

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Mr sci med

dr Ivana M. Božović-Spasojević

**Prognostički značaj androgenog receptora
u ranom karcinomu dojke: meta-analiza**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

**UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY**

Dr Ivana Božović-Spasojević

**The prognostic role of androgen
receptor in patients with early stage
breast cancer:
A meta-analysis of clinical and gene
expression data**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentor: Prof. dr Svetislav Tatić, redovni profesor Katedre za patologiju,
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu,

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

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Radan Džodić, redovni profesor na Katedri za hirurgiju,
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

2. Doc dr Marina Nikitović, docent na Katedri za radiologiju,
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

3. N. Sav. dr Mirjana Branković Magić, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

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

- *Prof. dr. Svetislavu Tatiću, mom mentoru, dugujem zahvalnost za pruženu pomoć, podršku i razumevanje tokom izrade ove teze.*
- *Iskreno se zahvaljujem dr. Snežani Šušnjar na savetima i svesrdnoj pomoći.*
- *Takođe, zahvaljujem se profesoru Christos Sotiriou sa Univerziteta "Univeriste Libre de Bruxelles", iz Belgije, koji mi je pomogao u oblikovanju teme kao i tehničkoj podršci i omogućio da jedan deo svog rada sprovedem na Institutu Jules Bordet u Briselu, Belgiji.*
- *Mom ocu, profesoru Marinku Božoviću na podstreku da istrajem u svom naučnom radu, kako svojim ličnim primerom tako i nesebičnom ljubavlju. Takođe, dao je doprinos mojoj disertaciji lektorisanjem teksta.*
- *Mom suprugu, Vladimiru Spasojeviću, inženjeru elektrotehnike, na tehničkoj pomoći i podršci, kao i na razumevanju i strpljenju.*
- *Mojim najbližima, koji su svojom ljubavlju bili moja svakodnevna podrška.*
- *Ovaj doktorat posvećujem svojoj majci, Milanki Božović, koja nas je prerano napustila.*

PROGNOSTIČKI ZNAČAJ ANDROGENOG RECEPTORA U RANOM KARCINOMU DOJKE:

META-ANALIZA

REZIME

Uvod: Androgeni receptor je u visokom procentu zastupljen u tkivu karcinoma dojke, gde se može naći i do 70%, ali je njegov značaj do sada nedovoljno ispitivan.

Cilj: Želeli smo da ispitamo prognostičku ulogu androgenog receptora u ranom karcinomu dojke (KD).

Metrijal i metode: Prognostičku ulogu androgenog receptora (AR) ispitivali smo kroz meta-analizu publikovanih kliničkih studija koje su ispitivale uticaj ekspresije AR na preživljavanje bez bolesti (eng. *disease free survival-DFS*), kao i ukupno preživljavanje (eng. *overall survival-OS*) kod pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke. Koristeći ključne reči na engleskom jeziku "karcinom dojke" i "androgen receptor" pretražili smo dostupne elektronske baze podataka (PubMed, Google school i Cochrane review) kako bismo identifikovali studije koje su odgovarale unapred zadatim kriterijumima. Kvalitativnu procenu studija koje su selektovane za kliničku meta-analizu vršili smo pomoću REMARK kriterijuma. U skopu meta-analize izračunali smo kombinovani indeks rizika (eng. *hazard ratio-HR*) sa 95% intervalom poverenja (eng. *confidence interval-CI*) koristeći AR negativne pacijentkinje kao referentnu vrednost. Drugi deo meta-analize se odnosi na podatke dobijene ekspresijom gena (eng. *gene-expression*) dostupnih kroz setove podataka mikroareja (eng. *microarray*) pacijentkinja sa KD i poznatim ishodom bolesti. Koristeći PAM50 molekularni klasifikator (eng. *molecular classifier*) odredili smo molekularne podtipove KD. Ispitali smo korelaciju AR iRNK sa kliničko-patološkim

varijablama, drugim individualnim genima i genskim zapisima (eng. *gene signatures*) i kliničkim ishodom.

Rezultati: Identifikovali smo 33 podobne studije za kliničku meta-analizu. Nakon kvalitativne procene izdvojili smo 22 studije sa ukupno 10.004 pacijentkinja, koje su smatrane podobnim za kliničku meta-analizu. Analiza je pokazala da je AR pozitivnost, definisana imunohistohemijski, bila udružena sa boljim preživljavanjem bez bolesti (DFS) kod svih pacijentkinja sa KD [univarijantna analiza (U) HR 0.61, 95% CI 0.52-0.72, $p < 0.001$ i multivarijantna (M) analiza HR 0.46, 95% CI 0.37-0.58, $p < 0.001$], kao i ukupnim preživljavanjem [U-HR 0.62, 95% CI 0.51-0.75, $p < 0.001$; M-HR 0.53, 95% CI 0.38-0.73, $p < 0.001$]. Klinički rezultati su potvrđeni i analizom genske ekspresije koja je obuhvatila 35 setova podataka sa 7.737 pacijentkinja i ranim KD. Analiza genske ekspresije je pokazala da visoka ekspresija *AR i RNK* dovodi do boljeg preživljavanja, kako u odnosu na DFS (HR 0.82 95%CI 0.72-0.92; $p = 0.0007$), tako i u odnosu na OS (HR 0.84 95%CI 0.75-0.94; $p = 0.02$), ali samo u univarijantnoj analizi.

Zaključak: Naša analiza sprovedana na oko 17.000 pacijentkinja sa ranim KD, kako klinička tako i analiza genske ekspresije, je pokazala da AR ima ulogu prognostičkog faktora boljeg preživljavanja i ishoda bolesti.

Ključne reči: meta-analiza, karcinom dojke, androgeni receptor, prognostički faktor, genska ekspresija.

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: onkologija

UDK broj:

THE PROGNOSTIC ROLE OF ANDROGEN RECEPTOR IN PATIENTS WITH EARLY STAGE BREAST CANCER: A META-ANALYSIS

ABSTRACT

Background: Androgen receptor (AR) expression has been observed in about 70% of breast cancer (BC) patients, but its prognostic role is not yet established.

Aim: To evaluate prognostic role of androgen receptor in patients with early breast cancer.

Methods: To assess the prognostic role of AR in breast cancer we performed a meta-analysis of studies that evaluated the impact of AR on disease free survival (DFS) and/or overall survival (OS) in patients with early stage BC. Eligible studies were identified by systematic review of electronic databases using the MeSH terms "breast neoplasm" and "androgen receptor". Evaluable studies were selected after a qualitative assessment based on the REMARK criteria. We report combined Hazard Ratios (HRs) with 95% confidence intervals (CI) using AR negative patients as a reference. In addition, we conducted an *in-silico* pooled analysis of publicly available microarray data sets, from patients with early stage BC with known gene expression profiling and clinical outcome. By using PAM50 molecular classifier we assigned patients to molecular subtypes. We explored correlations of AR mRNA levels with clinico-pathological variables, other individual genes and gene signatures and clinical outcome.

Results: 22 out of 33 eligible studies for the clinical meta-analysis, including 10.004 patients, were considered as evaluable for the current study after the qualitative

assessment. AR positivity defined by IHC was associated with improved DFS in all BC patients [univariate analysis (U) HR 0.61, 95% CI 0.52-0.72, $p < 0.001$ multivariate analysis (M), HR 0.46, 95% CI 0.37-0.58, $p < 0.001$] and better OS [U-HR 0.62, 95% CI 0.51-0.75, $p < 0.001$; M-HR 0.53, 95% CI 0.38-0.73, $p < 0.001$]. 35 datasets including 7.220 patients were eligible for the pooled gene expression analysis. High AR mRNA levels were found to confer positive prognosis overall in terms of DFS (HR 0.82 95%CI 0.72-0.92; $p = 0.0007$) and OS (HR 0.84 95%CI 0.75-0.94; $p = 0.02$) only in univariate analysis.

Conclusion: Our analysis, conducted among more than 10,000 women with early stage BC, demonstrates that AR positivity provides prognostic information overall, serving as good prognostic factor. Further studies are needed to delineate its prognostic impact within the different subtypes of the disease.

Key words: Meta-analysis, androgen receptor, breast cancer, prognosis, gene expression signatures.

Scientific field: medicine

Scientific subfield: oncology

UDK number:

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Karcinom dojke.....	1
1.2 Uloga androgena.....	2
1.3 Struktura i funkcija androgenog receptora.....	3
1.4 Uloga androgena i AR u kancerogenezi karcinoma dojke.....	9
1.5 Epidemiološki podaci.....	12
1.6 Klinički podaci.....	13
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	15
3. MATERIJAL I METODE.....	18
3.1 Klinička meta-analiza.....	18
3.2 Genska meta-analiza.....	24
3.3 Statistička analiza.....	26
3.3.1 Klinička meta-analiza.....	26
3.3.2 Genska meta-analiza.....	27
4. REZULTATI.....	28
4.1 Klinička meta-analiza.....	28
4.1.1 PRIZMA algoritam i selekcija studija za kliničku meta-analizu.....	28
4.1.2 Meta-analiza prognostičkog značaja ekspresije AR u celokupnoj populaciji pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke, u podobnim kliničkim studijama.....	37
4.1.3 Meta-analiza prognostičkog značaja ekspresije AR u IHH definisanim podgrupama pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke, iz podobnih kliničkih studija.....	39
4.2 Genska meta-analiza.....	42
4.2.1 PRIZMA algoritam, selekcija i karakteristike identifikovanih setova podataka genske ekspresije.....	42
4.2.2 Meta-analiza prognostičkog značaja ekspresije <i>iRNK AR</i> u celokupnoj populaciji pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke na podobnim setovima genske ekspresije.....	44
4.2.3 Meta-analiza prognostičkog značaja ekspresije <i>iRNK AR</i> kod molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke na podobnim setovima genske ekspresije.....	47
4.2.4 Udruženost ekspresije <i>iRNA AR</i> sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno, iz dostupnih setova genske ekspresije ...	55
4.2.5 Udruženost <i>iRNK AR</i> sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke, iz dostupnih setova genske ekspresije.....	59
4.2.6 Korelacija ekspresije <i>iRNK AR</i> sa individualnim genima i genskim zapisima (eng. <i>gene signature</i>), kod svih pacijentkinja zajedno.....	69

4.2.7 Korelacija ekspresije <i>iRNK AR</i> sa individualnim genima i genskim zapisima (eng. <i>gene signature</i>) kod molekularnih podtipova karcinoma dojke iz dostupnih setova genske ekspresije.....	72
4.2.8 Odgovor na neoadjuvantnu terapiju u odnosu na ekspresiju <i>iRNA AR</i> kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno, kao i u okviru molekularnih podtipova	78
5. DISKUSIJA	81
6. ZAKLJUČCI.....	94
7. LITERATURA.....	95

1. UVOD

1.1 Karcinom dojke

Karcinom dojke (KD) je najčešća maligna bolest kod žena i učestvuje sa jednom trećinom u ukupnom mortalitetu[1]. Iako je karcinom dojke češći kod postmenopauzних žena, oko 6% karcinoma dojke se dijagnostikuje kod žena mlađih od 40 godina.

Veliki pomaci učinjeni su u protekloj deceniji u boljem razumevanju biologije tumora dojke. Novija istraživanja potvrdila su kliničko iskustvo da nisu svi tumori dojke isti i da se značajno razlikuju po svom kliničkom toku i osetljivošću na sistemsko lečenje. Epohalni rad Čarls Perua (eng. *Charles Perou*) i koautora, objavljen 2000. godine je kroz analizu mikroereja (eng. *microarray analysis*) DNK tumora preoblikovao našu percepciju tumora dojke[2]. Ova analiza, koja omogućava ispitivanje na hiljade gena u samo jednom eksperimentu, pokazala je da se na osnovu ekspresije gena u tumorskom tkivu karcinom dojke može podeliti na najmanje 4 različita molekularna podtipa (eng. *intrinsic molecular subtypes*) i to: basal-like koji pokazuju karakteristike mioepitelijalnih ćelija i u velikoj meri se preklapa sa kliničkim oblikom trostruko (eng. *triple*) negativnog (ER/PgR/HER2-negativni) karcinoma dojke; HER2-like koji se karakteriše amplifikacijom c-ErbB2 gena, ili povećanom ekspresijom HER2 proteina i dva luminalni podtipa, luminal A i luminal B, koje karakteriše ekspresija estrogenog receptora (ER), kao i karakteristike luminalnih ćelija (hormon receptor (HR) pozitivni tumori dojke) i međusobnim razlikovanjem na osnovu proliferativnih markera poput ki67, uz napomenu da luminal A podtip je niskoproliferativni, dok je luminal B visokoproliferativni podtip karcinoma dojke. Ova nova podela na molekularne podtipove takođe je redizajnirala i klinička istraživanja u karcinomu dojke. Pomenuti podtipovi karcinoma dojke imaju i različito kliničko ponašanje. Luminal A podtip ima indolentno ponašanje, leči se uglavnom hormonoterapijom koja antagonizuje, ili degradira ER, ili inhibira enzim aromatazu. Luminal B podtip ima agresivno ponašanje uprkos hormon receptor pozitivnosti, visoku stopu ponovnog javljanja bolesti i lošije preživljavanje bez bolesti i ukupno preživljavanje. Prirodni tok inače agresivnog podtipa HER2 pozitivnog karcinoma dojke je promenjen uvođenjem ciljane anti-HER2 terapije, prvo monoklonskih antitela poput

trastuzumaba, a zatim i oralnih tirozin kinaznih inhibitora poput lapatiniba i neratiniba. Trostruko negativni podtip karcinoma dojke je najagresivniji podtip, udružen sa visokim mortalitetom, za koji još uvek ne postoji ciljana terapija, te se isključivo leči polihemioterapijom.

Nova istraživanja su ukazala da AR može imati ulogu u novoj podeli molekularnih podtipova KD. Naime, istraživanje celokupnog genoma TN karcinoma dojke je dovelo do subklasifikacije TN karcinoma dojke u 6 podtipova: *basal-like* 1 i 2 (BL1, BL2), koji su bogati genima uključenim u procese ćelijskog ciklusa, ćelijske deobe i odgovora na DNK oštećenja, kao i visokim indeksom ćelijske proliferacije, ki67; imunomodulatorni (IM) podtip koji je obogaćen genima uključenim u procese prenošenja signala imunih ćelija; mezenhimalni (M) i mezenhimalnim matičnim ćelijama sličan (eng. *mesenchymal stem cell like* MSL) podtip koji su obogaćeni signalnim putevima uključenim u ćelijski motilitet i diferencijaciju; luminal androgen receptor (LAR) podtip sa visokom ekspresijom AR i *RNKL*[3]. Ova nova podela TN karcinoma dojke je otvorila mogućnosti za razvoj nove i ciljane terapije kod svakog od TN podtipa ponaosob.

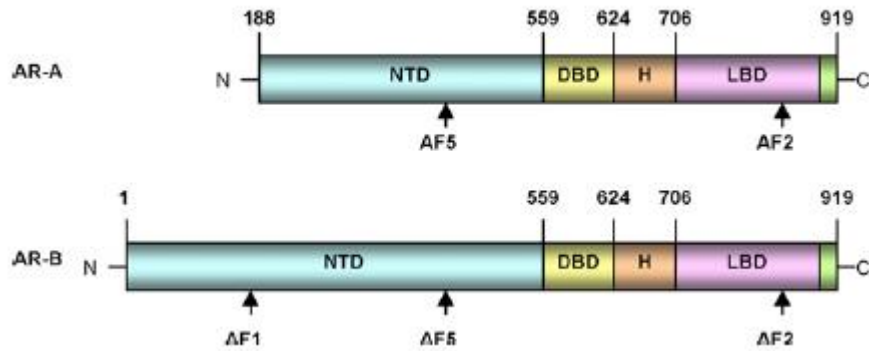
1.2 Uloga androgena

Androgeni kao glavni muški polni hormoni odgovorni su za razvoj muškog fenotipa tokom embriogeneze kao i za razvoj sekundarnih seksualnih karakteristika tokom puberteta. Pored njihove uloge na reprodukciju, androgeni utiču i na druga nereproduktivna tkiva poput kože, mišića, kostiju i mozga[4]. Androgeni, pre svih testosteron (T) i 5 α -dihidrotestosteron(DHT), ispoljavaju svoj efekat interakcijom sa specifičnim receptorom tj. androgenim receptorom (AR) koji pripada velikoj familiji ligand aktivirajućih nuklearnih hormonskih receptora. Prirodni ligandi za AR su T i potentniji DHT koji vezivanjem za receptor dovode do aktivacije ciljanog gena, tj.genske ekspresije, što posledično dovodi do aktivacije na transkripcionom nivou i sinteze određenog proteina[4]. Rezultat ove aktivnosti ima za posledicu gore navedeni razvoj primarnih i sekundarnih funkcija kod muškaraca. Međutim, uloga androgena je važna i kod žena. Naime, androgeni imaju ulogu u ženskoj reprodukciji s obzirom na to da je

dokazana disfunkcija jajnika kod ženki miševa kod kojih je eksperimentalno isključena funkcija AR[4]. Pet glavnih androgena kod premenopauzних žena su: dehidroepiandrosterone sulfat (DHEAS), dehidroepiandrosterone (DHEA), androstenedion, testosteron i dihidrotestosteron (DHT)[5]. DHEAS se isključivo kod premenopauzних žena sintetise u nadbubrezima, dok DHEA se sintetise do 50% u nadbubrezima, 20% u jajnicima i oko 30% nastaje perifernom konverzijom DHEAS u DHEA pomoću enzima sulfataze[6]. Androstenedion se podjednako sintetise i u jajnicima i u nadbubregu dok se oko polovina testosterona dobija perifernom konverzijom iz androstenediona, a druga polovina dobija sintezom u adrenalnim žlezdama i ovarijumima[7]. Tokom menopauze dolazi do značajnih promena u profilu hormona, najpre dolazi do značajnog pada nivoa estrogena i progesterona, dok je pad nivoa androgena manje dramatičan. Nivo testosterona u serumu postmenopauzних žena praktično ostaje nepromenjen, dok se nivo androstenediona praktično smanjuje na pola, najverovatnije kao posledica smanjene produkcije u ovarijumima, ali sugerišući da nakon menopauze ovarijum i dalje sintetise androgene. Tako androgeni postaju važan izvor estrogena kod postmenopauzних žena, kroz aromatizaciju, do estradiola i estrona u dojka i drugim tkivima[5].

