aktivacija funkcionalnog p53 kao odgovor na DNK oštećenje u cilju zaustavljanja proliferacije oštećenih ćelija i bcl-2 se navode kao značajni proteini regulatorne mreže ovog specifičnog procesa odgovora ćelije na delovanje terapije (Crescenzi E. 2003). U slučaju tumorskih ćelija, nije precizno ustanovljeno da li je to definitivno stanje ćelije, kao u normalnim ćelijama, ili prolazno nakon kojeg može uslediti smrt ćelije posle određenog perioda zaustavljenog rasta (putem apoptoze) ili prolazno stanje sa potencijalom za proliferativni oporavak. Iako se ne dele, nereplikativne ćelije koje pokazuju „senescence“ fenotip, funkcionalno su aktivne i zadržavaju metaboličku aktivnost preko sekrecije različitih proteina, citokina i hemokina, od kojih neki mogu inhibirati (CXCR2;interleukin-8 receptor tip

B), a neki stimulisati proliferaciju obližnjih ćelija koje ne pokazuju taj proces ćelijskog odgovora (Zhang Y and Yang J-ming. 2011). Prevedeno na situaciju od kliničkog značaja, stabilna bolest se označava kao terapijski neuspeh. Ovakav ishod ne mora predstavljati takvu situaciju, ako se pojave tumorske ćelije sa „senescence“ fenotipom u okviru stabilne bolesti (te Poole RH. 2002); gubitak svojstva proliferisanja takvih malignih ćelija, kao rezultat terapijskog dejstva, može ograničiti potencijal rasta preostale tumorske mase. Sa druge strane, postoje ubedljivi dokazi da neke maligne ćelije u „senescence“- stanju mogu ostati uspavane (*eng. dormant*) ili steći karakteristike cancer stem – ćelija, predstavljajući nepoželjni potencijal za razvoj metastaza i ponovno javljanje bolesti (Zhang Y and Yang J-ming. 2011). S tim u vezi je i pitanje da li je smrt malignih ćelija kritičan krajnji ishod antikancerske terapije ili je dovoljan citostatski efekat odnosno zaustavljanje proliferacije malignih ćelija (Rixe O and Fojo T. 2007). Većina antikancerskih agenasa ispoljavaju i citotoksično i citostatsko dejstvo. Da li će dati lek imati citostatsko ili citotoksično dejstvo, može biti nezavisno od primenjenog agensa, ili je uslovljeno dozom i shemom njegove primene, fazom ćelijskog ciklusa u kojoj agens deluje i u kojoj se ciljna ćelija nalazi, a i ćelijskim kontekstom.

Ova studija čini evaluaciju naučnog problema koji se odnosi na translaciono istraživanje, odnosno, na studije koje specifično ispituju validnost biološke, eksperimentalne hipoteze u *in vivo* kliničkim uslovima saglasno konzenzusima lečenja. Analiza povezanosti i značaja relevantnih biomarkera pre hemioterapije, sa analizom promene njihovog statusa *in vivo* pod uticajem terapije u odnosu na objektivno procenjeni tumorski odgovor, može doprineti preciznijem definisanju “surogat” bioloških pokazatelja osetljivosti/rezistencije karcinoma dojke na citotoksične lekove, značajnih u izboru inicijalne terapije i istovremeno preciznijih pokazatelja daljeg toka bolesti.

VI ZAKLJUČAK

➤ *Povezanost biomarkera*

- Vrednosti Ki-67 indeksa i AI su uzajamno pozitivno povezane - povišena proliferativnost malignih ćelija praćena je sa njihovom izrazitijom apoptotskom aktivnošću. Više vrednosti p53 proteina su povezane sa višim vrednostima Ki-67 indeksa i AI; imunoreaktivnost p53 proteina ma kojeg stepena (pozitivni status p53) povezana je sa značajno višim vrednostima Ki-67 indeksa i AI. Navedene korelacije ovih biomarkera utvrđuju se analizom svih netretiranih tumora i u situaciji analize pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora pre otpočinjanja hemioterapije i posle terapije analizom rezidualne populacije malignih ćelija.
- U netretiranim uzorcima karcinoma dojke, povišena ekspresija bcl-2 i pozitivni status bcl-2 povezan je sa značajno nižim vrednostima AI koje ukazuju na smanjenu apoptotsku aktivnost malignih ćelija. Međutim, povezanost ekspresije bcl-2 sa p53 proteinom kao i sa Ki-67 indeksom nije utvrđena u svih netretiranih tumora i u pacijentkinja sa različitim terapijskim ishodom na dejstvo citotoksičnih lekova. Na nivou rezidualne populacije malignih ćelija, nakon dejstva hemioterapije, nalaz povišene ekspresija bcl-2 je povezan i sa sniženjem vrednosti AI i sa sniženim vrednostima Ki-67 indeksa.
- Združeni status p53/bcl-2 proteina, označen kao „aberantni“ fenotip, naučestaliji je; vrednosti p53 proteina odgovaraju prisustvu imunoreaktivnosti ma kojeg stepena, dok su vrednosti bcl-2 značajno niže u poređenju sa vrednostima koje čine „fiziološki“ fenotip. Nalaz „aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 povezan je sa višim vrednostima AI u netretiranim tumorskim uzorcima. Pacijentkinje sa tumorima dijametralno različite osetljivosti na dejstvo hemioterapije - sa kompletnom regresijom (pKR) naspram tumora sa progresijom bolesti (PB/SB) karakteriše nalaz visokih vrednosti AI i „aberantnog“ fenotipa p53/bcl-2 proteina.

U netretiranim tumorskim uzorcima, porast vrednosti izmenjenog p53 proteina je povezan sa višim vrednostima Ki-67 indeksa i AI koji su uzajamno takođe povezani; suprotno, povišena ekspresija bcl-2 je povezana sa sniženjem AI. Na nivou rezidualne maligne populacije ćelija posle dejstva citotoksičnih lekova, više vrednosti proliferativnog (Ki-67) indeksa su povezane sa višim vrednostima AI i p53 proteina, a sa sniženim vrednostima bcl-2 proteina.

- *Analiza distribucije vrednosti biomarkera u okviru karcinoma dojke sa različitim terapijskim odgovorom na dejstvo citotoksičnih lekova, pokazala je da:*

Pacijentkinje sa parcijalnom regresijom karcinoma dojke (pPR) na dejstvo citotoksičnih lekova: u netretiranim tumorima su detektovane niže vrednosti AI i „intermedijarne“ vrednosti Ki-67 indeksa koje odgovaraju „intermedijarnim“ vrednostima indeksa rasta tumora, dok je ekspresija bcl-2 povišena. Više vrednosti Ki-67 indeksa su povezane sa višim vrednostima p53 proteina, pre terapije. Međutim, izrazitija apoptotska aktivnost ćelija saglasno nalazu viših vrednosti AI povezana je sa višim vrednostima p53 proteina, a sa sniženjem ekspresije bcl-2. Na nivou rezidualne maligne ćelijske populacije posle dejstva citotoksičnih lekova, nalaz viših vrednosti Ki-67 indeksa je povezan sa višim vrednostima i p53 proteina i AI. Posle hemioterapije povišenu proliferativnost (Ki-67) prati sniženje ekspresije bcl-2.

Pacijentkinje sa kompletnom regresijom karcinoma dojke (pKR) na dejstvo primenjenog citotoksičnog pristupa označavaju podgrupu tumora sa ekstremnom hemio-osetljivošću. Važan je nalaz izrazito visokih vrednosti Ki-67 indeksa pre otpočinjanja terapije. Utvrđene su visoke vrednosti AI, uporedo sa visokim vrednostima p53 proteina i sniženom ekspresijom bcl-2. Indeks rasta ovih tumora pokazuje izrazito visoke vrednosti, posebno naspram tumora sa progresijom kao dijametralno različite hemio-osetljivosti.

