

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04.2016. godine, broj 5940/4 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Prognosti ki zn j kl si nih i molekul rnih biom rker ranog karcinoma dojke u pra enju toka bolesti”**

kandidata mr dr Marka Bute, zaposlenog u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu, kao lekar specijalista opšte hirurgije. Mentor je Prof. dr Radan Džodi a komentor N.Sar.dr sci Milan Marki evi .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof.dr Zorica Miloševi , profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu.
2. Doc.dr Marina Nikitovi , docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu
3. NS dr sci med .Zorka Milovanovi , Institut za onkologiju i radilogiju Srbije, služba patologije

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Marka Bute napisana je na 100 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 11 grafikona, 9 tabela i 3 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena imena korištenih u tekstu.

U **uvodu** je istaknuto da primarni operabilni invazivni karcinom dojke predstavlja biološki i biohemijski heterogeno oboljenje, što se manifestuje heterogenim tokom bolesti, odnosno neizvesnošću u pogledu predviđenih ishoda liječenja. Prikazana su aktuelna saznanja o epidemiologiji i etiopatogenezi karcinoma dojke, mehanizmima kancerogeneze i procesa metastaziranja. Objasnjeni su modeli heterogenosti tumora (kancerska stem ćelija i stohastički model) kao i značaj epitelno-mezenhimalne tranzicije i uspavanosti tumora u procesu metastaziranja. Detaljno je opisan značaj klasičnih prognostičkih faktora karcinoma dojke (patološka veličina tumora, status aksilarnih limfnih nodusa, histološki i nuklearni gradus tumora, histološki tip tumora, limfo-vaskularna invazija, starost bolesnice i menstrualni status kao i status receptora ER, PR, HER2, Ki67). Istaknuta je potreba za istraživanjem novih prognostičkih markera zbog činjenice da značajan broj pacijenata sa karcinomom dojke u ranom stadijumu ima mikroskopske metastaze u trenutku postavljanja dijagnoze. Objasnjena je uloga proteaze urokinazni plazminogen aktivator (uPA) kao i njegovog inhibitora, plazminogen aktivator inhibitor (PAI-1) u procesu remodelovanja ekstracelularnog matriksa i metastaziranja raka dojke. Opisana je i uloga proteaze katepsina D koji osim fiziološke uloge u katabolizmu proteina ima i brojne uloge u procesu rasta i metastaziranja karcinoma, verovatno usled toga što katepsin D stimuliše rast mikrometastaza na udaljenim mestima, pre nego lokalnu invaziju putem razaranja bazalne membrane.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Opšti cilj ovog istraživanja je da se na osnovu novih strategija, znanja i povezanju eksperimentalne i kliničke onkologije, utvrdi svrsishodnost utvrđivanja značajnosti predloženih biomarkera, u ranoj i/ili kasnijem periodu biološkog toku karcinom dojke u grupi postmenopauzalnih bolesnica, i to a) klasičnih biomarkera (in situ tumor (godine bolesnica), b) klasičnih biomarkera tumor (veličina tumor, histološki gradnja i tip tumor), c) molekularnih biomarkera estrogene zavisnosti tumor (status receptora za estrogen i receptor za progesteron) i d) molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija (uPA, PAI-1 i katepsin D). U okviru ranog, kasnog i dugotrajnog praćenja tok bolesti postavljeni su sledeći konkretni ciljevi ovog istraživanja: 1) da se ispituje raspon vrednosti molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija u podgrupama bolesnica definisanih na osnovu klasičnih biomarkera estrogene zavisnosti tumor; 2) da se ispituje korelacija vrednosti molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija s vrednostima kontinuiranih klasičnih biomarkera estrogene zavisnosti tumor; 3) da se koristi enjerm tzv. „pristup minimumne p vrednosti“ (eng. „minimum p value approach“) odredbe granične vrednosti z kontinuirane biomarkere, na osnovu kojih bi se definisao status tih biomarkera; 4) da se ispituje prognostička značajnost fenotipov karcinom dojke definisanih na osnovu statusa dva ili više ispitivanih biomarkera, s ciljem identifikovanja podgrupa bolesnica s niskim/višim rizikom za ponovnu pojavu bolesti, definisanoj u odabranim metodama.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da su studijom obuhvaćeni pacijenti operisani u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije zbog invazivnog karcinoma dojke tokom 1993. godine, koji nisu imali metastaza u limfnim čvorovima a koji nisu, prema tadašnjim protokolima, primili adjuvantu terapiju. Koncentracija receptora za estrogen i progesteron je određena klasičnom biohemijskom metodom (DCC metod, engl. dextran coated charcoal – ugalj obložen dekstranom) preporučenom od strane EORTC-a. Imunohistohemijski je određivan HER 2 receptorski status korišćenjem anti HER 2 anti-tela na osnovu rezultata testiranja dodeljivan je sledeći skor: 0, 1+, 2+, 3+. Rezultat testa je negativan pri skorima 0 i 1, a pozitivan pri skorima 2 i 3. Pacijentkinje sa HER 2 skorom 2+ retestirane su CISH (chromogenic in situ hybridization) metodom prema revidiranim ASCO/CAP preporukama. Za kvantitativno određivanje humanog urokinaznog plazminogen aktivatora i njegovog inhibitora u ekstraktima tkiva, plazme i ćelijskih kultura korišćen je IMUBIND® uPA-PAI-1 ELISA (American Diagnostica, USA). Koncentracija katepsina D određivana je iz istog citosolnog ekstrakta iz kojeg je određivana koncentracija steroidnih