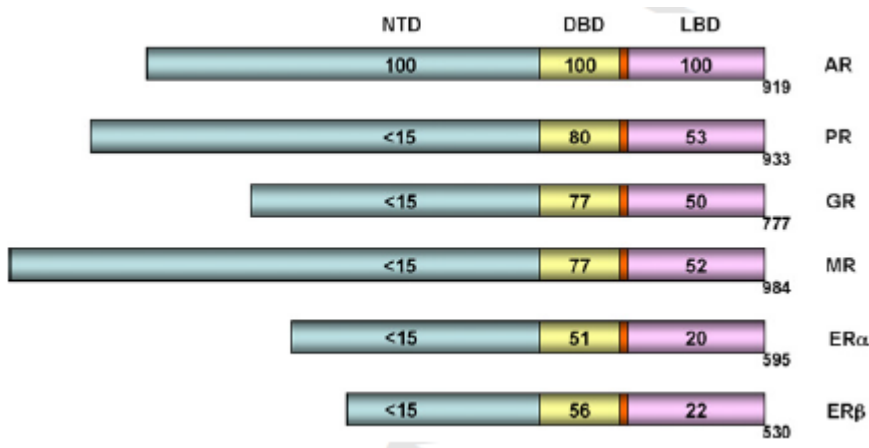
1.3 Struktura i funkcija androgenog receptora

Androgeni receptor (AR) pripada grupi nuklearnih steroidnih receptora kao i receptori za estrogen (ER) i progesteron (PR), ali za razliku od njih, ekspresija i uloga AR u karcinomu dojke nije tako opsežno proučavana. Androgeni receptor je protein organizovan u funkcionalni domen koje je predstavljen u vidu N-terminalnog regulatornog domena (eng. *N-terminal regulatory domain*, NTD), DNK-vezujućeg domena (eng. *DNA-binding domain*, DBD), malog vezujućeg domena (eng. *hinge*, H) i ligand vezujućeg domena (eng. *ligand binding domain*, LBD)(slika 1). Identifikovane su dve izoforme AR: A – 87 KDa i B – 110 KDa[8]. Razlika između ove dve forme AR ogleda se u nedostatku prvih 187 amino-kiselina kod AR-A izoforme.



Slika 1: Androgeni receptor - struktura dve izoforme humanog AR, AR-A i AR-B. Brojevi iznad barova označavaju broj rezidualanih aminokiselinskih ostataka koji razdvajaju domene počevši od N-terminalnog ka C-terminalnom kraju. N-terminalni regulatorni domen (eng. *N-terminal regulatory domain*, NTD), DNK-vezujući domen (eng. *DNA-binding domain*, DBD), mali vezujući domen (eng. *hinge*, H) i ligand vezujući domen (eng. *ligand binding domain*, LBD). Preuzeto i adaptirano iz Jin Li and Farook Al-Ayyawi, *Maturitas* 2009.

U poređenju sa AR, drugi članovi familije nuklearnih receptora poput glikokortikoidnog receptora (GR), mineralokortikoidnog receptora (MR), progesteronskog receptora (PR), estrogenskog receptora α i β ($Er\alpha$, $Er\beta$) su evoluciono usko povezani sa tačno određenim sekvencama DBD i LBD i funkcionalnim specifičnostima (slika 2).



Slika 2: Poređenje strukture familije humanih nuklearnih receptora. Androgeni receptor (AR), glikokortikoidni receptor (GR), mineralokortikoidni receptor (MR), progesteronski receptor (PR), estrogenski receptor α i β ($Er\alpha$, $Er\beta$) poseduju sličnu

strukturnu organizaciju koja se odnosi na DBD i hormon vezujući domen (LBD), a najmanju sličnost pokazuju kod NTD. *Preuzeto i adaptirano iz Jin Li and Farook Al-Ayyawi, Maturitas 2009.*

Polovina receptor kodirajuće sekvence kod AR pripada NT-domenu koji time posreduje u većini AR transkripcione aktivnosti, a osim toga jedan je od najaktivnijih koregulatora interakcija na površini receptora[9]. Pokazano je da se struktura NT-domena menja nakon vezivanja liganda, čime se postulira da NT-domen ustvari služi kao fleksibilna platforma za regrutovanje i prikupljanje koregulatora i članova transkripcione mašinerije, čime dobija ulogu primarnog medijatora u aktivnosti AR[10].

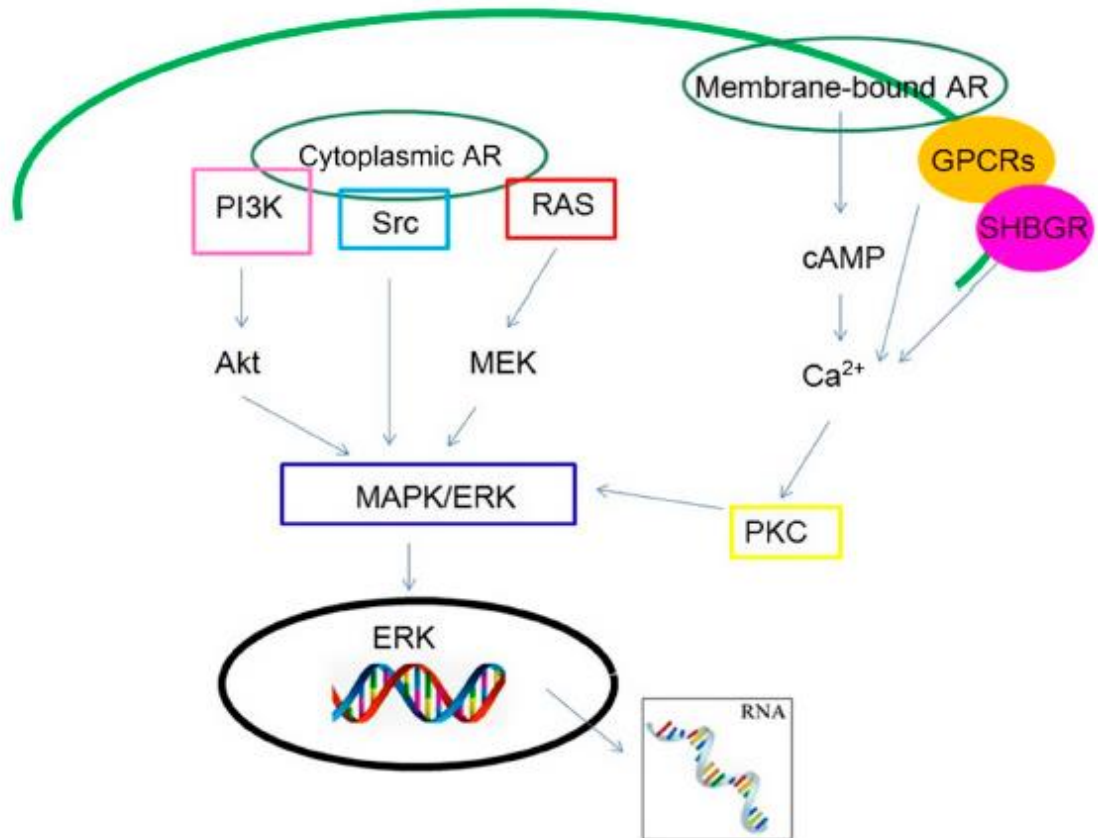
Vezivanjem androgena za AR indukuju se strukturne promene koje dovode do nuklearne translokacije receptora, povećane fosforilacije, formiranje homodimera i krajnje interakciju sa dezoksiribonukleinskom kiselinom (DNK). Ovaj sled događaja je odgovoran za aktivaciju androgen responsivnih elemenata ciljanih gena tj. za pokretanje transkripcije koja dovodi do ekspresije androgenom regulisanih gena[11].

Androgeni receptor ima dinamični mehanizam delovanja kroz nekoliko uzastopnih koraka definisanih kao transkripcioni, ili genomski mod aktivnosti. U odsustvu liganda AR se održava u neaktivnom kompleksu sa proteinom zvanim eng. *heat shock proteins*, HSP-70 i HSP-90. Molekul pratilac, na primer eng. *heat-shock* protein 90 (HSP90), održava AR u stanju visokog afiniteta za vezivanje za ligand, čime pomaže i podstiče odgovor AR na specifični ligand. Po vezivanju liganda ova veza se raskida, čime se omogućava translokacija AR u nukleus i vezivanje za DNK elemente. Jednom kada se veže za DNK, AR regrutuje koaktivatore i faktore transkripcije kako bi izmenio transkripciju i translaciju ciljanog gena. Dok agonisti regrutuju koaktivatore i dovode do transkripcije ciljanog gena, antagonisti, ili regrutuju korepresore, ili sprečavaju vezivanje koaktivatora za AR ili drže AR u citoplazmi onemogućavajući njegovu aktivaciju[12].

Rastući nivo dokaza ukazuje da, osim transkripcione aktivnosti AR, koja je indukovana steroidima, androgeni, baš kao i estrogen i progesteron, mogu ispoljiti brze negenomske efekte, odnosno efekte koji nemaju za uslov transkripciju i posledičnu sintezu proteina, već uključuje kaskadu konvencionalnih sekundarnih prenosnika eng. *second messengers*, signala koji moduliraju aktivnost AR[13]. Ovi efekti delovanja

androgena nastaju tipično aktivacijom sekundarnog prenosnika (eng. *messenger*) u kaskadi aktivacije signalnog puta najpre protein kinaze A, protein kinaze C i MAPK/ERK (MAPK mitogen aktivirajuća protein kinaza, eng. *Mitogen-Activated Protein Kinase*, ERK vanćelijska signal regulisana kinaza, eng. *Extracellular signal-Regulated Kinases*) signalnog puta, čime se indukuju različiti celularni efekti[14]. Uobičajeno, ovi efekti nastaju brzo tokom nekoliko sekundi i minuta, odnosno brzinom nedovoljnom i neophodnom za transkripcione promene i promene u sintezi proteina.

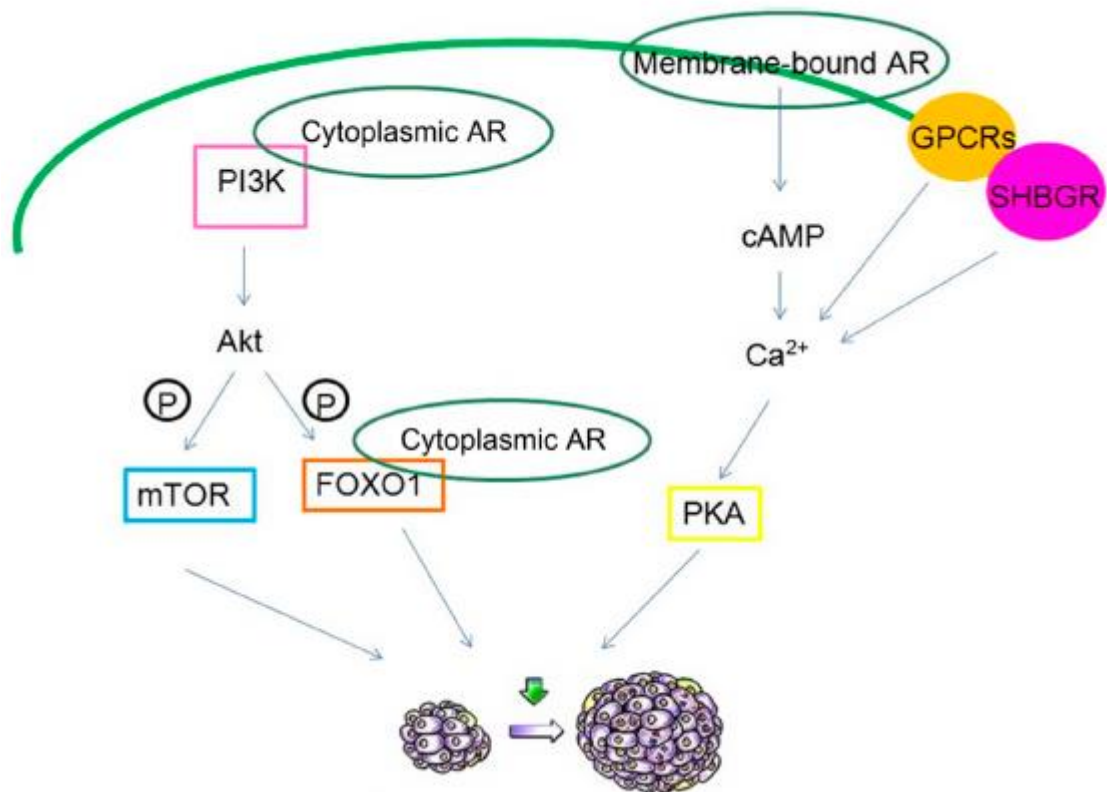
Ćelije karcinoma prostate proliferišu za nekoliko minuta u prisustvu androgena, što je vreme previše kratko za transkripciju i sintezu proteina, te se ova brza proliferacija objašnjava upravo brзом indukcijom sekundarnih prenosnika, eng. *second messengers*, za koji se smatra da može biti aktivan i u KD. Mehanizam AR signaliziranja, koji ne zavisi od transkripcije, može se dešavati u ERK-zavisnom i ERK-nezavisnom maniru. ERK zavisni mehanizam AR signalizacije je posredovan citoplasmatskim AR, koji u interakciji sa fosfoinozimid 3-kinazom eng. *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K), familijom Src kinaza i Ras GTP-azom utiče na MAPK/ERK signalni put i dovodi do ERK translokacije u jedro i interakcije sa transkripcionim faktorima, koji regulišu ekspresiju gena uključenih u ćelijsku proliferaciju. Štaviše, kao odgovor na androgene, AR vezan za ćelijsku membranu povećava nivo adenozin monofosfata (cAMP), podešava koncentraciju intraćelijskog kalcijuma, aktivira protein kinazu C (PKC), koji utiču na MAPK/ERK signalni put[13], (slika 3).



Slika 3: ERK-om posredovano AR signalizacija, nezavisna od transkripcije: (1) citoplazmatski AR u interakciji sa fosfoinozimid 3-kinazom (PI3K), Src familijom kinaza i Ras GTP-om, koji aktiviraju MAPK/ERK signalni put sa posledičnom ERK translokacijom u jedro i indukcijom gena koji dovode do ćelijske proliferacije. (2) AR vezan za membranu ili eng. *plasma membrane G protein-coupled receptors* (GPCRs), ili eng. *sex hormone-binding globulin receptor* (SHBGR), povećavaju nivo eng. *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP), moduliraju intraćelijski koncentraciju Ca²⁺ aktivirajući protein kinazu C (PKC), koja dalje aktivira MAPK/ERK signalni put. *Preuzeto iz Elisabetta Pietri et al, 2016, Endocr Relat Cancer*[13].