Rezistentni karcinomi dojke, odnosno, **pacijentkinje u kojih je pod uticajem hemioterapije klinički procenjena progresija ili stabilizacija bolesti, (PB/SB)** odlikuju se izrazito niskim vrednostima Ki-67 indeksa, uporedo sa visokim vrednostima AI i niskim vrednostima p53 proteina u netretiranim tumorima. Značajno niske vrednosti indeksa rasta ovih tumora prevashodno su posledica izrazito niskih vrednosti

proliferativnog (Ki-67) indeksa malignih ćelija koje istovremeno pokazuju visoku apoptotsku aktivnost.

- *Promena fenotipa malignih ćelija pod uticajem citotoksičnih lekova koji su okarakterisani profilom biomarkera, a koja je bila izvediva u (pod)grupi pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora (pPR) ukazuje da:*
- Rezidualne vrednosti **Ki-67 indeksa** pokazuju statistički *značajno sniženje* na dejstvo hemioterapije u poređenju sa preterapijskim vrednostima; medijalna vrednost od 14.68 (IK opseg, 5.23 – 23.86) snižena je na vrednost 5.21 (IK opseg, 1.60 – 13.34). Sniženje vrednosti Ki-67 je utvrđeno u 73 % tumora, za 0.72 „dela“ (IK opseg, min -0.5 max -0.9) što ukazuje da snižene rezidualne vrednosti čine 28 % analognih vrednosti pre terapije. Približno u polovini ovih uzoraka (46 %), rezidualne vrednosti su snižene za više od 75 % u odnosu na odgovarajuće početne vrednosti. Suprotno, u 37 % rezidualnih tumora je utvrđen porast vrednosti koje su „prosečno“ više za 2.3 „dela“ u odnosu na analogne početne vrednosti; porast Ki-67 veći od 100 % je najučestaliji (56 %).
 - Posle hemioterapije utvrđuje se statistički *značajno sniženje vrednosti AI* na nivou rezidualne populacije malignih ćelija. Sniženje rezidualnih vrednosti AI je utvrđeno u 57 % uzoraka, pri čemu snižene vrednosti čine prosečno 52 % odgovarajućih vrednosti pre hemioterapije; u 41% slučajeva sniženje je veće od 50 %. Nasuprot tome, porast vrednosti AI se nalazi u 43% tumorskih uzoraka sa prosečnim povećanjem od 0.47 „dela“ analognih početnih vrednosti - rezidualne vrednosti su više, prosečno, za polovinu u odnosu na početne vrednosti. U 45% ovih tumora, porast vrednosti AI je veći od 50 %. Viši nivoi proliferativnosti (viši Ki-67 indeksa) pre terapije pokazuju tendenciju nalaza više apoptotske aktivnosti (AI) posle dejstva hemioterapije.
 - Saglasno konceptu da je značaj proliferativnosti u dinamici rasta tumora, nesumnjivo usloženjen usled uticaja apoptoze, *vrednosti indeksa rasta tumora* koje sumiraju suprotstavljene efekte apoptoze i proliferativnosti, takođe pokazuju *značajno sniženje* vrednosti na dejstvo citotoksičnih lekova. Snižene rezidualne vrednosti u 62% uzoraka, čine prosečno 25% odgovarajućih početnih vrednosti,

a u približno polovini ovih tumora je pad vrednosti veći od 75 %. U situaciji sniženja indeksa rasta tumora na dejstvo citotoksičnih lekova, više vrednosti p53 proteina pre terapije su povezane sa manje izraženim sniženjem ovog parametra. U tom smislu je i nalaz da su više vrednosti p53 proteina posle terapije povezane sa višim vrednostima indeksa rasta rezidualnog tumora, pri čemu je imunoreaktivnost p53 proteina neizmenjena na dejstvo hemioterapije. Izrazitija proliferativnost, više vrednosti Ki-67 indeksa pre terapije je povezana sa izrazitijim sniženjem indeksa rasta tumora pod uticajem citotoksičnih lekova. Obrnuto, utvrđen je porast vrednosti indeksa rasta u 38% rezidualnih tumora, sa prosečnim uvećanjem od 1.35 „puta“ (IK opseg, 0.60 – 4.81) u odnosu na analogne vrednosti pre terapije; porast vrednosti veći od 100 % je dobijen u više od polovine (58%) ovih tumora. Izrazitija apoptotska aktivnost, više vrednosti AI pre terapije, povezana je sa porastom vrednosti indeksa rasta tumora posle terapije. Prisustvo p53 proteina i ekspresija bcl-2 predstavlja stabilan fenotip malignih ćelija pod uticajem citotoksičnih lekova.

- *Vrednost biomarkera kao pokazatelja terapijskog odgovora karcinoma dojke, odnosno značajnost vrednosti biomolekula pre terapije za procenu osetljivosti/rezistencije tumorskih ćelija na dejstvo citotoksičnih lekova - prediktivna vrednost biomarkera.*
- Ki-67 indeks kao pokazatelj proliferativne frakcije malignih ćelija pokazuje izrazitu prediktivnu vrednost i u situaciji analize svih vrednosti i analizom statusa. Izrazito niska proliferativnost, vrednost Ki-67 koja je manja od 1 % pokazatelj je izostanka terapijskog odgovora tumora. Prediktivna značajnost AI dobijena je samo analizom statusa ovog parametra; nalaz značajno nižih vrednosti AI u pacijentkinja sa parcijalnom regresijom tumora u poređenju sa pacijentkinjama čiji se tumori mogu označiti kao dijametralno različite hemioosetljivosti doprinosi prediktivnosti statusa AI. Slične, visoke vrednosti AI u ovim tumorima pre terapije, pacijentkinja sa kompletnom regresijom i sa progresijom/stabilnom bolešću bitno umanjuju prediktivnu vrednost AI.

- Indeks rasta tumora pokazuje prediktivnu vrednost. Izrazito redak događaj proliferisanja ćelija u odnosu na apoptozu, što je karakteristika sporo rastućih tumora, jeste najvažniji činiac za pojavu rezistencije karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova. Prediktivna vrednost indeksa rasta tumora je manje izražena u poređenju sa značajem Ki-67 indeksa. Ki-67 indeks i indeks rasta tumora pokazuju prediktivnu vrednost za procenu patološke regresije tumora, u situaciji snižene ekspresije bcl-2 proteina - negativnog statusa ovog biomarkera.

U sažetku:

- Preterapijski parametri apoptoze, AI kao pokazatelj apoptotske aktivnosti malignih ćelija i molekularni inhibitori apoptoze kao što je prisustvo izmenjenog p53 proteina i povišena ekspresija bcl-2 proteina, nisu pouzdani pojedinačni pokazatelji individualnog odgovora karcinoma dojke na dejstvo citotoksičnih lekova antraciklinskog modaliteta hemioterapije. Proliferativnost malignih ćelija u netretiranom tumoru, procenjena na osnovu Ki-67 indeksa, a i indeks rasta tumora koji sumira suprostavljene efekte proliferativnosti i apoptoze, može biti od prediktivne vrednosti. Ipak, prediktivnost indeksa rasta tumora nije veća od značajnosti Ki-67 indeksa kao pojedinačnog pokazatelja terapijskog odgovora tumora.
- Posle dejstva citotoksičnih lekova, nastaje pomak proliferativne (Ki-67) i apoptotske aktivnosti (AI) malignih ćelija i indeksa rasta tumora, prevashodno u smislu sniženja vrednosti. U određenom broju tumora nastaje porast vrednosti Ki-67 indeksa, AI i indeksa rasta.
- Povišena proliferativnost pre terapije povezana je sa izrazitijim sniženjem indeksa rasta tumora posle terapije, za razliku od više apoptotske aktivnosti koja je povezana sa sniženjem ovog parametra. Ovakve varijacije u vrednosti biomarkera, pod uticajem hemioterapije, mogu ukazivati na različiti tok bolesti, odnosno na različitu prognozu pacijentkinja.