receptora koriste i IRMA metodu, tj. njenu modifikacijom - sendvič " imunoradiometrijski esej na vrstoj fazi pomoću komercijalnog kompleta za kvantitativno određivanje katepsina D (ELSA-CATH-D, CIS Biointernational, Gif-Sur-Yvet, France).

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 371 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

U ranom praćenju, tokom prvih 5 godina nakon operacije: udaljenje metastaze karcinoma dojke su se javljale oko tri puta češće u grupi pacijentkinja sa tumorima pT2,3 u odnosu na grupu pacijenata pT1 (10% vs. 33%) a odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ( $p=0,02$ ). Udaljenje metastaze lobularnog invazivnog karcinoma dojke su 2.82 puta bile češće u odnosu na lobularni (33.3% CLI vs 11.8% CDI, a odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ( $p=0,04$ ). Udaljenje metastaze karcinoma dojke su 3.1 puta bile češće kod tumora sa PAI-1 pozitivnim statusom u odnosu na PAI-1 negativan status (37.5% PAI-1 pozitivni vs 12.1% PAI-1 negativni). a odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ( $p=0,04$ ). Povoljniji tok bolesti primećen je kod pacijentkinje sa pT1 tumorima ( $p=0,02$ ), sa IDC tumorima ( $p=0,04$ ) ili sa negativnim statusom PAI-1 ( $p=0,02$ ).

Identifikovana je visokorizična podgrupa pacijentkinja sa tumorima jednakim ili većim od 2 cm i pozitivnim statusom PAI-1 (pT2,3 PAI-1 pozitivne) u odnosu na grupu pacijentkinja sa tumorima manjim od 2 cm, nezavisno od statusa PAI-1, ili sa tumorima jednakim ili većim od 2 cm i negativnim statusom PAI-1 (pT1 PAI-1 negativne; pT1 PAI-1 pozitivne; pT2,3 PAI-1 negativne).

Prva grupa navedenih pacijentkinja je imala nepovoljniji tok bolesti, sa obzirom na verovatnoću za DFI od  $P=0,88$ , u odnosu na prvospomenute koje su imale verovatnoću za DFI od  $P=0,43$ .