Mehanizam ERK-om posredovane AR signalizacije, nezavisan od transkripcije, posredovan je sledećim signalnim putevima: fosforilacijom eng. *mammalian target of rapamycin* (mTOR) uzrokovanom aktivacijom citoplazmatske AR/PI3K interakcije; fosforilacijom eng. *forkhead box protein O1* (FOXO1) i posledičnom inaktivacijom njegovog apoptotičkog signaliziranja putem citoplazmatske interakcije između AR/PI3K,

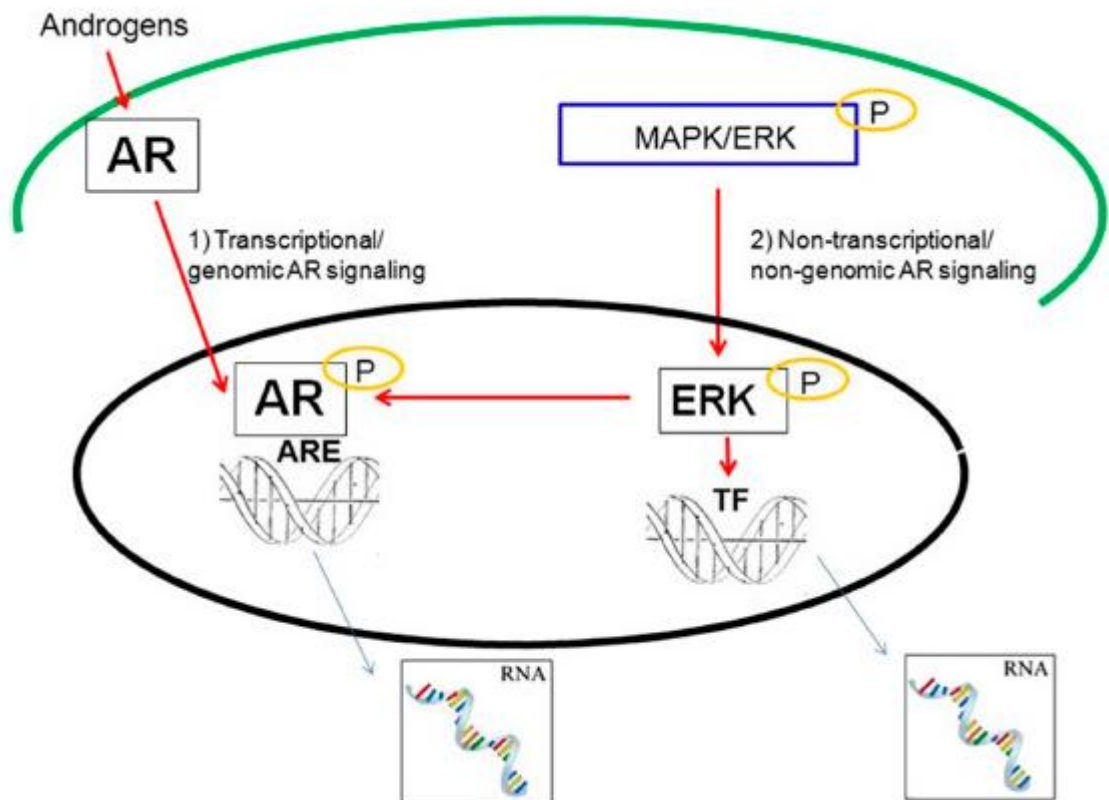
ili direktnom inaktivacijom citoplazmatskog AR sa FOXO1. Aktivirani mTOR i inaktivirani FOXO1 vode ka ćelijskoj proliferaciji, (slika 4).



Slika 4: ERK-om neposredovana netranskripciona AR signalizacija: (1) citoplazmatska AR/PI3K interakcija koja indukuje fosforilaciju i aktivaciju eng. *mammalian target of rapamycin* (mTOR), kao i fosforilaciju i inaktivaciju eng. *forkhead box protein O1* (FOXO1). Direktna interakcija citoplazmatske AR sa FOXO1, takođe, indukuje njegovu fosforilaciju i inaktivaciju. (2) Za ćelijsku membranu vezani AR/GPCRs/SHBGR, preko modulacije intraćelijske koncentracije Ca²⁺, aktiviraju protein kinazu A (PKA). Aktivirani mTOR i PKA kao i inaktivirani FOXO1 vode ka pojačanoj ćelijskoj proliferaciji. *Preuzeto iz Elisabetta Pietri et al, 2016, Endocr Relat Cancer[13].*

Smatra se da dva puta AR signalizacije, genomski i negenomski, nisu nezavisna, već da postoji međusobna povezanost i komunikacija i to preko ERK-a koji može povećavati transkripcionu aktivnost AR preko direktne fosforilacije AR i njegovih koregulatora. Ova petlja predstavlja negenomski mehanizam kontrole koji je sposoban

da generiše naglašen odgovor na androgenu stimulaciju. Osim toga smatra se da negenomska aktivnost AR kod KD predstavlja mehanizam rezistencije na anti-androgenu terapiju i danas je predmet istraživanja kod podtipova KD koji su vođeni AR stimulacijom, (slika 5).



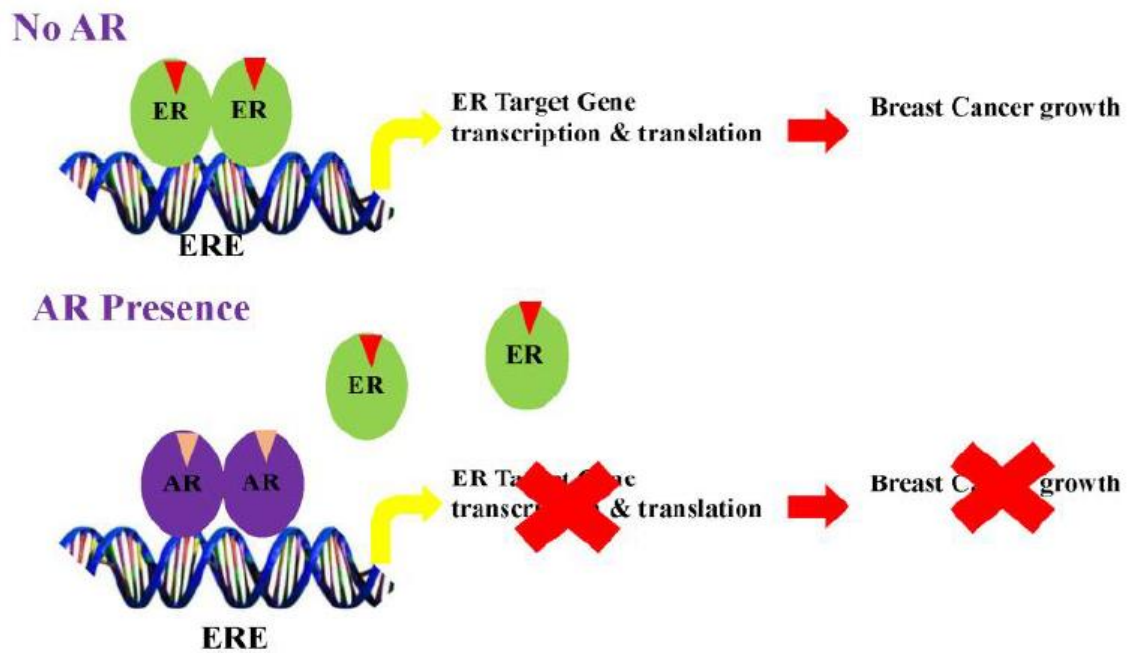
Slika 5: Unakrsna komunikacija između genomskog i negenomskog puta AR signalizacije. ERK pojačava AR transkripcionu aktivnost (transkripcijski/genomski signalni put) kroz direktnu fosforilaciju AR i njegovih koregulatora. *Preuzeto iz Elisabetta Pietri et al, 2016, Endocr Relat Cancer[13].*

1.4 Uloga androgena i AR u kancerogenezi karcinoma dojke

Polni hormoni imaju važnu ulogu u razvoju KD i faktori koji produžavaju životnu izloženost polnim hormonima poput rane menarhe, kasne menopauze i nulipariteta, mogu povećati rizik od KD[15, 16]. Postoji značajan nivo dokaza na eksperimentalnom, kliničkom i epidemiološkom nivou o ulozi estrogena u razvoju karcinoma dojke.

Međutim, uloga androgena je manje jasna i ne tako opsežno ispitivana, ali rastući nivo dokaza ukazuje na moguću ulogu povišenog nivoa cirkulišućih androgena na rizik od karcinoma dojke, pre svega, kod postmenopauzних žena. Mehanizam kancerogeneze polnih hormona se objašnjava dvojako: direktnim uticajem na ćelijski rast i nivo ćelijske proliferacije i posledične akumulacije genskih mutacija, ali i indirektnim delovanjem aromatizacijom androgena u estrogen[17]. Teorije poput "hiperandrogene teorije[18]", ili "ekscesne androgene terapije[19]" su pokušale da objasne visok nivo cirkulišućih androgena i rizik za nastanak najpre estrogen receptor (ER) pozitivnog karcinoma dojke. Ipak, pacijentkinje, koje boluju od sindroma policističnih ovarijuma, kod kojih je zabeleženo stanje hiperandrogenizma, tj. visok nivo cirkulišućeg testosterona i posledično anovuacija i izostanak menstruacije, nemaju rizik od KD viši u odnosu na ostalu populaciju. Sa druge strane dokazi, *in vivo*[20] i *in vitro*[21], govore u prilog tome da androgeni mogu imati protektivno dejstvo na tkivo dojke mogućim kompetitivnim delovanjem na stimulaciju i proliferaciju u odnosu na estrogen.

Uloga AR u kancerogenezi karcinoma dojke ispitivana je na ćelijskim linijama. Podaci dobijeni *in vitro* pokazuju da aktivacija AR može imati stimulatorno, ali i inhibitorno dejstvo na rast tumorskih ćelija u zavisnosti od vrste ćelijskih linija karcinoma dojke[22]. Ova disproporcija u funkciji AR smatra se da je uslovljena ekspresijom ER. Ovome idu u prilog i epidemiološke studije koje su ukazale na značajnu povezanost nivoa androgena u serumu sa rizikom za razvoj karcinoma dojke. Pokazalo se da je ova povezanost zavisna od životnog doba pacijentkinja, menstrualnog statusa i estrogenskog miljea u organizmu, sugerišući da androgen može delovati kao estrogenski antagonist kod premenopauzних žena, dok kod postmenopauzних deluje kao estrogenski agonist[23] (slika 6).



Slika 6: Mehanizam inhibicije estrogen receptor (ER) pozitivnog karcinoma dojke androgenim receptorom (AR). (1) ER, u prisutvu estrogena, vezuje se za estrogen responsivne elemente (ERE) i aktivira transkripciju i translaciju ciljanih gena. (2) AR, kada je aktiviran androgenima, zamenjuje estrogen i vezuje se za ERE čime blokira transkripcijski proces dovodeći do inhibicije ER-ciljanih gena. *Preuzeto iz Elisabetta Pietri et al, 2016, Endocr Relat Cancer[13].*

Poslednjih godina ispitivana je uloga AR u kancerogenezi HER2+ karcinoma dojke. Nedavno objavljeni rad na ćelijskim linijama dokazao je unakrsnu komunikaciju (engl. *cross talk*) između AR i HER2 signalnog puta, koja se ostvaruje putem vanćelijske signalne regulisane kinaze, tj. ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) i to na ćelijskim linijama tipa MDA-MB-453, koji predstavlja prototip molekularnog apokrinog karcinoma dojke [24]. Značaj ovog otkrića je u mogućoj kliničkoj primeni kombinovane terapijske blokade anti-AR i anti-HER2 s obzirom na to da je potencijalni sinergizam zabeležen u kombinaciji anti-androgena (flutamida) i anti-HER2 terapije na ćelijsku proliferaciju i apoptozu [25]. Komunikacija između HER2 i AR pokazana je na istoj ćelijskoj liniji, tipa MDA-MB-453, kada su Ni i autori ukazali da AR posreduje u ligan-zavisnoj aktivaciji Wnt i HER2 signalnog puta kroz direktnu transkripcionu indukciju WNT7B i β -catenina

dovodeći do AR/ β -catenin indukcije HER3[24]. Značaj HER3 u HER2+ karcinomu dojke je dobro poznat kroz njegovu ulogu dimerizacionog partnera, tj. njegovoj sposobnosti da formira heterodimere sa HER2, čime pojačava HER2 signale, doprinosi nepotpunoj inhibiciji HER2 signalnog puta kada na njega deluju inhibitori tirozin kinaze i na kraju modulira PI3K/AKT (eng. *phosphatidylinositol-3-kinase/AKT protein kinase B*) signalni put za koga se zna da značajno doprinosi rezistenciji HER2 pozitivnog karcinoma dojke[26]. I zaista, inhibitor tirozin kinaze lapatinib mogao je da značajno suprimira rast tumorskih ćelija jedino u ko-tretmanu sa dihidrotestosteronom, sugerišući da androgena stimulacija zaista može da poveća zavisnost i uticaj HER2/HER3 signala na rast ćelija kod ER negativnog AR pozitivnog karcinoma dojke [24].

1.5 Epidemiološki podaci

Epidemiološke studije su pokazale povezanost visokog nivoa serumskih androgena i rizika za razvoj karcinoma dojke[27]. Takođe, pokazano je da dodatak testosterona supstitucionoj hormoskoj terapiji kod postmenopauznih žena dovodi do značajnog poboljšanja seksualne funkcije, kvaliteta života i koštane gustine, ali i mogućeg povećanog rizika od karcinoma dojke[28, 29].

Kod postmenopauznih žena nekoliko studija je pokazalo povezanost rizika od ER pozitivnog karcinoma dojke i povišenog serumskog nivoa estrogena i testosterona[30][31].

Kod premenopauznih žena, broj studija, koje su ispitivale uticaj androgena na rizik za razvoj KD, je značajno manji. Mnoge od ovih studija su malog uzorka, retrospektivne prirode i bez podataka u kome delu menstrualnog ciklusa je vršeno merenje nivoa androgena. Suprotno starijim studijama, rezultati novijih kohortnih studija, ukazuju da je rizik od KD povišen kod povišenog nivoa cirkulišućeg testosterona[27, 32-34].

Bolje razumevanje dugotrajnog efekta egzogenog i endogenog androgena na rizik od razvoja karcinoma dojke je neophodno, a posebno važno stavljanje u kontekst u odnosu na menopauzni status i estrogensku sredinu, porodični rizik za KD i prisustvo

visoko penetrabilnih gena za razvoj KD poput BRCA (eng. **BR**east **CA**ncer susceptibility gene) 1/2 gena.

1.6 Klinički podaci

Iznenadujuće, AR je najzastupljeniji nuklearni hormon receptor u karcinomu dojke. U ograničenom broju studija poslednje dve decenije ekspresija AR je uočena u oko 70% slučajeva svih tipova karcinoma dojke, bez obzira na metod određivanja ekspresije AR, kao i nivo, odnosno prag pozitivnosti (eng. *cut-off*). Rezultati ovih studija pokazali su da ER pozitivni (ER+) karcinomi dojke u visokom procentu, do 80-95%, imaju istovremeno i koekspresiju AR dok je kod ER negativnih (ER-) tumora ekspresija AR viđena od 15-70%[35]. Istraživanje, koje je uključilo 2171 pacijentkinja sa karcinomom dojke, pokazalo je da je u luminal A tumoru zastupljenost AR u čak 91%, u luminal B 68%, u HER2-*like* podtipu oko 59%, dok je kod *basal-like* podtipa 32% tumora AR pozitivno[36]. Ekspresija AR je detektovana u oko 30% trostruko negativnog (TN) karcinoma dojke (engl. *triple negative*), tj. karcinoma dojke koji ne pokazuje ekspresiju ni ER, ni PR, niti HER2 (receptor za humani epidermalni faktor rasta 2) receptora i za čije lečenje danas ne postoji ciljana terapija[37]. Interesantno je da je ista studija pokazala da je ekspresija AR bila udružena sa tumorima manjih dimenzija (25% AR+ vs 16% AR- kod tumora dimenzije do 1cm), nižih gradusa (većina AR+ tumora je bila gradusa 1 ili 2, dok su AR- tumori bili gradusa 3), kao i sa negativnim statusom aksilarnih limfatika[36].

I druge retrospektivne kliničke studije su pokazale da AR ima ulogu dobrog prognostičkog faktora u karcinomu dojke[38]. Njegova uloga prognostičkog faktora za duže preživljavanje pokazana je i u ER pozitivnom karcinomu dojke i to nezavisno od sadašnjih dobro poznatih prognostičkih faktora. Studije su pokazale da ER+AR+ tumori dojke imaju tendenciju da budu manjih dimenzija, nižeg histološkog gradusa i niskog proliferativnog indeksa, sa manjom verovatnoćom zahvaćenosti limfnih čvorova i da su prevalentniji kod postmenopauznih žena. Sa druge strane, studije su pokazale da je, u okviru ER negativnog tumora dojke, ekspresija AR povezana sa značajno boljim preživljavanjem, tj. dužim intervalom do progresije bolesti, DFS (eng. *disease free*

survival)[37], kao i boljim ukupnim preživljavanjem, OS (eng. *overall survival*)[39] u poređenju sa ER-/AR- tumorima. Međutim, u drugim studijama nije dokazana povezanost preživljavanja pacijentkinja sa ER negativnim karcinomima dojke i AR ekspresije[40]. Značajno je da je kod pacijentkinja sa ER negativnim karcinomima dojke ekspresija AR bila u pozitivnoj korelaciji sa ekspresijom HER2[35].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je da se ispita prognostička vrednost ekspresije androgenog receptora (AR) kod pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke.

Prognostička vrednost ekspresije AR ispitaće se kroz meta-analizu publikovanih kliničkih studija u kojima je ispitivana prognostička uloga androgenog receptora u odnosu na ishod bolesti kod pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke, kao i kroz meta-analizu genske ekspresije androgenog receptora, odnosno ekspresije *iRNK AR* u dostupnim setovima ekspresije gena u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke i kliničkim podacima o ishodu bolesti.