VII LITERATURA

Aas T, Geisler S, Eide GE, Haugen DF, Varhaug JE, Bassøe AM et al. Predictive value of tumor cell proliferation in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2003; 39: 438-46.

Aas T, Geisler S, Helle H, Børrensen-Dale AL, Lønning PE, Akslen LA. Prognostic and predictive value of changes in tumor cell proliferation in locally advanced breast cancer primarily treated with doxorubicin. *Oncol Reports*. 2005; 13:525-30.

Abrams JM, White MA. Coordination of cell death and the cell cycle: linking proliferation to death through private and communal couplers. *Curr Opin Cell Biol*. 2004; 16:634-8.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-6.

Akashi-Tanaka S, Tsuda H, Fukuda H, Watanabe T, Fukutomi T. Prognostic value of histopathological effects and mitotic index in locally advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Jpn J Clin Oncol*. 1996; 26:201-6.

Amaravadi RK and Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:7271-9.

Amat S, Abrial C, Penault-Llorca F, Delva R, Bournoux P et al. High prognostic significance of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study in 710 patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 94:255-63.

Andre F, Pusztai L. Heterogeneity of breast cancer among patients and implications for patients selection for adjuvant therapy. *Pharmac Res*. 2006; 23:1951-8.

Anneli A, Brentani RR, Gadelha AP, de Albuquerque AA, Soares F. Correlation of p53 status with outcome of neoadjuvant chemotherapy using paclitaxel and doxorubicin in stage IIIB breast cancer. *Ann Oncol*. 2003; 14:428-32.

Antonsson B, Martinou J-C. Minireview. The bcl-2 protein family. *Exp Cancer Res*. 2000; 256: 50-7.

Apple SK, Suthar F. How do we measure a residual tumor size in histopathology (the gold standard) after neoadjuvant chemotherapy? *The Breast*. 2006; 15:370-76.

Archer CD, Parton M, Smith IE, Ellis PA, Salter J, Ashley S et al. Early changes in apoptosis and proliferation following primary chemotherapy for breast cancer. *Br J Cancer*. 2003; 89:1035-41.

Arens N, Bleyl U, Hilderbrand R. HER2-neu, p53, Ki67, and hormone receptors do not change during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Virchows Arch*. 2005; 446:489-96.

Arpino G, Ciocca DR, Weiss H, Allred DC, Daguerre P, Vargas-Roig L et al. Predictive value of apoptosis, proliferation, HER-2, and topoisomerase II α for anthracycline chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 92:69-75.

Assersohn LA, Salter J, Powles TJ, A'hern R, makris A, Gregory RK et al. Studies of potential utilize of Ki-67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 82:113-23.

Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess K et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22:2284-93.

Bai L, Zhu W-g. P53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *J Cancer Mol* 2006; 2:141-53.

Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, Steele D, Ashworth A, Lakhani SR, Smith IE. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol*. 2006; 59:729-35.

Baum M, Demicheli R, Hrushesky WJM, Retsky M. Does surgery unfavorably perturb the „natural history“ of early breast cancer by accelerating the appearance of distant metastases? *Eur J Cancer*. 2005;41:508-15.

Berardo MD, Elledge RM, de Moor C, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinomas. *Cancer*. 1998; 82:1296-302.

Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiant G et al. P53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell*. 2003; 3:387-402

Berns EMJJ, Foekens JA, Vossen R, Look MP, Devilee P, Henzen-Logmans SC et al. Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60:2155-62.

Bertheau P, Espié M, Turpin E, Lehmann J, Plassa L-F, Varna M et al. TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology.* 2008; 75:132-9.

Bertheau P, Lerebours F, Mounier N, de Roquancourt A, Espie M, Clot P et al. Prognostic significance of a combined clinicopathologic score for response to primary systemic therapy in locally advanced breast cancer. *Oncol Rep.* 2005; 14:513-20.

Bertheau P, Plassa F, Espié M, Turpin E, de Roquancourt A, Marty M et al. Effect of mutated TP53 on response of advanced breast cancers to high-dose therapy. *Lancet.* 2002; 360:852-4.

Bertheau P, Turpin E, Rickman DS, Espié M, de Reyniès A, Feugeas J-P et al. Exquisite sensitivity of TP53 mutant and basal breast cancers to a dose-dense epirubicin-cyclophosphamide regimen. *PLoS Medicine.* 2007; 4:e90

Bertoloni G, Gatti L, Roz L. The „stem“ of chemoresistance. *Cell cycle.* 2010; 9:628-9.

Bidard F-C, Matthieu M-C, Chollet P, Raoefils I, Abrial C, Dômont J et al. P53 status and efficiency of primary anthracycline/alkylating agent-based regimen according to breast cancer molecular classes. *Ann Oncol.* 2008; 19: 1261-5.

Billgren AM, Rutquist LE, Tani E, Wilking N, Fornander T, Skoog L. Proliferation fraction during neoadjuvant therapy of primary breast cancer in relation to objective local response and relapse-free survival. *Acta Oncol.* 1999; 38:597-601.

Bloom HJG and Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957, 11, 359-377

Boenisch T. Staining methods. In: *Handbook. Immunochemical Staining Methods.* 3rd edition. Ed Boenisch T. DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA, pp 26 -32, 2001.

Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L, Moliterni A, Terenziani M et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight year experience at the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol.* 1998; 16:93-100.

Bonetti A, Zaninelli M, Leone R, Cetto CL, Pelosi G, Bialo S et al. bcl-2 but not p53 expression is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2331-6.

Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Therasse P, Hamilton A, van de Vijver M, MacGrogan G et al. Locally advanced/inflammatory breast cancers treated with intensive epirubicin-based neoadjuvant chemotherapy: are there molecular markers in the primary tumor that predict for 5-year clinical outcome? *Ann Oncol.* 2003; 14:406-13.

Bonnefoi H, Ducraux A, Movarekhi S, Pelte MF, Bongard S, Lurati E et al. P53 as potential predictive factor of response to chemotherapy: feasibility of p53 assessment using functional test in yeast from trucut biopsies in breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2002;86:750-5.

Børresen-Dale AI. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat.* 2003; 21:292-300.

Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Brunelli A, Gorzegno G, et al. P53 but not bcl-2 immunostaining is predictive of poor clinical complete response to primary chemotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:2751-8.

Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Bruzzi P, Aguggini S et al. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki-67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer.* 2001; 85:1106-12.

Bozzetti C, Musolino A, Camisa R, Bisagni G, Flora M, Bassano C et al. Evaluation of HER-2/Neu Amplification and other biological markers as predictors of response to neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy in primary breast cancer. The role of anthracycline dose intensity. *Am J Clin Oncol.* 2006; 2:171-77.

Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Reviews.* 2005; 5:231-7.

Bruzzi P, Del Mastro L, Sormani MP, Bastholt L, Danova M, Focan C et al. Objective response to chemotherapy as potential surrogate end point of survival in metastatic breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2005; 23:5117-25.

Buchholz TA, Davis DW, McConkey DJ, Symmans WF, Valero V, Jhingran A et al. Chemotherapy-induced apoptosis and bcl-2 levels correlate with breast cancer response to chemotherapy. *J Cancer.* 2003; 9:33-41.