Ustanovljeno je da se verovatnoće za DFI statistički značajno razlikuju ( $p<0.001$ ) između ove dve grupe. Tokom drugih 5 godina nakon operacije povoljniji tok bolesti primećen je kod mlađih pacijentkinja od 56 godine od kojih ni jedna pacijentkinja nije imala relaps bolesti u odnosu na pacijentkinje 56 ili više godina od kojih su 33.3% imale relaps bolesti a odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ( $p=0,03$ ). Udaljenje metastaze

karcinoma dojke bile su 3.9 puta češće kod pacijentkinja sa pozitivnim statusom ER u odnosu na grupu pacijentkinja sa negativnim statusom ER, a verovatno je za DFI između ove dve grupe pacijentkinja su se statistički značajno razlikovale ( $p=0,009$ ). Udaljene metastaze karcinoma dojke bile su čak 5.6 puta češće u grupi pacijentkinja sa negativnim statusom uPA, a verovatno je za DFI između ove dve grupe pacijentkinja su se statistički značajno razlikovale ( $p=0,003$ ). Udaljene metastaze karcinoma dojke bile su češće u grupi pacijentkinja starijih od 56 godina i pozitivnim ER statusom u odnosu na mlađe od 56 godina, bez obzira na status ER, ili one stare 56 ili više godina, a sa negativnim statusom ER, sa obzirom na to da su odgovarajuće verovatno je za DFI bile  $P=0,55$  i  $P=0,9$ , respektivno, i da su se statistički značajno razlikovale  $p=0,003$ . Povoljniji tok bolesti su imale pacijentkinje mlađe od 56 godina, bez obzira na status uPA, ili one stare 56 ili više godina, a sa pozitivnim statusom uPA u odnosu na pacijentkinje stare 56 ili više godina, a sa negativnim statusom uPA pri čemu su odgovarajuće verovatno je za DFI bile  $P=0,95$  i  $P=0,59$ , respektivno, i statistički su se značajno razlikovale ( $p=0,008$ ). Najnepovoljniji tok bolesti su imale pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER i negativnim statusom uPA imale kada se posmatraju analizirani fenotipovi definisani starošću u pacijentkinja i statusima ER i uPA. Posmatrajući period tokom prvih 10 godina nakon operacije pokazano je da su udaljene metastaze karcinoma dojke bile češće u grupi pacijentkinja starijih od 56 godina u odnosu na mlađe od 56 godina a odgovarajuće verovatno je za DFI su se statistički značajno razlikovale ( $p=0,003$ ). Povoljnija prognoza pacijentkinja sa rakom dojke je primećena u grupi mlađih od 59 godina sa negativnim statusom ER u odnosu na pacijentkinje stare 59 ili više godina, nezavisno od statusa ER, ili mlađe od 59 godina sa pozitivnim statusom ER, a odgovarajuće verovatno je za DFI su se statistički značajno razlikovale ( $p<0,001$ ).

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Još 1988.godine su Daffy i saradnici pokazali svoje preliminarne rezultate da pacijenti sa veći vrednosti uPA imaju kraći DFI. Nedugo zatim su rezultati ovih preliminarne studija potvrđeni od strane Janicke-a i saradnika publikacijama 1989.godine u časopisu Lancet a potom i 1990.godine. Nakon toga usledila je serija publikacija o značaju ovih novih molekularnih biomarkera karcinoma dojke, uključujući i katepsin D. Jedan od zadataka ove doktorske disertacije bila je procena značaja molekularnih biomarkera, posebno uPA i PAI-1 u odnosu na ranu pojavu metastaza. Interesantno je da je samo PAI-1 pokazao prognostički značaj tokom ranog perioda

prajenje. Visoki nivoi PAI-1 su predviđali lošu prognozu pacijenta ali do danas nisu otkriveni biološki i molekularni mehanizmi koji su odgovorni za visoke vrednosti ovog molekularnog biomarkera. Bajou i saradnici su pokazali da PAI-1 podstiče tumorski rast i angiogenezu. Rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji su u skladu sa već poznatom dvostrukom aktivnošću u PAI-1, dakle sa sprečavanjem uPA/plazmin proteolize i stimulacijom signalnih puteva koji se odnose na tumorski rast i angiogenezu. Važno je naglasiti da ovakva uloga PAI-1 može objasniti ranu pojavu udaljenih metastaza. Tokom drugih pet godina nakon hirurške intervencije PAI-1 je izgubio svoju značajku i na osnovu rezultata uPA se izdvojio kao odličan biomarker prognoze pacijenata. Načeno je statistički značajna razlika u verovatnoći za DFI između u grupe pacijentkinja koje su uPA pozitivne u odnosu na uPA negativne ( $p=0.04$ ). Kod uPA- negativnih pacijentkinja učestalost je 5.6 puta veća pojava udaljenih metastaza u odnosu na grupu uPA pozitivnih pacijentkinja. U većini studija uPA negativnost je bila povezana sa odličnom prognozom ali treba naglasiti da ni u jednoj studiji nije posebno posmatran period tokom drugih pet godina nakon operativnog lečenja.