1. Klinička meta-analiza ima za cilj da ispita prognostičku ulogu AR kod pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke u odnosu na ukupno preživljavanje pacijentkinja (OS-eng.*overall survival*) i preživljavanje bez bolesti (DFS – eng.*disease free survival*). Analiza će obuhvatiti:

1.1. Prognostičku ulogu AR kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno;

1.2. Prognostičku ulogu AR kod imunohistohemijski definisanih podgrupa karcinoma dojke, poput:

- estrogen receptor pozitivne podgrupe - ER+,
- estrogen receptor negativne podgrupe - ER-,
- humani epidermalni faktor 2 pozitivne, estrogen receptor negativne podgrupe - HER2+/ER- i
- trostruko negativne podgrupe, eng. *triplenegative* podgrupa – TN (ER-PR-HER2-).

2. Meta-analiza genske ekspresije ima za cilj da ispita prognostičku ulogu ekspresije informacione ribonukleinske kiseline, *iRNK AR* u odnosu na ukupno preživljavanje pacijentkinja (OS-eng.*overall survival*) i preživljavanje bez bolesti (DFS – eng.*disease free survival*). Analiza će obuhvatiti:

2.1.1 Prognostičku ulogu *iRNK AR* kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno;

2.1.2 Prognostičku ulogu *iRNK AR* kod molekularnih podtipova karcinoma dojke definisanih na osnovu ekspresije gena (tzv. genskih zapisa, eng. *gene-signatures*) kao: luminal A, luminal B, HER2-slični (eng. *HER2-like*) podtip i bazalnom epitelu sličan podtip (eng. *basal-like*) podtip karcinoma dojke;

2.2.1 Ispitaće se korelacija ekspresije *iRNK AR* sa poznatim kliničkim parametrima prognoze kod ranog karcinoma dojke: godine starosti pacijentkinja, veličina tumora, gradus tumora, ekspresija receptora za estrogen, ekspresija receptora za progesteron, kao i HER2 receptora kod svih pacijentkinja zajedno;

2.2.2. Ispitaće se korelacija ekspresije *iRNK AR* sa poznatim kliničkim parametrima prognoze kod ranog karcinoma dojke: godine starosti pacijentkinja, veličina tumora, gradus tumora, ekspresija ekspresija receptora za estrogena, ekspresija receptora za progesteron, kao i HER2 receptora kod molekularnih podtipova karcinoma dojke;

2.3.1. Ispitaće se korelacija *iRNK AR* sa drugim genskim zapisima (eng. *gene signatures*, GS), ili individualnim genima od kliničkog interesa, a koji su vezani za proliferaciju tumora, imuni odgovor, tumorsku stromu, kao važne signalne puteve u malignoj ćeliji (eng. *signaling pathways*) kod svih pacijentkinja zajedno;

2.3.2. Ispitaće se korelacija *iRNK AR* sa drugim genskim zapisima (eng. *gene signatures*, GS), ili individualnim genima od kliničkog interesa, a koji su vezani za proliferaciju tumora, imuni odgovor, tumorsku stromu, kao važne signalne puteve u malignoj ćeliji (engl. *signaling pathways*) kod kod molekularnih podtipova karcinoma dojke;

2.4.1. Ispitaće se korelacija *iRNK AR* sa patološkim kompletnim odgovorom (eng. *pathological complete response*, pCR), u setovima podataka kod pacijentkinja koje su lečene neoadjuvantnom terapijom, odnosno koje su dobijale hemioterapiju, i/ili hormonsku terapiju preoperativno, kod svih pacijentkinja zajedno.

2.4.2. Ispitaće se korelacija *iRNK* AR sa patološkim kompletnim odgovorom (*eng. pathological complete response – pCR*), u setovima podataka kod pacijentkinja koje su lečene neoadjuvantnom terapijom, odnosno koje su dobijale hemioterapiju, i/ili hormonsku terapiju preoperativno, u okviru definisanih molekularnih podgrupa karcinoma dojke.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Klinička meta-analiza

Ispitivanje smo sproveli kroz meta-analizu publikovanih kliničkih studija u kojima je ispitivana prognostička uloga AR u odnosu na klinički ishod bolesti ranog karcinoma dojke, tj. u odnosu na preživljavanje bez bolesti (DFS) i ukupno preživljavanje (OS) kod svih pacijentkinja zajedno, a potom, kada je to bilo moguće, u okviru različitih podtipova karcinoma dojke definisanih na osnovu imunohistohemijskih parametara (IHH) i to na sledeći način:

- estrogen receptor pozitivna podgrupa ER+;
- estrogen receptor negativna podgrupa ER-;
- humani epidermalni faktor rasta 2 pozitivna podgrupa, estrogen receptor negativna podgrupa HER2+/ER- i
- estrogen receptor negativna, progesteron receptor negativna, HER2 negativna podgrupa, ili trostruko negativna podgrupa, TN (ER-PR-HER2-).

Za meta analizu publikovanih kliničkih studija preduzeli smo pretragu sledećih naučnih baza podataka: eng. *PubMed-Medline*, eng. *Cochrane Review* kao i pretragu interneta/web-a poput <http://scholar.google.com>, koristeći *MeSH* (eng. *Medical subject Heading*) ključne reči pretrage "**androgeni receptor**" i "**karcinom dojke**". Pretraživanje baza podataka je urađeno nezavisno od strane dva istraživača, zaključno sa junom 2015.godine.

Primarni kriterijumi za uključivanje studija u meta-analizu su bili sledeći:

a) Studije sprovedene kod pacijentkinja sa ranim karcinomima dojke kod kojih je ekspresija AR merena u primarnom tumorskom tkivu.

b) Studije u kojima je ispitivan klinički ishod bolesti, tj. preživljavanje bez bolesti (DFS) i ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na status, tj. ekspresiju AR u primarnom tkivu dojke.

c) Studije koje imaju relevantne statističke podatke poput indeksa rizika (eng. *Hazard Ratios*-HR) univarijantne, i/ili multivarijantne analize, a radi izračunavanja združenog indeksa rizika i 95% intervala poverenja (eng. *Confidence Intervals*-CI).

d) Studije publikovane *in extenso* na srpskom i engleskom jeziku.

Studije, koje su ispunile primarne kriterijume, mogle su biti dalje analizirane pomoću sekundarnih kriterijuma.

Sekundarni kriterijumi za uključivanje studija u meta-analizu su bili sledeći:

- a) dostupni kvalitetni statistički podaci za obradu, odnosno da je indeks rizika, tj. HR prikazan u radu, ili da ga je moguće izračunati za jedan ili oba definisana parametra kliničkog ishoda bolesti, tj. ukupno preživljavanje – OS i preživljavanje bez bolesti – DFS.
- b) Broj događaja (eng. *number of events*) u studiji iznad > 15.

Studije nisu bile limitirane u odnosu na broj uključenih pacijentkinja, životno doba pacijentkinja, tip adjuvantnog lečenja, niti dužinu, odnosno medijanu praćenja. Ukoliko je neka studija objavljena više puta na istoj grupi pacijentkinja, samo poslednja verzija studije sa najrelevantnijim podacima i brojem događaja je uneta u analizu kako bi se izbeglo dupliranje podataka.

Sve studije koje su ispunile zadate kriterijume pregledane su nezavisno od strane dva istraživača koji su iz svake pojedinačne studije izdvojili sledeće podatke: ime autora, datum publikacije, broj uključenih pacijentkinja, broj pacijentkinja sa pozitivnm AR, sistemsku terapiju kojom su pacijentkinje lečene, vreme praćenja pacijentkinja (eng. *follow-up*), metodu procene ekspresije AR, antitela korišćena za analizu ekspresije AR receptora, nivo pozitivnosti AR (eng. *cut-off*), način na koji je definisan nivo pozitivnosti za AR (arbitrarno, literaturni podaci, srednja vrednost, ili drugo) kao i podatke u okviru IHH definisanih podgrupa karcinoma dojke, ukoliko su bili dostupni. U slučaju neslaganja istraživači su ponovo pregledali sporne publikacije radi postizanja konsenzusa. Podaci o preživljavanju, uključujući odnos rizika eng. *hazard ratio* HR i *p* vrednost, u odnosu na

sve pacijentkinje zajedno kao i odnosu na IHH definisane podgrupe karcinoma dojke, nezavisno su pregledani i izdvojeni od strane dva statističara među kojima je takođe postignut konsenzus o svim statističkim podacima.

Kvalitet svake selektovane, odnosno izdvojene studije, je nezavisno procenjen od strane tri istraživača (dva lekara i jednog statističara) koristeći REMARK[41] preporuke za publikovanje, objavljivanje i procenu kvaliteta kliničkih studija koje su ispitivale prognostičku ulogu bioloških markera (eng. *Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies*). REMARK[41] kriterijumi obuhvataju više segmenata kontrole kvaliteta studije koje se odnose na relevantnost naučnog pitanja, dizajn studije, metodologiju izrade istraživanja, način ispitivanja i određivanja biološkog markera, statističku obradu podataka, tumačenje rezultata i stavljanje dobijenih rezultata u kontekst dostupnih naučnih podataka, kao i njihova relevantnost za kliničku praksu i dalje istraživanje. Svaki od 20 REMARK kriterijuma je procenjen i dodeljena mu je ocena koristeći numeričke vrednosti 0, 1 ili 2. Ukoliko je kriterijum jasno definisan u studiji dodeljena je vrednost 2, ukoliko je kriterijum nepotpun ili nejasan, dodeljena je vrednost 1 i, ukoliko je kriterijum nedefinisan, neadekvatan ili neprimenjiv, dodeljena je vrednost 0. Krajnji skor REMARK kriterijuma za svaku studiju je upoređen i konsenzus za svaki pojedinačni kriterijum je postignut između tri istraživača (tabela 1).

Procena studija na osnovu REMARK kriterijuma je učinjena kao metoda procene kvaliteta studija uključenih u analizu i korišćena je u analizi senzitivnosti. Sve studije, koje su ispunile unapred definisane kriterijume za uključivanje u analizu (primarne i sekundarne) su uključene u meta-analizu bez obzira na REMARK skor, tj. nismo definisali minimalnu vrednost skora za studije koje bismo uključili u meta-analizu. REMARK analiza je sprovedena kako bismo ispratili i ispitali heterogenost kao i kvalitet ispitivanih, odnosno uključenih studija u meta-analizu.

Studije, koje su ispunile primarne kriterijume pretraživanja, nazvali smo selektovanim/evaluabilnim studijama, dok studije koje su ispunile i sekundarne kriterijume, odnosno imale adekvatne statističke podatke za obradu da budu uključene u meta-analizu, nazvali smo podobnim studijama. Samo studije, koje su ispunile i primarne i sekundarne kriterijume selekcije, uključene su u meta-analizu.

Podobne studije za meta-analizu morale su imati kvalitetne statističke podatke za obradu definisanih parametara kliničkog ishoda bolesti, tj. ukupno preživljavanje – OS i preživljavanje bez bolesti – DFS. Isključili smo studije sa nedovoljno pouzdanim, ili neadekvatnim podacima za procenu kliničkog ishoda (tabela 1).

Podobne studije su definisane krajnjim konsenzusom između tri istraživača (dva lekara i statističara).

Tabela 1: REMARK skor za studije koje su identifikovane na osnovu zadatih primarnih kriterijuma pretrage za kliničku meta-analizu

Autori	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Ukupan skor
1. Collet K.[42]	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	12
2. Agoff A.[37]	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	2	0	1	0	1	0	13
3. Rakha EA.[43]	1	1	0	0	1	1	1	2	0	1	1	0	1	0	1	2	1	0	1	1	16
4. Soiland H.[44]	1	2	2	1	1	1	2	2	0	1	2	1	2	0	2	2	1	0	1	1	25
5. Gonzales-Angulo AM.[45]	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	2	1	0	1	1	15
6. Peters A.[46]	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	0	6
7. Castellano I.[47]	1	1	1	1	2	1	1	2	0	1	1	2	2	2	2	2	2	0	1	1	26
8. Luo X.[48]	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	2	2	1	1	1	0	0	0	13
9. Micello D.[35]	1	2	0	1	1	1	0	2	0	1	1	0	2	2	1	0	0	0	1	0	16
10. Loibl S.[49]	1	2	2	1	1	2	1	2	0	0	1	1	2	2	1	2	2	0	1	1	25
11. Park S.[40]	1	2	1	1	1	2	2	1	0	1	1	1	2	2	1	2	2	0	2	1	26
12. Yu Q.[50]	1	1	1	1	1	1	0	2	0	1	0	1	2	2	1	1	0	0	1	1	18
13. Peters KM[51]	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	11
14. Hu R.[52]	1	2	1	1	1	2	2	2	0	1	1	1	2	1	1	2	1	0	1	1	24
15. He J.[53]	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	11
16. Honma N.[54]	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	13
17. Witzel I.[55]	1	1	2	2	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	2	0	18
18. Tokunaga E.[56]	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	9

19. Takeshita T.[57]	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	11
20. Thike AA.[58]	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	11
21. Tsang J.[59]	1	0	0	1	2	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	12
22. Pistelli M.[60]	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	18
*23.Boumeester K.[61]	1	1	0	1	1	1	0	2	0	1	1	0	2	1	1	2	2	0	1	1	19
*24. Bryan R.[38]	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5
*25.Langer M.[62]	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	9
*26. Gonzales L.[63]	1	2	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	15
*27. Agrawal A.[64]	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
*28. Narita D.[65]	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	10
*29. Pelekanou V.[66]	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	9
*30.Gasparini P.[67]	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	10
*31. Arslan C.[68]	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	2	2	1	0	0	0	1	0	13
*32.McGhan L.[69]	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	2	1	1	1	1	0	1	0	13
*33.Carreno G.[70]	1	2	2	1	2	1	2	2	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	21

*studije koje nisu uključene u meta-analizu s obzirom na to da nisu zadovoljile definisane sekundarne kriterijume selekcije.

3.2 Genska meta-analiza

Genska meta-analiza sprovedena je na dostupnim podacima genske ekspresije, odnosno mikroarej analize (*eng. microarray*) koji sadrže podatke o ekspresiji informacione *iRNK AR*, kao i podatke o kliničkom ishodu bolesti kod pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke.

Za meta-analizu genomskih podataka sproveli smo pretraživanje sledećih baza podataka: PubMed i GEO (*eng. Gene Expression Omnibus*) koristeći ključne reči **“karcinom dojke”** i **“genska ekspresija androgenog receptora”**, kako bismo identifikovali studije koje su analizirale profil genske ekspresije *iRNK AR* kod pacijentkinja sa ranim karcinomima dojke i dostupnim informacijama o kliničkom ishodu, ukupnom preživljavanju (OS) i preživljavanju bez bolesti (DFS).

Nivo ekspresije *iRNK AR* izračunali smo kao kontinuiranu i kao ketegorijsku varijablu u okviru koje smo definisali nizak nivo ekspresije *iRNK AR* (korespondira sa vrednostima ekspresije u donjoj trećini svih dostupnih ekspresija, nivo 1), srednji nivo (intermedijarna trećina, nivo 2) i visoki nivo ekspresije (gornja trećina, nivo 3).

Molekularne podtipove karcinoma dojke definisali smo pomoću PAM50 molekularnog klasifikatora (*engl. PAM50 gene classifier*)[71] kao luminal A, luminal B, HER2-slični (*engl. HER2-like*) i bazalnom epitelu slični (*engl. basal-like*) tumori.

Ispitali smo prognostičku ulogu *iRNK AR*, kao kontinuirane, i/ili kategorijske varijable, u ranom karcinomu dojke kod svih pacijentkinja zajedno i u okviru molekularnih podtipova definisanih pomoću PAM50 molekularnog klasifikatora.

Ispitali smo korelaciju između *iRNK AR* i poznatih prognostičkih kliničko-patoloških karakteristika pacijentkinja i tumora dojke. Koristili smo sledeće kliničke varijable: godine pacijentkinja (dvojno, kao kontinuirana i kao kategorijska varijabla \leq i $>$ 50 godina), veličinu tumora (dvojno, kao kontinuirana i kao kategorijska varijabla shodno UICC TNM klasifikaciji), gradus tumora (gradus 1, 2 i 3), status aksilarnih limfnih žlezda, tzv. nodalni status (nodus pozitivne *versus* nodus negativne), ekspresiju estrogenog receptora ER (ER pozitivni vs ER negativni), ekspresiju progesteronskog

receptora (PR pozitivni vs PR negativni), ekspresiju ERBB2 gena (ERBB2 pozitivni vs ERBB2 negativni).

Ispitali smo korelaciju *iRNK AR* sa drugim genskim zapisima (eng. *gene-signature, GS*) i individualnim genima od kliničkog interesa. Potencijalna udruženost između ekspresije *iRNK AR* i individualnih gena, kao i genskih zapisa od interesa je sprovedena kroz analizu vezanu za: estrogenski signal (eng. *ESR1* gene), GS koji se zasnivaju na proliferaciji (AURKA[72], CIN70[73], GENE70[74], GGI[75]), individualne gene, ili GS povezane sa imunim odgovorom (engl. *immune-related*) (*CTLA4* gene, *IDO1* gene, *IFNG* gene, *IGKC* gene, Immune1 GS[76], Immune2 GS[77], *PD1* gene, *PDL1* gene, STAT1 GS), gene i GS povezane sa tumorskom stromom (engl. *stroma-related*) (*CXCL13* gene, *CXCL9* gene, *RANKL* gene, Stroma1 GS[78], Stroma2 GS[77]), kao i individualne gene i genske zapise povezane sa važnim signalnim trasama (eng. *signaling pathways*) za tumorski rast i rezistenciju (RAS GS[79], SRC GS[79], MYC GS[79], *E2F3* GS[79], BetaCatenin GS[79], *BRCA1* i *BRCA2* genes, AKT/mTOR GS[80], *HER3* gene, IGF1 GS[81], MAPK GS[82], PIK3CA GS[83], PTEN GS[84], *VEGFA* gene, *WNT7B* gene).