Buchholz TA, Garg AK, Chakravarti N, Aggarwal BB, Esteva FJ, Kuerer HM et al. The nuclear transcription kappaB/bcl-2 pathway correlates with pathological complete response to doxorubicin-based chemotherapy in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:8398-402.

Buchholz TA, Stivers DN, Stec J, Ayers M, Clark E, Bolt A et al. Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer. *The Cancer J.* 2002; 8:461-8.

Bufalo Del D, Biroccio A, Trisciuglio D, Bruno T, Floridi A, Aquino A et al. Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2455-62.

Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer.* 2001; 1:68-76.

Bunz F, Hwang PM, Torrence C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest.* 1999; 105:263-9.

Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, Daley FM, Noble S, Pittam M et al. Evaluation of ER,PR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Cancer.* 2005; 92:147-55.

Burcombe RJ, Wilson GD, Dowsett M, Khan I, Richman PI, Daley F et al. Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2006; 8:R31

Calabresi P, Chabner BA. Introduction. *Chemotherapy of neoplastic diseases. Section IX.* Goodman & Gilman's *The pharmacological basis of Therapeutics.* 10th edition. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG (eds), New York: Mc Graw-Hill, 2001, p1381-8.

Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PDP, Caldas C. Meta-analysis confirms bcl-2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8:153

Campiglio M, Somenzi G, Olgiati C, Beretta G, Balsari A et al. Role of proliferation in HER-2 status predicted response to doxorubicin. *Int J Cancer.* 2003; 105:568-73.

Campiglio M, Somenzi G, Olgiati C, Beretta G, Balsari A, Zaffaroni N et al. Role of proliferation in HER2 status predicted response to doxorubicin. *Int J Cancer.* 2003; 105:568-73.

Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of the basal-like breast cancer phenotype. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 2329-34.

Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004; 23:2825-37.

Chang J, Ormerod M, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Dowsett M. Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2000; 89:2145-52.

Chang J, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Clark GM, Makris A, et al. Biologic markers as predictors of clinical outcome from systemic therapy for primary operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999; 17:3058-63.

Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet H, Hurteloup P. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol*. 1993; 16:223-8.

Chiarugi V, Ruggiero M. Role of three cancer „master genes“ p53, bcl-2 and c-myc on the apoptotic proces. *Tumori*. 1996; 82:205-9.

Chollet P, Amat S, Cure H, de Latour M, Le Bouedec G, Mouret- Reynier M-A et al. Prognostic significance of a complete pathological response after induction chemotherapy in operable breast cancer. *Br J Cancer*. 2002; 86:1041-6.

Cleator S, Parton M, Dowsett M. The biology of neoadjuvant therapy for breast cancer. *Endoc Rel Cancer*. 2002; 9:183-95.

Collecchi P, Baldini E, Giannessi P, Naccarato AG, Passoni A, Gardin G et al. Primary chemotherapy in locally advanced breast cancer (LABC): effects on tumor proliferative activity, bcl-2 expression and the relationship between tumor regression and biological markers. *Eur J Cancer*. 1998; 34:1701-3.

Colleoni M, Orvieto E, Nole F, Orlando L, Minchella I, Viale G, et al. Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer. *Eur J Cancer*. 1999; 35:574-9.

Corbett KD, Berger JM. Structure, molecular mechanism, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Ann Rev Biophys Struct*. 2004; 33:95-118.

Coultas L, Strasser A. The role of the bcl-2 protein family in cancer. *Seminars Cancer Biol* 2003; 13: 115-123.

Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A. et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:13820-5.

Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJ. Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem J.* 2003; 375:263-74.

Daidone MG, Luisi A, Veneroni S, Benini E, Silvestrini R. Clinical studies of bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endoc Rel Cancer.* 1999; 6:61-8.

Darb-Esfahani S, Loibl S, Müller BM, Roller M, Denkert C, Komor M et al. Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2009; 11:R69

Davidoff AM, Kerns BJM, Iglehart JD, Marks JR. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 1991; 88:5006-10.

Davis DW, Buchholz TA, Hee KR, Sahin AA, Valero V, McConkey DJ. Automated quantification of apoptosis after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: early assessment predicts clinical response. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:955-60.

Davis JM, Navolanic PM, Weinsten-Oppenheim CR, Steelman LS, Hu W, Konopleva M et al. Raf-1 and Bcl-2 induce distinct and common pathways that contribute to breast cancer drug resistance. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1161-70.

Deissler H, Kafka A, Schuster E, Sauer G, Kreienberg R, Zeillinger R. Spectrum of p53 mutations in biopsies from breast cancer patients selected for preoperative chemotherapy analysed by functional yeast assay to predict therapeutic response. *Oncol Rep.* 2004; 11:1281-6.

Di Leo A, Claudino WM, Pestrin M, Licitra S, Biganzoli L. Using specific cytotoxic with a targeted mind. *The Breast.* 2007; 16:S120-S126.

Dowsett M, A'Hern R, Salter J, Zabaglo L, Smith IE. Who would thought a single Ki-67 measurement would be predict long-term outcome? *Breast Cancer Res.* 2009; 11(Suppl 39):S15

Dowsett M, Detre S, Ormerod MG, Ellis PA, Mainwaring PN, Titley JC et al. Analysis and sorting of apoptotic cells from fine-needle aspirates of excised human primary breast carcinomas. *Cytometry.* 1998; 32:291-300.

Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Griffith C et al. Proliferation and apoptosis as marker of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(3Suppl):1024s-9s.

Drewinko B, Patchen M, Yang LY, Barlogie B. Differential killing efficiency of twenty antitumor drugs on proliferating and nonproliferating human tumor cells. *Cancer Res.* 1981. 41;2328-33 (Abst).

Durbecq V, Desmedt C, Paesmans M, Cardoso F, Di Leo A et al. Correlation between topoisomerase-II alpha gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer. *Int J Cancer.* 2004; 25:1473-9.

Eisenberg - Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and cross-talk between them. *Cell death Different.* 2009; 16:966-75.

Ellis PA, Smith IE, Detre S. Reduced apoptosis and proliferation and increased bcl-2 levels in residual breast cancer following preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 48:107-116.

Ellis PA, Smith IE, McCarthy K, Detre S, Salter J, Dowsett M. Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer. *Lancet.* 1997; 349:849

Elmore LW, Rehder CW, Di X, McChesney PA, Jackon-Cook CK, Gewirtz DA and Holt SE. Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem.* 2002; 277:35509-15.

Estévez LG, Cuevas JM, Antón A, Florián J, López-Vega JM, Velasco A et al. Weekly docetaxel as neoadjuvant chemotherapy for stage II and II breast cancer: efficacy and correlation with biological markers in phase II, multicenter study. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:686-92.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 2001; 411:342-48.

Fan Y-J, Zong W-X. The cellular decision between apoptosis and autophagy. *Chin J Cancer.* 2013; 32:121-9.

Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL, Remijnse PL, Rodenhuis S, van de Vijver MJ. Breast cancer response to neoadjuvant therapy: predictive markers and relation with outcome. *Br J Cancer.* 2003; 88:406-12.

Fasching PA, Heusinger L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, Rauh C et al.) Ki-67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer* 11:486-498.

Ferreira CG, Tolis C, Giaccone G. P53 and chemosensitivity. *Ann Oncol.* 1999; 10:1011-21.

Filho-Reis JS, Westbury, Pierga J-Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2006; 59:225-31.

Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG et al. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in woman with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol.* 1997; 15:2483-93.

Fisher B, Mamounas E. Preoperative chemotherapy: A model for studying the biology and therapy of primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 1995; 13:537-540.