Rezultati studije Chemo-N0 trial su publikovani 2013.godine a to je ujedno bila prva prospektivna multicentri na randomizovana studija koja je proučavala značaj molekularnih biomarkera uPA i PAI-1 kod pacijenata bez zahvata u limfnim čvorovima sa periodom praćenja od 10 godina. (pN0)]. U podgrupi pacijenata koji nisu primali nikakvu sistemsku adjuvantnu terapiju a koji su imali visoke vrednosti uPA/PAI-1 (cut off: uPA, 3 ng/mg; PAI-1, 14 ng/mg) primećena je veća stopa relapsa u odnosu na pacijente sa niskim vrednostima ovih biomarkera. Udruženi status uPA i PAI-1 kod pacijenata sa histološkim gradusom tumora II je takođe bio značajan pokazatelj rizika u smislu ukupnog preživljavanja. Postoje ipak neke razlike između kohorte pacijenata kod kojih nije primenjena adjuvantna sistemska terapija u ovoj doktorskoj disertaciji i odnosu na Chemo-N0 studiju. Najpre, u trajanju Chemo-N0 su bili uključeni pacijenti sa velikim tumorima između 1 i 5 cm bez obzira na status steroidnih receptora i menopauzni status. Period praćenja pacijenata se takođe razlikovao: u trajanju Chemo-N0 je iznosio od 5-167 meseci sa medijanom 113 meseci dok svi pacijenti uključeni u našu studiju, a koji nemaju relaps bolesti, imaju isti period praćenja. Rezultati trajala Chemo-N0 su pružili važne podatke i dokaze o značaju prognostičkih faktora uPA and PAI-1 kod pacijenata bez zahvata u limfnim čvorovima (pN0) obzirom da je studija bila prospektivna, odlično dizajnirana i sa dugim periodom praćenja.

## **D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije**

**Buta M, Džodi R, uriši I, Markovi I, Vujasinovi T, Marki evi M, Nikoli -Vukosavljevi D.** Potential clinical relevance of uPA and PAI-1 levels in node-negative, postmenopausal breast cancer patients bearing histological grade II tumors with ER/PR expression, during an early follow-up. *Tumour Biol.* 2015 Sep;36(10):8193-200.

## **E) Zaključak (obrazloženje nau nog doprinosa)**

Doktorska disertacija „**Prognosti ki zn j kl si nih i molekul rnih biom rker ranog karcinoma dojke u pra enju toka bolesti**” mr sci med dr Marka Bute predstavlja originalni nau ni doprinos u razumevanju mehanizama koji u estvuju u procesu kancerogeneze i metastaziranja karcinoma dojke kao i zna aju novih molekularnih biomarkera ranog karcinoma dojke.

Ova doktorska disertacija je ura ena prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaključci.

Glavi doprinos ove doktorske disertacije u pogledu prognoze karcinoma dojke je taj da je pokazano da PAI-1 može da doprinese prognosti koj vrednosti pT tokom ranog pra enja bolesti kod postmenopauzalnih pacijentkinja sa karcinom dojke koje imaju histološki gradus tumora II i pozitivnu ER/PR ekspresiju, tokom ranog pra enja bolesti. Na osnovu rezultata se može zaključiti da odre ivanje PAI-1 (uz pT) može biti korisno za identifikaciju visoko-rizi ne podgrupe pacijenata u okviru dobre prognosti ke grupe pN0, koje e imati korist od primene agresivnijeg le enja i identifikaciju nisko-rizi ne podgrupe kod koje ovakva terapija možda ne e biti neophodna.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju mr sci med dr Marka Bute i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 25.05. 2016.

lanovi Komisije:

Prof. dr Zorica Miloševi

---

Mentor:

Prof. dr Radan Džodi

---

Doc.dr Marina Nikitovi

---

NS dr sci med.Zorka Milovanovi

---