Analizirali smo neoadjuvantne (preoperativne) kohorte pacijentkinja kod kojih je analiza genske ekspresije učinjena na dostupnim tumorskim tkivima od biopsije, a pre započinjanja specifičnog onkološkog lečenja (hemioterapije i/ili hormonoterapije). Ispitali smo korelaciju *iRNK AR* sa procentom patološkog kompletnog odgovora (pCR) kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke lečenih sistemskom neoadjuvantnom terapijom, kao i u okviru definisanih molekularnih podtipova karcinoma dojke.

Patološki kompletni odgovor, pCR, definisan je kao gubitak invazivne komponente primarnog tumora u jednoj studiji [85] i kao potpuni izostanak rezidualne bolesti u dojci i limfnim nodusima istostrane aksile u ostalih 7 studija [86-90].

3.3 Statistička analiza

3.3.1 Klinička meta-analiza

Za meta-analizu publikovanih kliničkih studija, kao meru prognostičkog efekta AR proteinske ekspresije, koristili smo Indeks rizika (eng. *hazard ratio*, HR) svake pojedinačne studije kako bismo komparirali preživljavanja bez bolesti (eng. *disease free survival*, DFS) i ukupno preživljavanje (*overall survival*, OS) koristeći pacijentkinje sa AR negativnim karcinomima dojke kao referentnu vrednost. Preživljavanja bez bolesti, DFS i ukupno preživljavanje, OS je definisano odnosno preuzeto izvorno, iz svake studije ponaosob, onako kako su definisali sami autori. Za svaku studiju i svaki IHH podtip karcinoma dojke, onda kada je moguće, ekstrahovali smo individualnu vrednost HR i varijansu, ukoliko je saopštena. Varijansa je ekstrapolirana iz 95% intervala poverenja (95%CI - eng. *confidence interval*) iz dostupnih *p*-vrednosti log-rank testa, ili broja događaja (eng. *number of events*). Ukoliko ni jedna od navedenih metoda nije bila primenjiva, preračunali smo retrogradno HR i varijansu na osnovu očitavanja kriva preživljavanja, odnosno Kaplan Majerovih kriva (eng. *Kaplan-Meier*).

Ukoliko su oba indeksa rizika, tj. HR dostupna, koristili smo individualne indekse rizika iz univarijantne i multivarijantne analize. Izračunali smo kombinovani indeks rizika sa 95% intervalom poverenja smatrajući AR negativne pacijentkinje kao referentnu vrednost, koristeći fiksni (engl. *fixed-effect model*), ili slučajni (engl. *random-effects model*) model u zavisnosti od heterogenosti između individualnih indeksa rizika. U slučaju da je značajna heterogenost prisutna ($p < 0.10$), koristili smo slučajni ili eng. *random* model i obrnuto. Heterogenost podataka, tj. heterogenost između indeksa rizika HRs različitih studija, procenili smo pomoću hi-kvadrat (χ^2) testa za heterogenost.

Meta analiza kliničkih studija je učinjena u okviru softver (engl. *software*) programa Microsoft Office Excel 2010.

3.3.2 Genska meta-analiza

Za analizu preživljavanja ispitivali smo: a) preživljavanje bez bolesti (DFS) definisano kao vreme od postavljanja dijagnoze tumora dojke do prvog relapsa bolesti bilo u vidu lokoregionalnog relapsa, udaljenog relapsa, drugog primarnog tumora i/ili smrti bez poznatog uzroka i b) ukupno preživljavanje (OS) definisano kao vreme od dijagnoze tumora dojke do smrti pacijentkinje, bez obzira na njen uzrok.

Krive preživljavanja shodno oformljenim grupama su kreirane Kaplan-Majerovom (eng *Kaplan–Meier*) metodom i razlika je evaluirana log-rank testom. Medijana praćenja je preračunata reverznom Kaplan-Majerovom (eng *Kaplan–Meier*) metodom, a podaci su cenzurisani nakon 10 godina praćenja.

Za analizu preživljavanja (izračunali smo HR i 95% CI) u univarijantnoj analizi koristili smo Cox linearni regresioni model; multivarijantna analiza je preračunata koristeći linearni Cox regresioni model, stratifikovan prema grupama podataka poput, godine pacijentkinja, tumorski gradus, veličina tumora, zahvaćenost limfnih nodusa kao i *ESR1* i *ERBB2* genska ekspresija.

Za testiranje potencijalne povezanosti između *AR* informacione RNA, *iRNK* (eng. *messenger RNA*) i kliničko-patoloških karakteristika, kako kod svih pacijenata sa karcinomom dojke zajedno, tako i među molekularnim podtipovima karcinoma dojke koristili smo T-test. Za testiranje potencijalne povezanosti *AR iRNA* ekspresije i prethodno pomenutih gena od značaja i genskih zapisa (eng. *gene signatures*) koristili smo Wilcoxon test.

U neoadjuvantnim setovima podataka ispitivali smo povezanost nivoa *AR iRNA* i procenta postignutog kompletnog patološkog odgovora, pCR, koristeći logistički regresioni model, univarijantni i multivarijantni, korigovan za setove podataka, tj. data-setove, tumorski gradus, i sistemsku terapiju. Testiranje je izvršeno kod svih pacijentkinja zajedno i u okviru molekularnih podtipova karcinoma dojke.

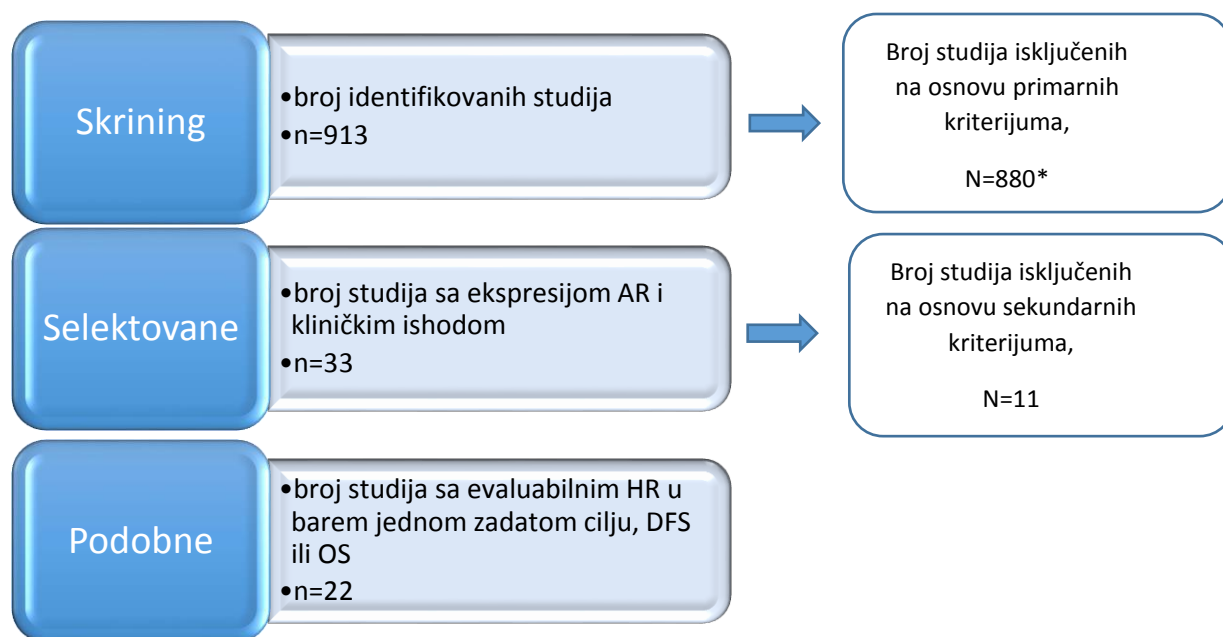
4. REZULTATI

4.1 Klinička meta-analiza

4.1.1 PRIZMA algoritam i selekcija studija za kliničku meta-analizu

Koristeći prethodno definisane ključne reči za pretragu, androgeni receptor i karcinom dojke, selektovali smo ukupno 913 referenci. Primenom primarnih kriterijuma za uključanje u kliničku meta-analizu, isključili smo revijalne radove; eksperimentalne radove na kulturama tumorskih ćelija i ksenograftskim modelima; radove sa ekspresijom AR u metastatskom karcinomu dojke; radove kod muškaraca sa karcinomom dojke; ponovne publikacije na istoj kohorti pacijentkinja (uključili smo samo poslednje publikacije sa najnovijim podacima); publikacije koje nisu na srpskom ili engleskom jeziku. Konačno selektovali smo 33 studije za analizu (grafik 1). Sve selektovane studije su ocenjene na osnovu REMARK kriterijuma[41] (tabela 1). Od selektovanih studija, primenom sekundarnih kriterijuma, isključili smo one studije u kojima HR od interesa nije bio dostupan, ili koji nije mogao biti preračunat na osnovu varijanse i dostupnih podataka, tj. kod kojih, na osnovu publikovanih rezultata, nije bilo moguće preračunati preživljavanje, ili u kojima je broj događaja (eng. *number of events*) bio mali < 15 (grafik 1 i tabela 2).

Grafik 1: PRIZMA algoritam kliničke meta-analize i proces selekcije studija



*isključene studije: revijalni radovi: 123, kliničke studije bez podataka o preživljavanju u odnosu na ekspresiju AR:83; karcinom dojke kod muškaraca:13, ekspresija AR kod metastatskog karcinoma dojke: 67; predkliničke studije sa ekspresijom AR na ćelijskim linijama, ksenograftskim modelima i životinjama: 156; duple publikacije: 2; publikacije na drugim jezicima: 5; ekspresija AR kod drugih tumora, najpre kod karcinoma prostate: 431.

Konačno od 33 studije koje su selektovane za analizu, 22 su se pokazale kao podobne za meta-analizu. Ove studije, publikovane između 1996. i 2014.godine, uključile su 10.004 pacijentkinja sa ranim karcinom dojke od kojih je 5.860 pacijentkinja imalo AR pozitivne tumore (tabela 2). Dvadeset studija [35, 37, 40, 42, 45-50, 53-56, 58-60, 91, 92] je bilo podobno za meta-analizu preživljavanja bez bolesti, DFS i šesnaest [35, 40, 42, 45-49, 51-54, 58, 60, 91, 92] za meta-analizu ukupnog preživljavanja, OS. Detaljne karakteristike studija koje su uključene u meta-analizu preživljavanja bez bolesti (DFS), odnosno meta-analizu ukupnog preživljavanja (OS) su prikazane u tabelama 3 i 4.

U podobnim studijama, koje su uključene u kliničku meta-analizu, androgen receptor je evaluiran imunohistohemijski (IHC) na tumorskim pločicama (eng. *Formaldehyde Fixed Paraffin Embedded tissue blocks* -FFPE), IHC na tkivnom mikroareju (eng. *tissue microarray*-TMA), kao i pomoću mikroareja proteinskog lizata (eng. *Reverse-Phase Protein Lysate*-RPPL). Korišćena su različita antitela: AR441, F39.4, Zymed PV6000, AR27 kao i primarna antitela na AR (Epitomics). Prag za procenu pozitivnosti AR se značajno razlikovao u studijama i kretao u rasponu od 1–15% (intenzitet i procenat ćelija koje su pozitivne na AR) za IHC, odnosno za mikroarej proteinski lizat pozitivnost je bila definisana ≥ 0.0852 . Prag za pozitivnost AR u studijama bio je zasnovan na arbitrarnim vrednostima, medijani dobijenih vrednosti i najboljem cut-off-u, kao i literaturnim podacima (tabela 2). Među podobnim studijama samo 2 studije su bile prospektivne[49, 52] dok je ostatak studija po dizajnu istraživanja bio retrospektivan.

Podobne studije su pokazale značajnu heterogenost koja se odnosila na metodologiju istraživanja (prospektivne vs retrospektivne); ispitivanu populaciju (godine pacijentkinja; klinički stadijum bolesti; veličinu tumora i nodalni status; hormon receptor status; HER2 status; način adjuvantnog lečenja (hemioterapija vs hormonoterapija vs zračna terapija); IHH definisanje podgrupa karcinoma dojke (nivo pozitivnosti za ER i PR, definisanje HER2 pozitivne podgrupe uzimajući u obzir ili ne hormon-receptor status tumora); metodu određivanje AR pozitivnosti uzevši u obzir antitela i nivo pozitivnosti za AR (eng. *cut-off values*), kao i na vreme praćenja pacijentkinja (eng. *follow-up time*).

Tabela 2: Kliničke studije uključene u kliničku meta-analizu i njihove karakteristike

Autor	Broj pacijentkinja AR+/ ukupan broj	Metod procene AR	Antitela	Prag pozitivnosti za AR
Collett K.[42] 1996	137/269	Dextran-coated charcoal tehnika	10nM3 H-labelled methyltrienolone R-1881	43 fmol/mg Srednja vrednost
Agoff A. [37], 2003	51/88	IHC	F39.4.1	>5% arbitrarno
Rakha EA.[43], 2006	36/282	IHC on TMA	F39.4.1.	≥1% literaturni podaci
Soiland H.[44], 2008	WS-IHC-ARn: 103 TMA-IHC-ARn: 94 IHC-Arc: 58 charc-AR: 91	IHC-Arc, AR nonWS charc-AR	AR441; R1881	charcAR≥30 pmol/g; IHC-ARn≥15%; IHC-ARC>0
Gonzalez-Angulo AM.[45], 2009	174/347	RPPL Microarray	Primary AR antibody - Epitomics	> -0.0852 Dihotomisan o srednjom vrednošću
Peters A.[46], 2009	116/215	IHC on TMA	AR –U407 antiserum	75%, medijana (opseg 0 – 96%)
Castellano I.[47], 2010	609/859	IHC on TMA	AR441	≥ 1% literaturni podaci
Luo X.[48], 2010	148/269	IHC	ZYMED PV-6000-G Kit AR antibody not specified	≥ 2 (intenzitet %) arbitrarno
Micello D [35], 2010	128/226	IHC	AR27	>10% literaturni podaci
Loibl S.[49], 2010	358/673	IHC on TMA	F39.4.1	>3 (% x intenzitet) Remmele score
Park S.[40], 2011	541/931	IHC on TMA	AR 441	≥ 10% arbitrarno
Yu Q.[50], 2011	237/327	IHC	AR441	>1, Allred score (% x intenzitet)

Peters KM.[51], 2012	41/73	IHC on TMA	antiAR (Biocare Medical)	≥1% nije navedeno
Hu R.[52], 2012	1154/1467	IHC on TMA	AR441	> 1% (1-10%+>10%) arbitrarno
He J.[53], 2012	73/287	IHC on TMA	AR 441 Dako	≥5% nuklearno bojenje arbitrarno
Honma N.[54], 2013	212/403	IHC on FFPE	AntiAR Ab clone AR27; Novocastra Laboratories	≥10% nuklearno bojenje literaturni podaci
Witzel I.[55], 2013	Cohort 1 126/165 Cohort 2 133/200 Cohort 3 167/223	AR mRNA	Affymetrix HG-U 133A GeneChip System	vrednost ekspresije AR mRNA >75%
Tokunaga E.[56], 2013	155/250	IHC	AR441; Dako	75% nuklearno bojenje literaturni podaci
Takeshita T.[57], 2013	295/379	IHC	AR318 Leica Biosystems Newcastle UK	Histoscore>10 literaturni podaci
Thike AA.[58], 2013	267/699	IHC on TMA	AR 27 NCL-AR-318	≥1% nuklearno bojenje literaturni podaci
Tsang J.[59], 2014	549/1144	IHC on TMA	AR 441 Dako	≥1% nuklearno bojenje literaturni podaci
Pistelli M.[60], 2014	15/81	IHC	F39.4.1 Biogenex San Ramon, CA, USA	≥10% nuklearno bojenje arbitrarno

AR-androgen receptor; IHC-imunohistohemija; Arc-citoplazmatski androgen receptor; ARn – nuklearni androgen receptor; charc-AR – harkoalni androgen receptor; RPPL – eng. *Reverse Phase Protein Lysate microarray*; ¥Kohorta A – lečene pacijentkinje, Kohorta B – nelečene pacijentkinje, Kohorta C- ER+ pacijentkinje.