Fisher ER, Wang J, Bryant J, Fisher B, Mamounas E, Wolmark N. Pathobiology of preoperative chemotherapy. Findings from the national surgical adjuvant breast and bowel project (NSABP). *Cancer.* 2002; 95:681-95.

Folgueira MAAK, Bretnani H, Carraro DM, De Camargo Barras Filho M, Airata Katayama ML, Santana De Abreu AP et al. Gene expression profile of residual breast cancer after doxorubicin and cyclophosphamide neoadjuvant chemotherapy. *Oncology Rep.* 2009; 22:805-13.

Folgueira MAAK, Carraro DM, Brentani H, da Costa Patrão DF, Mantovani Barbarosa E, Mourão Netto M et al. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:7434-43.

Forrest AP, Levack PA, Chetty U, Hawkins RA, Miller WR, Smyth JF, Anderson TJ. A human tumor model. *Lancet.* 1986; 2:840-2.

Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, Straume O, Chappuis PO, Bégin LR et al. The prognostic implications of the basal like (Cyclin E^{high}/p27^{low}/p53⁺/glomeruloid-microvascular-proliferation⁺) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res.* 2004;64:830-5.

Frassoldati A, Adami F, Banzi C, Criscuolo M, Piccinini L, Silingardi V. Changes of biological features in breast cancer cells determined by primary chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 1997; 44:185-92.

Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene.* 2003; 22: 9030-40.

Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25: 4798-811.

Fulda S, Meyer E, Friesen C, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM. Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene*. 2001; 20: 1063-75.

Gao G, Dou P. G1 phase-dependent expression of bcl-2 mRNA and protein correlates with chemoresistance of human cancer cells. *Mol Pharmacol* 2000; 58:1001-10.

Gatti L, Supino R, Perego P, Pavesi R, Caserini C, Carenini N et al. Apoptosis and growth arrest induced by platinum compounds in U2-OS cells reflect a specific DNA damage recognition associated with different p53-mediated response. *Cell Death Diff*. 2002; 9:1352-59.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992; 119:493-501.

Geisler S, Lønning PE, Aas T, Johnson H, Fluge Ø, Faksvåg Haugen D et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res*. 2001;61:2505-12.

Gerwitz DA. A critical evaluation of the mechanism of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1999; 57:727-41.

Gewirtz DA. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. *Autophagy*. 2009; 5:1232-4.

Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J et al. Gene expression profiles in parafin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in woman with locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23:7265-77.

Goldie JH, Coldman AJ. A mathematical model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep*. 1979; 63:1243-9.

Golhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J & Panel Members. Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. Review. *Ann Oncol*. 2005; 16:1569-83.

Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 2004; 23:2891-906.

Guarneri V, Broglio K, Kau SW, Cristofanilli M, Buzdar AU, Valero V et al. Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 1037-44.

Hall PA. Assessing apoptosis: a critical survey. *Endocrine Rel Cancer*. 1999; 6:3-8.

Hamilton A, Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2, p53 and bcl-2. *Ann Oncol*. 2000; 11:647-63.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100:57-70.

Hannemann J, Oosterkamp HM, Bosch CAJ, Velds A, Wessels LFA, Loo C et al. Changes in gene expression associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:3331-42.

Harper-Wynne CL, Sacks NP, Shenton K, MacNeill FA, Sauven P, Laidlaw IJ et al. 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.

Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Hhaupt Y. Apoptosis – the p53 network. *J Cell Science*. 2003; 116: 4077-4085.

Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: When is "statistically significant" clinically useful? *Breast cancer Res Treat* 1998; 52: 305-19.

Hayes DF. Primary therapy of early breast cancer: 9th International St. Gallen consensus conference. Prognostic and predictive factors revisited. *The Breast*. 2005; 14:493-9.

Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejia JA et al. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24:4236-44.

Honkoop AH, Pinedo HM, De Jong JS, Verheul HM, Linn SC, Hoekman K et al. Effects of chemotherapy on pathologic and biologic characteristics of locally advanced breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 1997; 107:211-8.

Huang Y, Ray S, Reed JC, Ibrado AM, Tang C, Nawabi A et al. Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratio and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat*. 1997; 42:73-81.

Jain MV, Paczulla, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K et al. Intercinnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med* 2013; 1:12-29.

Järvinen TA, Holli K, Kuukarsjarvi T, Isola JJ. Predictive value of topoisomerase II α and other prognostic factors for epirubicin chemotherapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 1998; 77:2267-73.

Järvinen TAH, Liu ET. Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase II α (TOP2A) genes – molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006; 6:579-602.

Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 2002; 108:153-164.

Jones RL, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho JS et al. The prognostic significance of Ki-67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 116:53-68.

Jones RL, Smith IE. Neoadjuvant treatment for early-stage breast cancer: opportunities to assess tumor response. *Lancet Oncol*. 2006; 7:869-74.

Kaelin WG Jr. The p53 gene family. *Oncogene*. 1999; 18:7701-5.

Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C et al. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2000; 6:50-6.

Kang R, Zeh HJ, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Different*. 2011; 18:571-80.

Kariya S, Ogawa Y, Nishioka A, Moriki T, Ohnishi T, Ito S et al. Relationship between hormonal receptors, HER-2, p53 protein, bcl-2, and MIB-1 status and the antitumor effects of neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy in invasive breast cancer patients. *Radiation Med*. 2005; 23:189-94.

Kaufmann M, Horotobagzi GN, Goldrisc A, Scholl S, Makris A, Valaquassa P et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J Clin Oncol*. 2006; 24:1940-9.

Kaufmann M, von Minckwitz G, Rody A. Preoperative (neoadjuvant) systemic treatment of breast cancer. *The Breast*. 2005; 14:576-81.

Kaufmann SH, Earnshaw WC. Minireview. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*. 2000; 256:42-9.

Keam B, Im S-A, Kim H-J, Oh D-Y, Kim JH, Lee S-H et al. Prognostic impact of clinicopathologic parameters in stage II/III breast cancer treated with neoadjuvant

docetaxel and doxorubicin chemotherapy: paradoxical features of the triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007; 7:203

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis, its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994; 73:2013-26.

Knowlton K, Mancini M, Creason S, Morales C, Hockenbery D, Anderson BO. Bcl-2 slows in vitro breast cancer growth despite its antiapoptotic function. *J Surg Res*. 1998; 76: 22-6.

Kokontis JM, Wagner AJ, O'Leary M, Liao S, Hay N. A transcriptional activation function of p53 is dispensable for and inhibitory of its apoptotic function. *Oncogene*. 2001; 20:659-68.

Kroemer G, El Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P et al. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Different* 2005; 12: 1463-7.

Kuerer HM, Newman LA, Buydar AU, Dhingra K, Hunt KK, Buchholz TA et al. Pathologic tumor response in the breast following neoadjuvant chemotherapy predicts axillary lymph node status. *Cancer J Sci Am*. 1998; 4:230-6.

Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999; 17:460-9.

Kurosimi M. Significance and problems in evaluations of pathological responses to neoadjuvant therapy for breast cancer. *Breast Cancer*. 2006; 13:254-9.

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E et al. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem. Cytochem*. 1998; 46:327-34.

Lacroix M, Toillon R-a, Leclerc G. P53 and breast cancer, an update. *Endoc Rel Cancer*. 2006; 13:293-325.

Lee J, Im YH, Lee SH, Cho EY, Choi YL, Ko YH et al. Evaluation of ER and Ki-67 proliferation index as prognostic factors for survival following neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin/docetaxel for locally advanced breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008; 61: 569-77.

Lee K-H, Im S-A, Oh D-Y, Lee S-H, Chie EK, Han W et al. Prognostic significance of bcl-2 expression in stage III breast cancer patients who received doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel as adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*. 2007; 7:63

Levine B and Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict. *J Clin Investigation*; 115:2679-88.

Li T-K, Liu LF. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41:53-77.

Linn SC, Pinedo HM, van Ark-Otte J, van der Valk P, Hoekman K et al. Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. *Int J Cancer*. 1997; 71:787-95.

Lipponen P. Apoptosis in breast cancer: Relationship with other pathological parameters. *Endoc Relat Cancer*. 1999; 6:13-6.

Liu S, Edgerton SM, Moore II DH, Thor AD. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2001; 7:1716-23.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanism of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:330-8.

Lønning PE. Study of suboptimum treatment response: lessons from breast cancer. *Lancet Oncol*. 2003; 4:177-85.

Losa GA, Graber R. Apoptotic cell death and proliferative capacity of human breast cancers. *Anal Cell Pathol*. 1998; 16:1-10.

Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 2000; 21:485-95.

Ludberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer*. 1999; 35:531-9.

MacGrogan G, Mauriac L, Durand M, Bonichon F, Trojani M, de Mascarel I, Coindre JM. Primary chemotherapy in breast invasive carcinoma: predictive value of the immunohistochemical detection of hormonal receptors, p53, c-erb-2, MiB-1, pS2 and GST. *Br J Cancer*. 1996; 74:1458-65.

Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA, Kroemer G. Autophagy regulation by p53. *Current Opin Cell Biol*. 2010; 22:181-5.

Makris A, Powles TJ, Dowsett M, Osborne CK, Trott PA, Fernando IN et al. Prediction of response to neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 1997; 3:593-600.

Makris A, Powles TJ, Shley SE, Chang J, Hickish T, Tidy VA et al. Quantitative changes in cytological molecular markers during primary medical treatment of breast cancer: a pilot study. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53:51-9.

Mauriac L, MacGrogan G, Avril A, Durand M, Flouquet A, Debed M et al. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast carcinoma larger than 3 cm: a unicentre randomised trial with a 124-month median follow-up. Institut Bergonie Bordeaux Groupe Sein (IBBGS). *Ann Oncol* 1999; 10:47-52.

McGill G, Fisher DE. P53 and cancer therapy: a double-edged sword. *J Clin Invest* 1999; 104: 223-5.

Megha T, Ferrari F, Benvenuto A, Bellan C, Lalinga AV, Bartolommei S et al. P53 mutations in breast cancer. Correlation with cell kinetics and cell of origin. *J Clin Pathol.* 2002; 55: 461-6.

Mieog JSD, van der Hage JA, van de Vijver MJ, van de Velde CJH, Cooperating investigators of the EORTC. Tumor response to preoperative anthracycline-based chemotherapy in operable breast cancer: the predictive role of p53 expression. *Eur J Cancer.* 2006; 42:1369-79.

Moll UM, Marchenko N, Zhang X-k. P53 and Nur77/TR3 – transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene.* 2006; 25:4725-43.

Moon YW, Rha SY, Jeung HC, Yang WI, Suh CO, Chung HC. Neoadjuvant chemotherapy with infusional 5-fluoracil, adriamycin and cyclophosphamide (iFAC) in locally advanced breast cancer: an early response predicts good prognosis. *Ann Oncol.* 2005; 16:1778-85.

Morrow CS, Cowan KH. Drug resistance and its clinical circumvention. In: *Cancer Medicine e.5.* Ed: Bist Jr RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland J, Frei E. Approved publication American Cancer Society, B.C. Decker Inc. Hamilton, London. 2000, pp 539 – 55.

Mustonen M, Raunio H, Paakko P, Soini Y. The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. *Histopathology.* 1997; 31:347-54.

Navarrete MAH, Maier CM, Falzoni R, de Azavedo Quadros LG, Lima GR, Baracat EC, Nazario ACP. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Breast Cancer Res.* 2005;7:R306-R313.

Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1028-42

O'Connor P, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M et al. Characterisation of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth inhibitory potency Of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* 1997; 57:4285-300.

Ogston KN, Miller ID, Payne S, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *The Breast.* 2003; 12:320-7.

Ogston KN, Miller ID, Schofield AC, Spyranis A, Pavlidou E, Sarkar TK et al. Can patients to benefit from primary chemotherapy for breast cancer be predicted before commencement of treatment? *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 86:181-9.

Oren M, Damalas A, Gottlieb T, Michael D, Taplick J, Yamashita T et al. Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64:865-71.

Osborne CR KL, Xie X-J, Ashfaq R, Bian A, Tripathy D. Neoadjuvant chemotherapy for basal-like breast cancer cohort: clinical and pathological outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100:S53

Park S-H, Kim H, Song B-J. Down regulation of bcl-2 expression in invasive ductal carcinomas is both estrogen- and progesterone-receptor dependent and associated with poor prognostic factors. *Pathol Oncol Res.* 2002; 2:26-30.

Parton M, Krajewski S, Smith I, Krajewska M, Archer C, Naito M et al. Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:2100-8.

Patel SA, Ndabahaliye A, Lim PK, Milton R, Rameshwar P. Challenges in the development of future treatments for breast cancer stem cells. *Breast Cancer.* 2010; 2:2-11.

Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: A new route to cancer? *Cancer Res.* 2006; 66:2885-8.

Penault Llorca F, Abrial C, Raoelfils I, Chollet P, Cayre A, Mouret-Reynier M-A et al. Changes and predictive and prognostic value of the mitotic index, Ki-67, Cyclin D1, and Cyclo-oxygenase-2 in 710 operable breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *The Oncologist*. 2008; 13:1235-45.

Penault-Llorca F, Abrial C, Raoelfils I, Cayre A, Mouret-Reynier MA, Leheurteur M et al. Comparison of the prognostic significance of Chevallier and Sataloff's pathologic classifications after neoadjuvant chemotherapy of operable breast cancer. *Human Pathol*. 2008; 39:1221-8.

Penault-Llorca F, Cayre A, Bouchet Mishellany F, Amat S, Feillel V, Le Bouedec G et al. Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. *Int J Oncol*. 2003; 22:1319-25.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van der Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2000; 406:747.

Petit T, Wilt M, Millon R, Rodier J-F, Borel C, Mors R et al. Comparative value of tumor grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2004; 40:205-11.

Petz B. Izbor iz neparametrijskih testova. U: Osnovne statističke metode za nematematičare. SNL, Zagreb 1985, p 303 - 330

Pim D, Banks L. P53 polymorphic variants at codon 72 exerts different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer*. 2004; 108:196-9.

Pohl G, Rudas M, Taucher S, Stranzl T, Steger GG, Jakesz R et al. Expression of cell cycle regulatory proteins in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 78:97-103.

Pomier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*. 2004; 23:2934-49.

Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, Daidone MG. Breast cancer stem cells: an overview. *Eur J Cancer*. 2006; 42:1219-24.

Prentice RL. Surrogate markers in clinical trials: Definitions and operational criteria. *Stat Med*. 1989; 8:431-40.

Prisack HB, Karreman C, Modlich O, Audretsch W, Danae M, Rezai M et al. Predictive biological markers for response of invasive breast cancer to anthracycline /cyclophosphamide-based primary (radio-)chemotherapy. *Anticancer Res.* 2005; 25:4615-21. (Abstr)

Pritchard KI, Messersmith H, Elavathil L, Trudeau M, O'Malley F, Dhesy-Thind B. HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2008; 26:736-44.

Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol.* 1999; 187:112-26.

Puztai L, Phil D, Krishnamurti S, Perez Cardona J, Sneige N, Esteva FJ, et al. Expression of BAG-1 and Bcl-2 proteins before and after neoadjuvant chemotherapy of locally advanced breast cancer. *Cancer Invest.* 2004; 22:248-256.