Tabela 3: Kliničke studije uključene u prognostičku analizu AR u preživljavanja bez bolesti (eng. *disease free survival_DFS*) kod pacijentkinja sa ranim KD

Autori	Sistemska terapija*	Medijana praćenja u mesecima (opseg)	HR (95% CI) Univarijantna analiza <u>Broj pacijentkinja</u>	HR (95% CI) Multivarijantna analiza <u>Broj pacijentkinja</u>	Analiza podgrupa
Collett K.[42]	CT +/- HT	>60	0.51 (0.36-0.72) 269	/	NN
Agoff A.[37]	CT or HT +/- RT	25 (4-120)	0.33 (0.10-1.09) 57	/	ER+
Rahka EA.[91]	CT for TN/+RT	56	/	0.50 (0.19-1.30) 1726	NN
Soiland H.[92]	preOP+postOP CT +/- HT°	130	0.67 (0.42-1.05) 138	0.36 (0.22-0.59) 138	NN
Gonzalez-Angulo AM.[45]	CT or HT (tam)	50.4 (9.6-110.4)	0.40 (0.20-0.80) 347	/	ER+ TN
Peters AA.[46] Only ER+	NN	NN	0.42(0.21-0.84) 157	0.33 (0.20-0.54) 157	ER+
Castellano I.[47]	HT or CT	81.6	0.51 (0.34-0.76) 859	0.46 (0.29-0.71) 859	ER+
Luo X.[48] TN nonTN	NN	NN	0.46 (0.23-0.90) 137 1.55 (0.63-3.78) 132	/	TN nonTN
Micello D.[35]	NN	116.4 (2-173)	1.18 (0.78-1.77) 221	/	ER-HER2+
Loibl S.[49]	neoadj. TAC or HT +/-RT	60.5 (1.5-96.7)	0.71 (0.51-0.97) 626	/	ER-HER2+ TN
Park S.[40]	CT or HT+/- RT	72.7	0.67 (0.48-0.94) 931	/	ER+ ER-

					ER-HER2+ TN
Yu Q.[50]	CT or HT +/- RT	66	0.42 (0.25-0.70) 327	0.31 (0.19-0.49) 327	TN
He J.[53]	CT	72 (8-182)	0.40 (0.20-0.79) 287	0.47 (0.23-0.94) 287	TN
Honma N.[54] ER+ ER-	HT/TAM	132 (6-229)	ER+ 0.71 (0.44-1.15) 336 ER- 0.22 (0.022-1.72) 67	0.72 (0.46-1.14) 403	ER + ER-
Tokunaga E.[56]	CT+/-HT	78	0.41 (0.25-0.68) 250	0.46 (0.26-0.79) 250	ER+/ER-
Takeshita T.[57]	CT+/-HT	66.1 (0.23-145.1)	0.24 (0.13-0.43) 379	0.24 (0.12-0.50) 379	ER+/HER2- HER2+ TN
Thike AA.[58]	NN	90 (1-213)	0.76 (0.55-1.05) 699	0.73 (0.53-1.00) 699	TN
Tsang J.[59]	NN	62.8 (1-210)	0.51 (0.34-0.76) ?	/	ER+
Pistelli M.[60]	CT	52.4 (2.5-95)	0.80 (0.23-2.77) 81	/	NN
Witzel I.[55]	CT+/-HT vs nista	80 92	/	¥A 0.42 (0.18-0.99) 168 B 0.96 (0.50-1.82) 200 C 0.34 (0.15-0.77) 223	NN

NN – nije navedeno; TAM-tamoxifen; *sve pacijentkinje su imale hiruršku intervenciju – radikalnu mastektomiju ili parcijalnu resekciju; ° CT – hemioterapija, data je na dan operacije i 7 dana nakon operacije; za HR – hormon receptor pozitivne tumore, tamoxifen je dat tokom 2 godine na osnovu tadašnjih preporuka.

Tabela 4: Kliničke studije uključene u prognostičku analizu AR kod ukupnog preživljavanja (eng. *overall survival_OS*) kod pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke

Autori	Sistemska terapija*	Medijana praćenja u mesecima (opseg)	HR (95% CI) Univarijantna analiza <u>Broj pacijentkinja</u>	HR (95% CI) Multivarijantna analiza <u>Broj pacijentkinja</u>	Analiza podgrupa
Collett K.[42]	CT +/- HT	>60	0.58 (0.30-1.14) 269	/	/
Rahka EA.[91]	CT for TN+/- RT	56	/	0.36 (0.08-1.59) 1726	NN
Soiland H.[92]	preOP+postOP CT +/- HT°	130	0.75 (0.54-1.04) 138	0.40 (0.22-0.72) 138	NN
Gonzalez-Angulo AM.[45]	CT or HT (tam)	50.4 (9.6-110.4)	/	0.54 (0.36-0.82) 324	ER+ TN
Peters AA.[46] ER+ ER-	NN	NN	0.24 (0.09-0.64) 157 0.62 (0.24-1.59) 58	0.22 (0.08-0.60) <i>Only for ER+</i> 157	ER+ ER-
Castellano I.[47]	HT or CT	81.6	0,40 (0.23-0.69) 859	0,26 (0.14-0.48) 859	ER+
Luo X.[48] TN nonTN	NN	NN	0.37 (0.17-0.85) 137 0.43 (0.14-1.32) 132	/	TN Ne-TN
Micello D.[35]	NN	116.4 (2-173)	1.36 (0.88-2.09) 221	/	ER-HER2+
Loibl S.[49]	neoadj TAC ili HT +/- RT	60.5 (1.5-96.7)	0.62 (0.41-0.94) 626	/	TN
Park S.[40]	CT/HT +/- RT	72.7	0.74 (0.50-1.09)	/	ER+

			931		ER- ER-HER2+ TN
Peters KM.[51]	NN	NN	0.42 (0.23-0.76) 73		NN
Hu R.[52]	CT/HT	168	0.90 (0.74-1.09) 1467	0.89 (0.71-1.11) 1467	ER+ ER-
He J.[53]	CT	72 (8-182)	0.40 (0.19-0.81) 287	/	TN
Honma N.[54] ER+ ER-	HT/TAM	132 (6-229)	0.22 (0.02-1.79) 336 0.69 (0.40-1.18) 67	0.70 (0.42-1.16) 403	ER+ ER-
Thike AA.[58]	NN	90 (1-213)	0.53 (0.14-1.96) 699	0.71 (0.50-1.02) 699	TN
Pistelli M.[60]	CT	52.4 (2.5-95)	0.93 (0.19-4.56) 81	/	/

NN-nije navedeno; CT-hemioterapija, HT- hormonoterapija, RT-radioterapija, TAM-tamoxifen.

4.1.2 Meta-analiza prognostičkog značaja ekspresije AR u celokupnoj populaciji pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke, u podobnim kliničkim studijama

Prognostički značaj ekspresije AR kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke, ispitivali smo kroz univarijantnu analizu i kad je bilo moguće, odnosno dostupno, u podobnim studijama, kroz multivarijantnu analizu preživljavanja. Univarijantna analiza prognostičke uloge AR u ranom karcinomu dojke, u celokupnoj populaciji, je pokazala da pacijentkinje čiji su tumori AR pozitivni imaju duže preživljavanje bez bolesti [DFS HR = 0.61; 95% CI 0.52-0.72; $p < 0.001$], kao i duže ukupno preživljavanje [OS HR 0.62; 95% CI 0.51-0.75; $p < 0.001$] u odnosu na pacijentkinje čiji su tumori AR negativni (Tabela 5, Grafik 2A). Multivarijantna analiza, takođe je potvrdila da ekspresija AR u primarnom tumoru dojke predviđa bolje preživljavanje bez bolesti (DFS HR 0.46; 95% CI 0.37-0.58; $p < 0.001$), kao i bolje ukupno preživljavanje (OS HR 0.53; 95% CI 0.38-0.73; $p < 0.001$) u odnosu na pacijentkinje čiji su tumori AR negativni (tabela 5, grafik 2B).

Tabela 5: Univarijantna i multivarijantna analiza preživljavanja bez bolesti, DFS i ukupnog preživljavanja, OS kod pacijentkinja sa AR pozitivnim vs AR negativim ranim KD

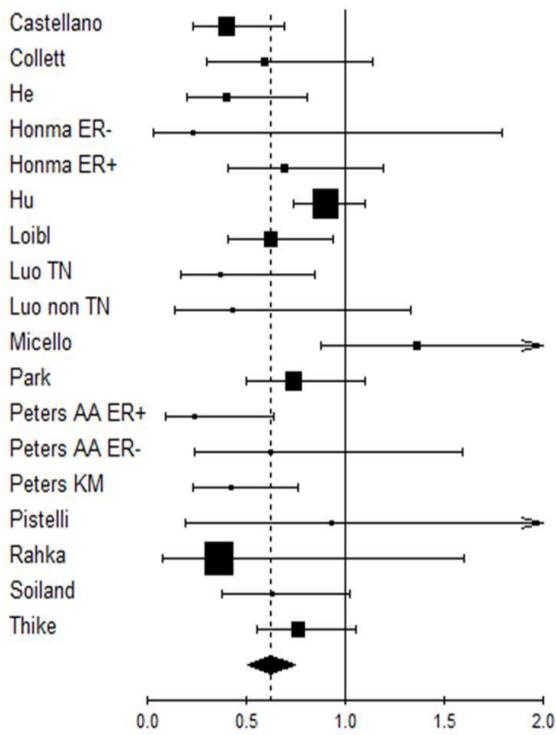
UNIVARIJANTNA analiza	HR	95% CI	P vrednost
DFS (20 studija, N=8036) Nasumični efekat <i>eng.random effects</i> Heterogenost $p=0.01$	0.61	0.52-0.72	p<0.001
OS (16 studija, N=8301) Nasumični efekat <i>eng.random effects</i> Heterogenost $p=0.005$	0.62	0.51-0.75	
MULTIVARIJANTNA analiza			
DFS (13 studija, N=5648) Nasumični efekat <i>eng.random effects</i> Heterogenost $p=0.01$	0.46	0.37-0.58	p<0.001
OS (8 studija, N=5773) Nasumični efekat <i>eng.random effect</i> Heterogenost $p<0.001$	0.53	0.38-0.73	

DFS: preživljavanje bez bolesti (eng. *disease free survival*) OS: ukupno preživljavanje (eng. *overall survival*)

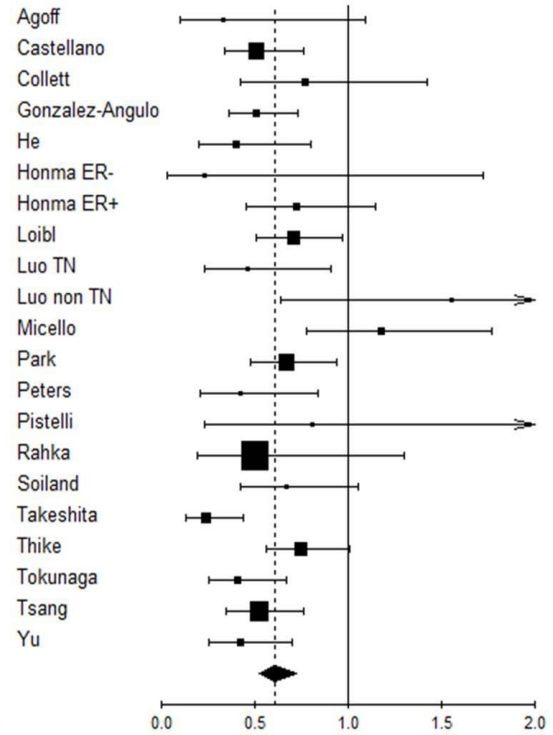
Grafik 2A/B: Forest plot za preživljanje bez bolesti, DFS, i ukupno preživljanje, OS, kod podobnih studija za kliničku meta-analizu: pacientkinje sa ranim KD i AR+ vs AR-tumorima

A) Preživljanje bez bolesti, DFS

B) Ukupno preživljanje, OS



bolje AR+ / bolje AR-



bolje AR+ / bolje AR-

4.1.3 Meta-analiza prognostičkog značaja ekspresije AR u IHH definisanim podgrupama pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke, iz podobnih kliničkih studija

Prognostička analiza ekspresije AR učinjena je za sledeće, unapred definisane IHH podgrupe, kod ranog karcinoma dojke: estrogen receptor pozitivna (ER+); estrogen receptor negativna (ER-); humani epidermalni faktor rasta 2 pozitivna, estrogen receptor negativna (HER2+ER-) i trostruko negativna, odnosno estrogen, progesteron, humani epidermalni faktor rasta 2 negativna (TN) podgrupa (tabela 6).

U podgrupi pacijentkinja sa ER pozitivnim (ER+) ranim karcinomom dojke univarijantna analiza preživljavanja u odnosu na ekspresiju AR je pokazala da je AR pozitivni, estrogen receptor pozitivni, AR+ER+, rani KD povezan sa značajno boljim preživljavanjem, tj. preživljavanjem bez bolesti, DFS (DFS HR 0.53; 95%CI 0.44-0.63, $p < 0.001$), kao i ukupnim preživljavanjem, OS (OS HR = 0.59; 95%CI 0.49-0.72, $p < 0.001$) u odnosu na AR negativne, estrogen receptor pozitivne, AR-ER+ pacijentkinje sa ranim KD. Multivarijantna analiza sprovedena u istoj podgrupi, ER+ rani KD, potvrdila je bolje preživljavanje pacijentkinja sa AR+ER+ ranim KD u odnosu na AR-ER+ KD (DFS HR 0.40; 95%CI 0.31-0.52, $p < 0.001$ i OS HR = 0.37; 95%CI 0.16-0.85, $p = 0.02$) (tabela 6).

U podgrupi pacijentkinja sa ER negativnim (ER-) ranim karcinomom dojke nismo našli značajnu udruženost između AR pozitivnosti i preživljavanja bez bolesti, DFS kao i ukupnog preživljavanja, OS; pacijentkinje sa AR+ER- ranim KD nisu se značajno razlikovali u odnosu na AR-ER- u odnosu na DFS (DFS HR 0.33 95%CI 0.04-2.44, $p = 0.28$) niti u odnosu na OS (OS HR 1.32 95%CI 0.98-1.80, $p = 0.08$) u univarijantnoj analizi (tabela 6).

U podgrupi pacijentkinja sa humanim epidermalnim faktorom rasta 2 pozitivnim i estrogen receptor negativim (HER2+ER-) ranim karcinomom dojke AR pozitivnost nije bila značajno udružena sa preživljavanjem bez bolesti (DFS HR 1.20 95%CI 0.86-1.69, $p = 0.28$). Sa druge strane ukupno preživljavanje, OS, bilo je lošije kod AR pozitivnih pacijentkinja, odnosno HER2+ER-AR+ su imale lošije ukupno preživljavanje u odnosu na pacijentkinje čiji su tumori bili HER2+ER-AR- (OS HR 1.50 95%CI 1.01-2.22 $p = 0.04$) u univarijantnoj analizi (tabela 6).

U podgrupi pacijentkinja sa trostruko negativnim, odnosno estrogen, progesteron i HER2 negativnim (ER-PR-HER2-) ranim karcinomom dojke AR pozitivnost je bila povezana sa značajno boljim preživljavanjem bez bolesti, kao i ukupnim preživljavanjem; pacijentkinje sa ER-PR-HER2-AR+ ranim KD imale su značajno bolje preživljavanje bez bolesti, DFS (DFS HR 0.64 95%CI 0.51-0.81, $p < 0.001$) i ukupno preživljavanje, OS (OS HR 0.64 95%CI 0.49-0.88, $p < 0.001$), u odnosu na pacijentkinje čiji su tumori bili ER-PR-HER2-AR-, ali samo u univarijantnoj analizi (tabela 6).

Multivarijantna analiza u podgrupi pacijentkinja sa ER-, HER2+/ER- i triple negativnim, TN (ER-/PR-/HER2-) karcinomom dojke nije bilo moguće izračunati zbog nedostupnih podataka.

Tabela 6: Univarijantna analiza prognostične vloge AR u ranom karcinomu dojke kod definisanih podgrupa; multivarijantna analiza prognostične vloge AR u u podgrupi ER+ ranog karcinoma dojke

UNIVARIJANTNA analiza	HR 95% CI	p	MULTIVARIJANTNA analiza	HR 95% CI	p vrednost
ER+			ER+		
DFS (9 st., N=2843) <i>fiksni efekat</i> <i>*p=0.53</i>	0.53 0.44-0.63	p<0.001	DFS (5 st., N=1571) <i>fiksni efekat</i> <i>*p=0.65</i>	0.40 0.31-0.52	p<0.001
OS (6 st., N=3383) <i>fiksni efekat</i> <i>*p=0.26</i>	0.59 0.49-0.72	p<0.001	OS (3 st., N=2180) <i>nasumični efekat</i> <i>*p=0.003</i>	0.37 0.16-0.85	p=0.02
ER-					
DFS (3 st., N=383) <i>nasumični efekat</i> <i>*p=0.05</i>	0.33 0.04-2.44	p=0.28			
OS (4 st., N=687) <i>fiksni efekat</i> <i>*p=0.11</i>	1.32 0.98-1.80	p=0.08			
HER2+/ER-					
DFS (4 st., N=410) <i>fiksni efekat</i> <i>*p=0.99</i>	1.20 0.86-1.69	p=0.28			
OS (3 st., N=358) <i>fiksni efekat</i> <i>*p=0.50</i>	1.50 1.01-2.22	p=0.04			
TN					
DFS (9 st., N=1373) <i>fiksni efekat</i> <i>*p=0.16</i>	0.64 0.51-0.81	p<0.001			
OS (5 st., N=1285) <i>fiksni efekat</i> <i>*p=0.07</i>	0.64 0.49-0.88	p<0.001			

ER+: estrogen receptor pozitivna podgrupa karcinoma dojke; ER-: estrogen receptor negativna podgrupa KD; HER2+ER-: humani epidermalni faktor rasta pozitivna, estrogen receptor negativna podgrupa KD; TN: trostruko negativni karcinom dojke; st.: studije; DFS: preživljavanje bez bolesti (eng. *disease free survival*); OS: ukupno preživljavanje, (eng. *overall survival*).