Rahka EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* 2007; 109:25-32.

Rahka EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol.* 2008; 26:2568-81.

Rahko E, Blanco G, Soini Y, Bloigu R, Jukkola A. A mutant TP53 gene status is associated with poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer.* 2003; 39:447-53.

Rajan R, Poniecka A, Smith TL, Yang Y, Frye D, Puztai L et al. Change in tumor cellularity of breast carcinoma after neoadjuvant chemotherapy as a variable in the pathologic assesement of response. *Cancer.* 2004; 100:1365-73.

Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol.* 2002; 192:131-7.

Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol.* 1999; 17:2941-53.

Rein DT, Schondorf T, Breidenbach M, Janat MM, Weikelt A, Gohring UJ et al. Lack of correlation between p53 expression, bcl-2 expression, apoptosis and ex vivo chemosensitivity in advanced human breast cancer. *Anticancer Res.* 2000. 20:5069-72.

Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga J-Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2006; 59:225-31.

Remvikos Y, Beuzeboc P, Zajdela A, Voillemot N, Magdalenat H, Pouillart P. Correlation of pretreatment proliferative activity of breast cancer with the response to cytotoxic chemotherapy. *J Nat Cancer Inst.* 1989; 20:1383-7.

Retsky M, Demicheli R, Hrushesky WJM. Wounding from biopsy and breast cancer progression. *Lancet*. 2001;357:1048.

Ricci MS, Zong W-X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist*. 2006; 11:342-57.

Ringshausen I, O'Shea CC, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI. Mdm-2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer Cell*. 2006; 10:501-14.

Rixe O, Fojo T. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:7280-7.

Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K et al. Breast cancer molecular subtypes respond differentially to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:5678-85.

Royds JA, Iacopetta B. p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death Differ*. 2006; 13:1017-26.

Rozan S, Vincent-Salomon A, Zafrani B, Validire P, De Cremoux P, Bernoux A et al. No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer*. 1998; 79:27-33.

Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z et al. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg*. 1995; 180:297-306.

Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000; 407:784-8.

Scarff RF, Torloni H. *Histological Typing of Breast Tumors. International Histological Classification of Tumors. No 2. Geneva; WHO 1981*

Schabel Jr FM. Concepts for systemic treatment of micrometastases. *Cancer*. 1975; 35:15-24.

Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP, Böglér O, Duchrow. The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin B. *J Pathol*. 2002; 199:18-27.

Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy. *J Pathol*. 1999. 187;127-37.

Schneeweiss A, Katretchko J, Sinn HP, Unnebrink K, Rudlowski C, Geberth M et al. Only grading has independent impact on breast cancer survival after adjustment for pathological response to preoperative chemotherapy. *Anticancer Drugs*. 2004; 15:127-35.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiology*. 2000; 182:311-22.

Schuler M, Green DR. Mechanism of p53 – dependent apoptosis. *Bioch Soc Trans*. 2001; 29:684-8.

Shackney SE, McGormack GW, Cuchural Jr GJ. Growth rate patterns of solid tumors and their relation to responsiveness to therapy: an analytical review. *Ann Intern Med*. 1978; 89:107-21.

Shannon C, Smith I. Is there still a role for neoadjuvant therapy in breast cancer? *Crit Rev Oncology/Hematology*. 2003; 45:77-90.

Shao ZM, Li J, Wu J, Qi-Xia H, Zhen-Zoi S, Fontana JA, Barsky SH. Neo-adjuvant chemotherapy for operable breast cancer induces apoptosis. *Breast Cancer Res Treat*. 1999; 53:263-9.

Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*. 2004; 23:2919-33.

Shenggan J, Levine AJ. The p53 functional circuit. *J Cell Science*. 2001; 114:4139-40.

Sherman CD, Hossfeld DH. Breast cancer. In: *Manual of Clinical Oncology*. Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR et al (eds) Springer Verlag, Berlin 1990, 258-61.

Sierra A, Castellsagué X, Escobedo A, Lloveras B, Ramirez-García M, Moreno A et al. Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alterations: a pathway to metastatic progression in human breast cancer. *Int J Cancer*. 2000; 89:142-7.

Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: Insight from the MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med*. 2003; 228:995-1003.

Siziopikou KP, Schnitt SJ. MIB-1 proliferation index in ductal carcinoma in situ of the breast: relationship to the expression of apoptosis-regulating proteins bcl-2 and p53. *The Breast J*. 2000; 6:400-6.

Sjöström J, Blomquist C, Heikkilä P, von Boguslawski K, Räisänen-Sokolowski A, Bengtsson N-O et al. Predictive value of p53, mdm-, p21, and mib-1 for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; 6:3103-10.

Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, Miller ID, Payene S, Gilbert FJ et al. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. *J Clin Oncol.* 2002; 20:1456-66.

Smith IE, Lipton L. Preoperative/neoadjuvant medical therapy for early breast cancer. *Lancet Oncol.* 2001; 2:561-70.

Sneige N, Kemp B, Pusztai L, Asmar L, Horobagyi GN. Chemotherapy-induced histologic changes in mastectomy specimens and their potential significance. *The Breast.* 2001. 10; 492-500.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:10869-74.

Soussi T, Wiman KG. Shaping genetic alteration in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell.* 2007; 12:303-12.

Soussi T. P53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* 2007; 26:2145-56.

Spyratos F, Ferro-Pous M, Trassard M, Ferro-Pous M, Hacene K, Phillips E, et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers. Clinical applications of cut-off values. *Cancer.* 2002; 94:2151-9.

Stacey DW, Hitomi M, Chen G. Influence of cell cycle and oncogene activity upon topoisomerase II alpha expression and drug toxicity. *Mol Cell Biol.* 2000; 20:9127-37.

Stearns V, Singh B, Tsangaris T, Crawford JG, Novielli A, Ellis MJ et al. A prospective randomised pilot study to evaluate predictors of response in serial core biopsies to single agent neoadjuvant doxorubicin or paclitaxel for patients with locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:124-33.

Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature Rev Cancer.* 2007; 7:791-9.

Symmans WF, Volm MD, Shapiro RL, Perkins AB, Kim AY, Demaria S, et al. Paclitaxel-induced apoptosis and mitotic arrest assessed by serial fine-needle aspiration: implications for early prediction of breast cancer response to neoadjuvant treatment. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 4610-7

Takada M, Kataoka A, Masazaku T, Bando H, Toyama K, Horiguchi S, et al. A close association between alteration in growth kinetics by neoadjuvant therapy and survival outcome in primary breast cancer. *Int J Oncol.* 2004; 25:397-406.

Tamm I, Schriever F, Dorken B. Apoptosis: implications of basis research for clinical oncology. *Lancet Oncology* 2001; 2: 33-42

Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Jin Kim S, Tanji Y, Taguchi T et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:4234-41.

Tannoch VJ, Hinds PW, Tsai LH. Cell Cycle control. *Adv Exp Med Biol* 2000;465:127-40.

te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence intumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 2002; 62:1876-83.

te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 2002; 62:1876-83.

Teixeira C, Reed JC, Pratt MAC. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by mechanism involving bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1995; 55: 3902-07.

Tewari M, Krishnamurthy A, Shukla HS. Predictive markers of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Surg Oncol.* 2008; 17:301-11.

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L et all. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92:205-16.

Therasse P, Eisenhauer EA, Verweij J. RECIST revised: A review of validation studies on tumor assessment. *Eur J Cancer.* 2006; 42:1031-9.

Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Moll Cell Biol.* 1999; 19:1092-100.

Tiezzi DG, De Andrade JM, Candido Dos Reis FJ, Cosiski Marrana HR, Ribeiro-Silva A, Tiezzi MG et al. Apoptosis induced by neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Pathology.* 2006; 38:21-7.

Tiezzi DG, Jurander MA, Ribeiro-Silva A, Zola FE, Marana HRC, Tiezzi MG. HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination. *BMC Cancer*. 2007; 7:36

Tordai A, Wang J, Andre F, Liedtke C, Yan K, Sotirous C et al. Evaluation of biological pathways involved in chemotherapy response in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008; 10:R37

Troester MA, Herschkowitz JI, Oh DS, He X, Hoadley KA, Barbier CS et al. Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer*. 2006; 6:276.

Troester MA, Hoadley KA, Sørlie T, Herbert B-S, Børresen-Dale A-L et al. Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer. *Cancer Res*. 2004; 64:4218-26.

Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol*. 2003; 195: 158-67.

Untch M, von Minckwitz G. Review. Recent advances in systemic therapy. Advances in neoadjuvant (primary) systemic therapy with cytotoxic agents. *Breast Cancer Res*. 2009; 11:203

Urruticoechea A, Smith IS, Dowset M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 7212-20.

Vairo G, Soos TJ, Upton TM, Zalvide J, DeCaprio JA, Ewen ME et al. Bcl-2 retards cell cycle entry through p27^{Kip1}, pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol*. 2000; 20:4745-53.

van Diest PJ, van der Wall E, Baak JPA. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol*. 2004; 57:675-81.

van Slooten H-J, van de Vijver MJ, van de Velde CJH, van Dierendonck JH. Loss of bcl-2 in invasive breast cancer is associated with high rate of cell death, but also with increased proliferative activity. *Br J Cancer*. 1998; 77:789-96.

Vargas-Roig LM, Cuello-Carrión, Fernandez-Eskobar N, Daguerre P, Leuzzi M, Ibarra J et al. Prognostic value of bcl-2 in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline based chemotherapy. *Molecular Oncol*. 2008; 2:102-11.

Vikhanskaya F, Siddique MM, Kei Lee M, Broggin M, Sabapathy K. Evaluation of the combined effect of p53 codon polymorphism and hot spot mutations in response to anticancer drugs. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:4348-56.

Vincent - Salomon A, Rousseau A, Jouve M, Beuzeboc P, Sigal-Zafrani B, Fréneaux P et al. Proliferation markers predictive of the pathological response and disease outcome of patients with breast carcinomas treated by anthracycline-based preoperative chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2004; 40:1502-8.

Vinnicombe SJ, MacVicar AD, Guy RL, Sloane JP, Powles TJ, Knee G et al. Primary breast cancer: mammographic changes after neoadjuvant chemotherapy, with pathologic correlation. *Radiology.* 1996; 198:333-40.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000; 408:307-10.

von Minckwitz G, Sinn H-P, Raab G, Loibl S, Blohmer J-U, Eidtmann H et al. Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2008; 10:R30

Vousden KH, Lu X. Live or let to die: the cell's response to p53. *Nat.Rev.Cancer.* 2002; 2:594-604.

Wallace-Brouder RR, Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. *CMLS, Cell Mol Life Sci.* 1999; 54:64-75.

Wang J, Buchholz TA, Middleton LP, Allred DC, Tucker SL, Kuerer HM et al. Assessment of histologic features and expression of biomarkers in predicting pathologic response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer.* 2002; 94:3107-14.

Weller M. Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell Tissue Res.* 1998; 292:435-45.

Willis A, Jung EJ, Wakefield T, Chen X. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene.* 2004; 23:2330-8.

Xu Y, Yao L, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z et al. P53 codon polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:7328-33.

Yang Q-F, Sakurai T, Yoshimura G, Shan L, Suzuma T, Tamaki T et al. Expression of Bcl-2 but not Bax or p53 correlates with in vitro resistance to a series of anticancer drugs in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 61: 211-6.

Yu J, Zhang L. No PUMA, no death: Implications for p53 – dependent apoptosis. *Cancer Cell*. 2003; 248-9.

Zhang Y, Yang J-ming. The impact of cellular senescence in cancer therapy: is it true or not? *Acta Pharmacologica Sinica*. 2011; 32:1199-1207.

Zhivotovsky B, Orrenius S. Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance. *Seminars Cancer Biol*. 2003; 13:125-134.

Zhou B, Yang D, Xie F. Biological markers as predictive factors of response to neoadjuvant taxanes and anthracycline chemotherapy in breast carcinoma. *Chinese Med J*. 2008; 121:387-91.

Zong W-X and Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*. 2006; 20:1-15.

Zunino F, Perego P, Pilotti S, Pratesi G, Supino R, Arcamone F. Role of apoptotic response in cellular resistance to cytotoxic agents. *Pharmacol Ther*. 1997; 76:177-85.

Biografija autora

Ksenija (Stanko) Kanjer rođena je 14.05.1963. god. u Beogradu. Osnovno školovanje (OŠ "Vladislav Ribnikar", 5.0/5.0), i srednje obrazovanje - sticanje srednjeg stručnog zvanja tehničar za biohemiju i molekularnu biologiju (VIII beogradska gimnazija, 5.0/5.0), završila je u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je šk.god. 1982/83. god. a diplomirala 19.09.1988. sa prosečnom ocenom 9.11/10. Nakon obavljenog lekarskog staža (KBC "Dr Dragiša Mišović", Beograd, 1988 – 1989) i položenog stručnog ispita, upisuje magistarske studije – odsek onkologija (šk.god.1989/90) na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od jula 1991. god. zasniva stalni radni odnos na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Magistarski rad pod nazivom „Prognostički značaj estrogene zavisnosti u malignom tumoru dojke – receptori za estrogen i progesteron“ pod mentorstvom Acad. Prof. dr Ivana Spužića, odbranila je 14. 03.1994. Specijalizaciju iz patološke anatomije otpočela je šk. god. 1994/95., a specijalistički ispit sa odličnim uspehom položila je 25.01.2000. U cilju usavršavanja i obuke za (*eng. tissue microarray*) boravila je na Institut für Pathologie, Heinrich - Heine Universität Düsseldorf, jan-feb. 2007. U Nov. 2009, ZEISS Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, pohađala je obuku za metodu laserske mikrodisekcije preparata (LMPC). Kao autor odnosno koautor objavila je 24 naučna rada objavljenim u domaćim i međunarodnim časopisima. Od strane Lekarske komore Srbije odobrena joj je licenca pod br. 105138 (2009 -). Član je Srpskog lekarskog društva, Srpskog društva istraživača raka i Evropske organizacije za istraživanje kancera (*EORTC*).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а KSENİJA S. KANJER

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

TERAPIJSKI ODGOVOR KARCINOMA ŽUTRE NA CITOTOKSICNE
LEKOVE ANALIZOM MARKERA APOPTOZE I PROLIFERACIJE STANIČA

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 28.05.2013.

Потпис докторанда

Ksenija Kanjer

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада

Име и презиме аутора

Ksenija S. Ranjer

Број уписа

Студијски програм

Наслов рада

Ментор

Тератолошки одговор карцинома дојке на цитотоксичне лекове
антихормоналне агонисте и селективне инхибиторе
Prof. dr. Svetlana Tadic

Потписани

Ksenija S. Ranjer

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 28. 05. 2013.

Ksenija Ranjer

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

TERAPIJSKI ODGOVOR KARCINOMA ŽUKE NA CITOTOKSICNE
LEKOVE ANALIZOM MARKERA APOPTOZE I PROLIFERACIJE CELIJA

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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 полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 29.05.2013.