*p – p vrednost za heterogenost među grupama

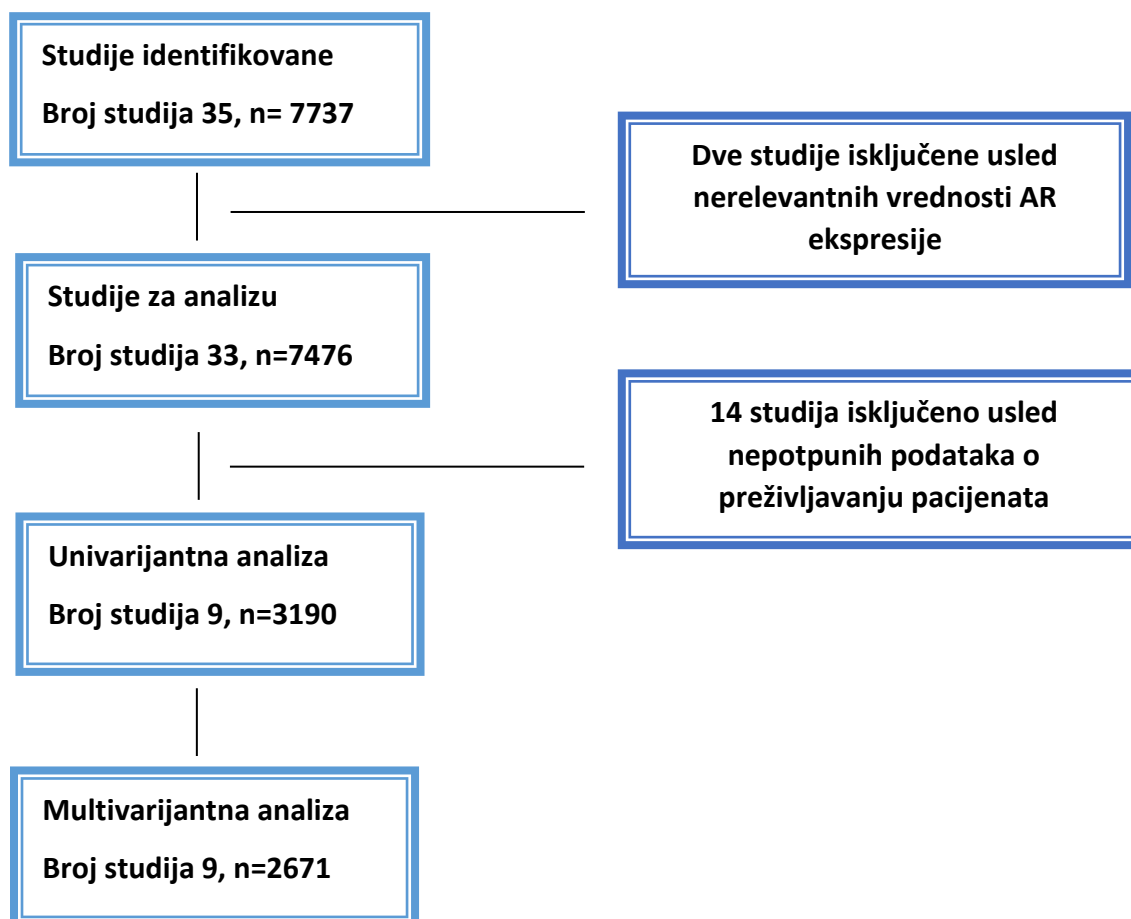
4.2 Genska meta-analiza

4.2.1 PRIZMA algoritam, selekcija i karakteristike identifikovanih setova podataka genske ekspresije

Identifikovali smo 35 dostupnih setova podataka genske ekspresije sa kliničkim podacima o toku i ishodu bolesti, odnosno preživljavanju kod 7737 pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke (grafik 3 i tabela 14-prilog). Od 35 identifikovanih setova, 2 seta nisu imali relevantne podatke genske ekspresije za androgeni receptor, AR. Od preostala 33 seta, 14 je isključeno usled neadekvatnih i nepotpunih podataka o ishodu bolesti i preživljavanju. Konačan broj setova podobnih za meta-analizu je iznosio 9, sa 3190 pacijentkinja koji su uključeni u univarijantnu analizu i 2671 pacijentkinja uključenih u multivarijantnu analizu (grafik 3). U osam setova genske ekspresije, 1.005 pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke, lečeno je u neoadjuvantnom pristupu, dok su ostale pacijentkinje lečene u adjuvantnom pristupu[93].

Medijana praćenja (eng. *follow-up*) za sve pacijentkinje je iznosila 10.17 godina. Kliničko-patološke karakteristike pacijentkinja u setovima genske ekspresije poput: kategorije starosne dobi (<50. godina i ≥50.godina), veličina tumora (< 2cm, 2≥TU<5 cm i ≥5 cm), gradus tumora (gradus 1, 2 i 3), status aksilarnih limfnih žlezda (pozitivne vs negativne), status receptora određen imunohistohemijski (IHH) (estrogen, progesteron i HER 2), ekspresije gena za ER i HER2 predstavljene su u tabeli 1, u prilogu. Uzevši u obzir pacijentkinje iz svih setova genske ekspresije, zabeleženo je duplo više pacijentkinja starijih od 50 godina (2088 vs 3999), jednaki broj TU manjih od 2cm i TU između 2 i 5 cm u odnosu na tumore veće od 5cm kojih je bilo najmanje (2460 vs 2364 vs 234), najmanji broj tumora gradusa 1 i najveći broj tumora gradusa 3 (gr1 TU 642 vs GR2 TU 2001 vs GR3 TU 2566), više pacijentkinja sa negativnim aksilarnim limfnim žlezdama (3538 vs 2713), 2259 luminal A tumora (ER pozitivni HER2 negativni tumori niske proliferacije), 2336 luminal B tumora (ER pozitivni HER2 negativni tumori visoke proliferacije), 1073 HER2 slični tumori (eng. *HER2 like*) i 2051 bazalnim tumorima slični tumori (eng. *basal-like*).

Grafik 3: PRIZMA algoritam meta-analize genske ekspresije i proces selekcije studija



4.2.2 Meta-analiza prognostičkog značaja ekspresije *iRNK AR* u celokupnoj populaciji pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke na podobnim setovima genske ekspresije

Sveukupno, visok nivo ekspresije *iRNK AR* (nivo ekspresije 3), kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno, koje su nelečene i lečene adjuvantnom terapijom (hemioterapijom i/ili hormonoterapijom), pokazao se kao dobar prognostički faktor u odnosu na preživljavanje bez bolesti (DFS HR 0.82 95%CI 0.72-0.92; $p=0.0007$) kao i ukupno preživljavanje (OS HR 0.84 95%CI 0.75-0.94, $p=0.02$) ali samo u univarijantnoj analizi. Visoka ekspresija *iRNK AR* nije zadržala značajnost u preživljavanju u multivarijantnoj analizi (DFS HR 0.97; 95%CI 0.84-1.13 $p=0.72$, OS HR 0.98 95%CI 0.85-1.12, $p=0.72$)(tabela 7).

Kada smo analizu preživljavanja, DFS i OS, uradili na podgrupama pacijentkinja poput: nelečenih sistemskom adjuvantnom terapijom, lečenih samo hormonoterapijom (HT), lečenih samo hemioterapijom (CT), lečenih kombinovanom terapijom - hemioterapijom i hormonoterapijom, nismo zabeleželi značajnu razliku u preživljavanju u odnosu na visoku ekspresiju *iRNK AR*, bilo u univarijantnoj, ili multivarijantnoj analizi (tabela 7).

Kako bismo ispitali uticaj nivoa ekspresije *iRNK AR* na prognozu ranog karcinoma dojke, poredili smo ishod bolesti, preživljavanje bez bolesti, i ukupno preživljavanje, kod tri podgrupe pacijentkinja koje su definisane na osnovu nivoa ekspresije *iRNK AR* kao niski, srednji i visoki nivo *iRNK AR* ekspresije (nivo 1, 2 i 3). Uticaj nivoa ekspresije *iRNK AR* na prognozu bolesti ispitali smo kod svih pacijentkinja zajedno. Pokazali smo da pacijentkinje sa visokom ekspresijom *iRNK AR* (nivo 3 ekspresije) imaju bolje preživljavanje bez bolesti, kao i ukupno preživljavanje, u odnosu na pacijentkinje sa nižim nivoom ekspresije *iRNK AR* (nivo ekspresije 1 i 2) (grafik 4).

Tabela 7: Preživljavanje bez bolesti (DFS) i ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na ekspresiju *iRNK AR* kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno u dostupnim setovima genske ekspresije

N	TH	HR uni	95%CI	p vred.	HR multi	95%CI	p vred.
		DFS			DFS		
3190	lečene i nelečene sve pac. Zajedno	0.82	0.72-0.92	0.0007	0.97	0.84-1.13	0.72
1219	nelečene*	0.89	0.72-1.09	0.26	0.90	0.69-1.19	0.49
1268	HT	0.91	0.71-1.18	0.12	0.99	0.76-1.32	0.99
463	CT	0.98	0.76-1.28	0.91	0.87	0.61-1.23	0.43
240	HT i CT	0.82	0.52-1.29	0.40	1.05	0.65-1.71	0.87
		OS			OS		
2671	lečene i nelečene sve pac. Zajedno	0.84	0.75-0.94	0.002	0.98	0.85-1.12	0.72
914	nelečene*	0.87	0.70-1.08	0.22	0.86	0.66-1.21	0.26
1143	HT	1.05	0.86-1.29	0.62	0.99	0.79-1.23	0.93
374	CT	1.02	0.79-1.32	0.85	0.92	0.67-1.27	0.63
240	HT i CT	0.89	0.60-1.30	0.62	1.01	0.66-1.57	0.93

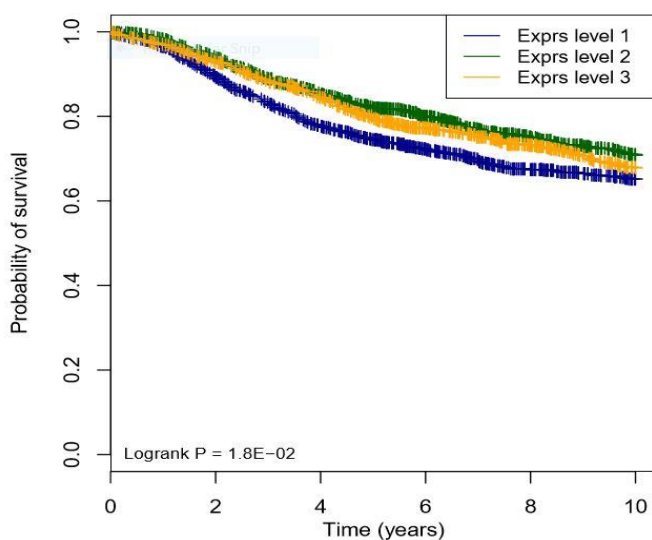
N: broj pacijentkinja; TH: terapija; Uni: univarijantna analiza; Multi: multivarijantna analiza; p vred.: p vrednost; HR: odnos rizika, (eng. *hazard ratio*); CI: interval poverenja, (eng. *confidence interval*); DFS: preživljavanje bez bolesti, (eng. *disease free survival*); OS: ukupno preživljavanje, (eng. *overall survival*);

*nelečene: pacijentkinje su imale hirurško lečenje +/- radioterapiju bez adjuvantne sistemske terapije; HT: hormonoterapija; CT: hemioterapija.

Grafik 4: Preživljavanje bez bolesti (DFS) i ukupno preživljavanje (OS) shodno nivoima ekspresije *iRNK AR* kod svih pacijentkinja zajedno;

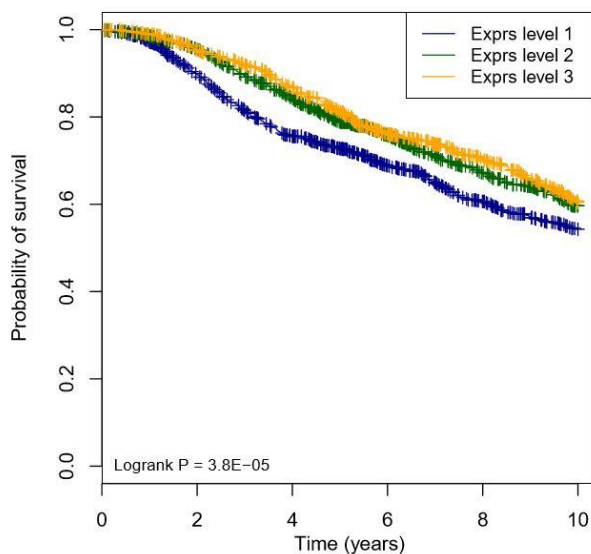
Kaplan Meierove krive, (eng. *Kaplan Meier*), Log Rank test; nivoi ekspresije *iRNK AR*: nivo 1 - najniži; nivo 2 – srednji; nivo 3 – najviši.

A) Preživljavanje bez bolesti - DFS



No. At Risk		0	2	4	6	8	10
Exprs level 1	1181	985	786	601	453	337	
Exprs level 2	1180	1046	877	677	496	357	
Exprs level 3	1180	1024	868	671	525	379	

B) Ukupno preživljavanje - OS



No. At Risk		0	2	4	6	8	10
Exprs level 1	1058	875	694	523	393	291	
Exprs level 2	1057	938	768	566	425	312	
Exprs level 3	1057	947	807	611	478	345	

4.2.3 Meta-analiza prognostičkog značaja ekspresije *iRNK AR* kod molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke na podobnim setovima genske ekspresije

Kod luminal A i luminal B molekularnih podtipova karcinoma dojke, nismo zabeleželi značajnu razliku u ishodu bolesti, preživljavanju bez bolesti, DFS, i ukupnom preživljavanju, OS, u odnosu na visoku ekspresiju *iRNK AR* kod svih pacijentkinja zajedno (nelečene i lečene adjuvantnom sistemskom terapijom), kao i u odnosu na sledeće kategorije pacijentkinja: nelečene, lečene samo hormonskom terapijom (HT), lečene samo hemioterapijom (CT), lečene kombinovanom terapijom – hemio i hormonoterapijom, bilo u univarijantnoj, ili multivarijantnoj analizi (tabela 8).

Kod HER2-sličnog (eng. *HER2-like*) molekularnog podtipa ranog karcinoma dojke kod svih pacijentkinja zajedno (lečene i nelečene adjuvantom sistemskom terapijom) pokazali smo da je visok nivo ekspresije *iRNK AR* bio povezan sa značajno boljim ukupnim preživljavanjem, kako u univarijantnoj (OS HR 0.75, 95%CI 0.56-1.00, p=0.05), tako i u multivarijantnoj analizi (OS HR 0.72; 95% CI 0.53-0.97, p=0.03). U podgrupi pacijentkinja sa HER2-sličnim karcinomom dojke, koje su tretirane samo hormonskom terapijom, takođe smo pokazali bolje ukupno preživljavanje u multivarijantnoj analizi (OS HR 0.50 95%CI 0.26-0.97, p= 0.04).

Kod bazal-like podtipa ranog karcinoma dojke pokazali smo značajnu povezanost između ekspresije *iRNK AR* i preživljavanja bez bolesti i to samo kod pacijentkinja koje su lečene hemioterapijom u adjuvantnom pristupu, u univarijantnoj analizi (DFS HR 0.37, 95% CI 0.14-0.97, p=0.04) (tabela 8).

Kako bismo ispitali uticaj nivoa ekspresije *iRNK AR* na prognozu molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke, poredili smo ishod bolesti, preživljavanje bez bolesti i ukupno preživljavanje, kod tri podgrupe pacijentkinja koje su definisane na osnovu nivoa ekspresije *iRNK AR* kao niski, srednji i visoki nivo *iRNK AR* ekspresije (nivo 1, 2 i 3). Uticaj nivoa ekspresije *iRNK AR* na prognozu bolesti ispitivali smo kod sledećih molekularnih podtipova: luminal A, luminal B, HER2 sličnom, bazalnom epitelu sličnom podtipu. Pokazali smo da pacijentkinje sa visokom ekspresijom *iRNK AR* (nivo 3

ekspresije) imaju bolje ukupno preživljavanje, OS, u odnosu na pacijentkinje sa nižim nivoom ekspresije *iRNK AR* (nivo ekspresije 1 i 2), samo u HER2 sličnom podtipu karcinoma dojke ($p=0,03$), dok u ostalim molekularnim podtipovima nismo zabežili razliku u preživljavanju bez bolesti, DFS, i ukupnom preživljavanju, OS, u odnosu na nivoe ekspresije *iRNK AR* (grafik 5).

Tabela 8: Preživljavanje bez bolesti (DFS) i ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na ekspresiju *iRNK* AR kod molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke u dostupnim setovima genske ekspresije

KD podtipovi	N	TH	HR uni	95%CI	p vrednost	HR multi	95%CI	p vrednost
Luminal A			DFS			DFS		
	1317	lečene i nelečene svi pac. zajedno	1.16	0.76-1.77	0.48	1.13	0.72-1.77	0.58
	487	nelečene*	1.40	0.74-2.66	0.29	1.27	0.65-2.51	0.48
	444	HT	1.06	0.51-2.19	0.87	1.09	0.51-2.34	0.81
	70	CT	1.05	0.19-5.78	0.95	0.32	0.02-4.25	0.38
	84	HT i CT	1.03	0.16-6.87	0.97	1.01	0.12-8.36	0.99
			OS			OS		
	972	lečene i nelečene svi pac. zajedno	1.22	0.85-1.74	0.28	1.05	0,71-1.55	0.79
	351	nelečene*	1.12	0.62-2.03	0.71	0.93	0.49-1.76	0.82
	400	HT	1.21	0.72-2.04	0.47	0.92	0.54-1.59	0.77
	40	CT	9.77	0.08- 1135.38	0.35	3.88	0.02-812.23	0.62
	66	HT i CT	2.72	0.42-17.67	0.29	1.92	0.22-16.44	0.55

Luminal B			DFS			DFS		
	1258	lečene i nelečene svi pac. zajedno	0.81	0.64-1.03	0.08	0.86	0.67-1.11	0.25
	340	nelečene*	0.72	0.46-1.12	0.15	0.73	0.45-1.18	0.19
	628	HT	0.83	0.33-2.12	0.70	0.62	0.22-1.71	0.35
	102	CT	0.61	0.25-1.48	0.27	1.20	0.33-4.36	0.78
	147	HT i CT	0.83	0.33-2.12	0.70	0.62	0.22-1.71	0.35
			OS			OS		
	1128	lečene i nelečene svi pac. zajedno	1.01	0.81-1.25	0.94	0.99	0.79-1.24	0.93
	252	nelečene*	0.87	0.55-1.39	0.57	0.75	0.45-1.26	0.28
	583	HT	1.26	0.94-1.67	0.12	1.03	0.77-1.39	0.79
	66	CT	2.42	0.56-10.45	0.24	2.28	0.49-10.90	0.30
	84	HT i CT	1.05	0.49-2.21	0.90	0.58	0.24-1.35	0.21
HER2 like			DFS			DFS		
	450	lečene i nelečene svi pac. zajedno	0.93	0.68-1.26	0.63	0.85	0.61-1.18	0.34
	153	nelečene*	0.89	0.43-1.83	0.75	0.64	0.28-1.48	0.29
	89	HT	0.81	0.43-1.52	0.52	0.57	0.29-1.17	0.13
	111	CT	0.76	0.45-1.26	0.29	0.62	0.33-1.16	0.14

	38	HT i CT	1.19	0.46-3.10	0.72	1.49	0.43-5.24	0.53
			OS			OS		
	430	lečene i nelečene svi pac. zajedno	0.75	0.56-1.00	0.05	0.72	0.53-0.97	0.03
	122	nelečene*	0.85	0.42-1.72	0.66	0.79	0.36-1.75	0.57
	77	HT	0.66	0.37-1.19	0.17	0.50	0.26-0.97	0.04
	99	CT	0.69	0.42-1.17	0.18	0.68	0.39-1.18	0.18
	38	HT i CT	0.93	0.39-2.19	0.87	0.99	0.32-3.06	0.98
Basal like			DFS			DFS		
	557	lečene i nelečene svi pac. zajedno	0.96	0.62-1.30	0.56	0.98	0.66-1.46	0.92
	198	nelečene*	1.21	0.65-2.23	0.55	1.14	0.59-2.21	0.71
	68	HT	0.55	0.14-2.12	0.38	1.72	0.27-10.76	0.56
	165	CT	0.37	0.14-0.97	0.04	0.43	0.17-1.11	0.08
	40	HT i CT	1.04	0.34-3.20	0.94	0.81	0.21-3.02	0.75
				OS			OS	
	519	lečene i nelečene svi pac. zajedno	0.90	0.63-1.29	0.58	0.88	0.59-1.29	0.50
	156	nelečene*	1.19	0.62-2.28	0.61	0.97	0.49-1.90	0.93
55	HT	0.65	0.18-2.36	0.51	0.93	0.23-3.82	0.92	

	161	CT	0.56	0.27-1.18	0.13	0.58	0.27-1.22	0.15
	40	HT i CT	1.39	0.48-4.00	0.54	1.04	0.33-3.31	0.94

KD: karcinom dojke; N: broj pacientkinja; TH: terapija; Uni: univarijantna analiza; Multi: multivarijantna analiza; DFS: preživljavanje bez bolesti, (eng. *disease free survival*); HR: odnos rizika, (eng. *hazard ratio*); CI: interval poverenja, (eng. *confidence interval*); OS: ukupno preživljavanje, (eng. *overall survival*);

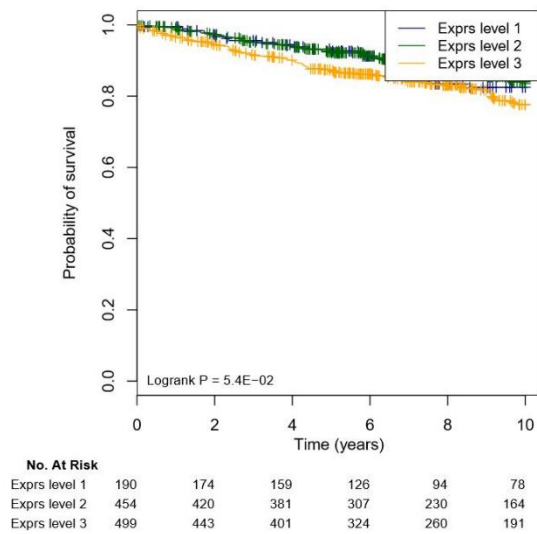
*nelečene: pacientkinje su imale hirurško lečenje +/- radioterapiju bez adjuvantne sistemske terapije; HT: hormonoterapija, CT: hemioterapija.

Grafik 5: Preživljanje bez bolesti (DFS) i ukupno preživljanje (OS) shodno nivoima ekspresije *iRNK AR* kod molekularnih podtipova karcinoma dojke: luminal A, luminal B, HER2 slični, bazalnom epitelu slični podtip;

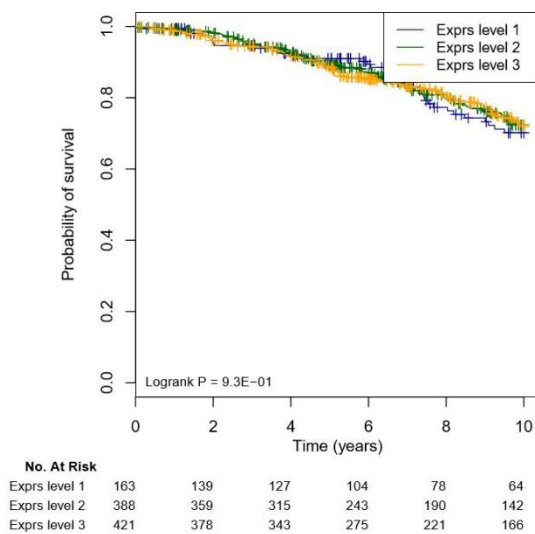
Kaplan Meierove krive, (eng. *Kaplan Meier*), Log Rank test; nivoi ekspresije *iRNK AR*: nivo 1 - najniži; nivo 2 – srednji; nivo 3 – najviši.

Luminal A

DFS

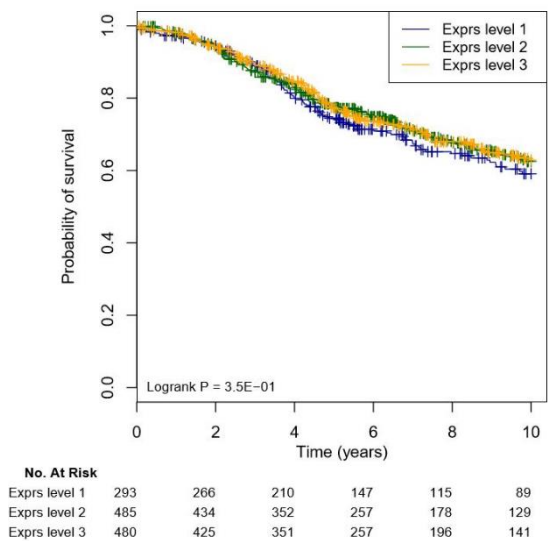


OS

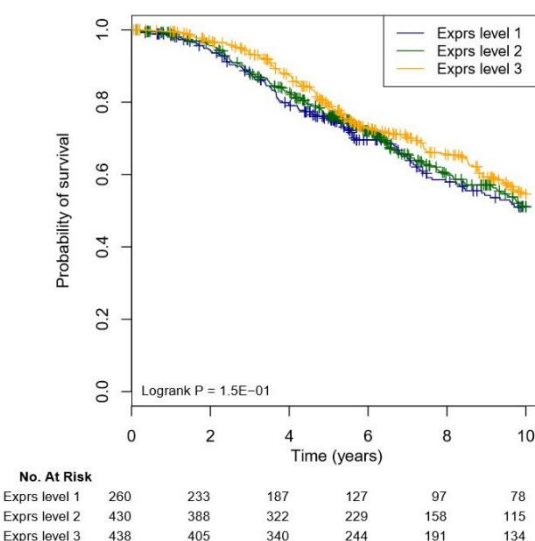


Luminal B

DFS

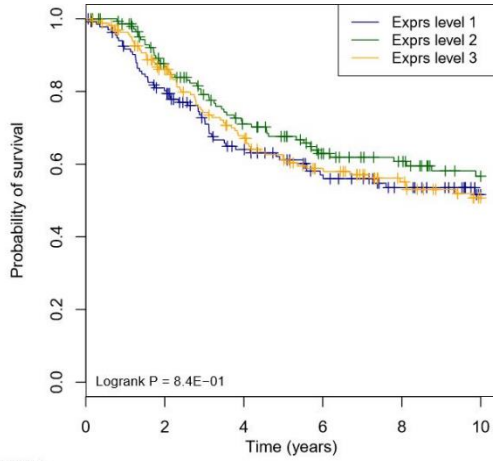


OS



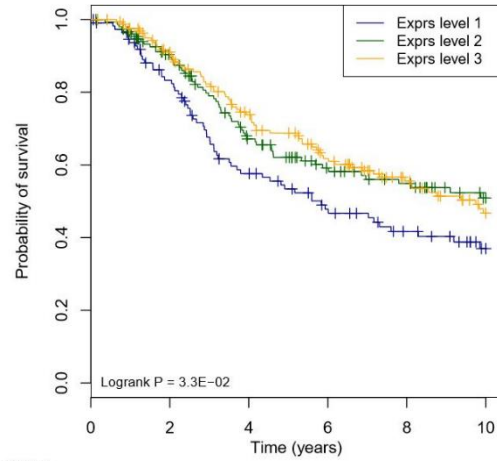
HER2 slični

DFS



No. At Risk		0	2	4	6	8	10
Exprs level 1	136	103	71	54	41	25	
Exprs level 2	148	115	85	63	52	39	
Exprs level 3	166	129	93	71	54	39	

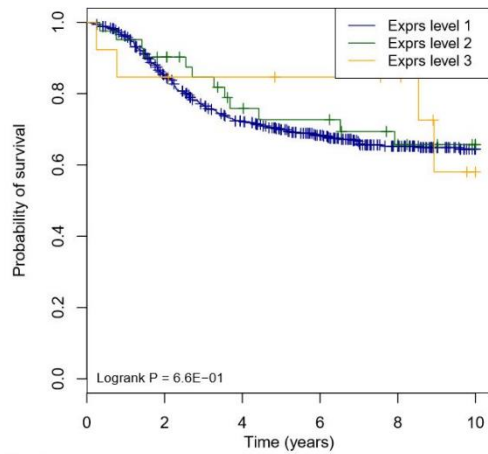
OS



No. At Risk		0	2	4	6	8	10
Exprs level 1	113	87	57	42	31	19	
Exprs level 2	153	122	81	59	49	34	
Exprs level 3	164	138	103	77	55	39	

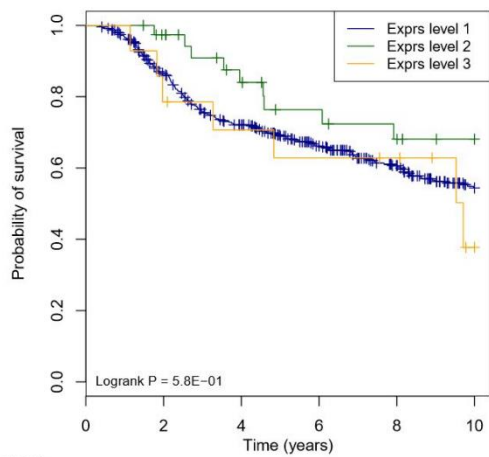
Bazalnom tipu slični

DFS



No. At Risk		0	2	4	6	8	10
Exprs level 1	503	395	306	250	185	133	
Exprs level 2	41	36	25	23	18	13	
Exprs level 3	13	11	10	9	8	3	

OS



No. At Risk		0	2	4	6	8	10
Exprs level 1	466	374	290	229	170	119	
Exprs level 2	39	35	24	19	16	13	
Exprs level 3	14	11	9	8	7	2	

4.2.4 Udruženost ekspresije *iRNA AR* sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod svih pacijentkinja sa ranim karcinom dojke zajedno, iz dostupnih setova genske ekspresije

Ispitali smo korelaciju između ekspresije *iRNA AR* kao kontinuirane varijable i kliničko-patoloških karakteristika poput: godine pacijentkinja kao kontinuirana i kategorijska varijabla (<50 god. vs ≥50 god.); veličina tumora kao kontinuirana i kategorijska varijabla (<2cm, 2cm≥TU<5cm, ≥5cm); gradus tumora kao kategorijska varijabla (gradus 1 vs gradus 2 vs gradus 3); status aksilarnih limfnih žlezda kao kategorijska varijabla (pozitivni nodusi vs negativni nodusi); ekspresije gena za estrogene receptore kao kategorijska varijabla (prisutna vs odsutna); ekspresije gena za HER2 kao kategorijska varijabla (prisutna vs odsutna), i to kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno.

Analiza korelacije kod svih pacijentkinja zajedno pokazala je da pacijentkinje starije od 50 godina imale su značajno više ekspresiju *iRNA AR* u odnosu na pacijentkinje mlađe od 50 godina ($p < 0.001$). Značajnu obrnutu korelaciju smo pokazali između ekspresije *iRNA AR* i veličine tumora kao kontinuirane varijable ($p = 0.03$), u smislu da manji tumori imaju češće ekspresiju *iRNA AR*. Značajnu obrnutu korelaciju smo pokazali i između ekspresije *iRNA AR* i bimodalne (prisutna vs odsutna) ekspresije *ERBB2* gena ($p < 0.001$) koja ukazuje da ekspresija *iRNA AR* je značajno povezana sa odsustvom ekspresije *ERBB2* gena (tabela 9; grafik 6).

Tabela 9: Korelacija ekspresije *iRNA AR* sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod svih pacijentkinja sa ranim karcinom dojke zajedno, u dostupnim setovima genske ekspresije

Sve pacijentkinje sa ranim karcinom dojke iz dostupnih setova genske ekspresije zajedno, N= 5861				
Varijable	p vrednost	Korelacija	Wilcox p vrednost	Kw p vrednost
Godine*	0	0,13	NA	NA
Godine ¥ < 50 god. ≥ 50 god.	NA	NA	<0,001	NA
Veličina tumora*	0,03	-0,03	NA	NA
Veličina tumora ¥ < 2cm 2≥TU<5 cm ≥5 cm	NA	NA	NA	0,458
Gradus tumora ¥ GR 1 GR 2 GR 3	NA	NA	NA	0,425
Limfni nodusi ¥ pozitivni vs negativni	NA	NA	0,65	NA
ESR1 ¥ prisutna vs odsutna	NA	NA	0	NA
ERBB2 ¥ prisutna vs odsutna	NA	NA	<0,001	NA

N: broj pacijentkinja, Wilcox: Wilcoxon test; KW: Kruskal Wallis test; ESR1: gen za estrogen, ERBB2(*erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*) gen. *kontinuirana varijabla; ¥kategorijska varijabla;

Grafik 6: Korelacija ekspresije *iRNA* AR sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod svih pacijentkinja sa ranim karcinom dojke zajedno u dostupnim setovima genske ekspresije:

A: godine, kontinuirana varijabla, B: godine, kategorijska varijabla (< i ≥ 50 god.);

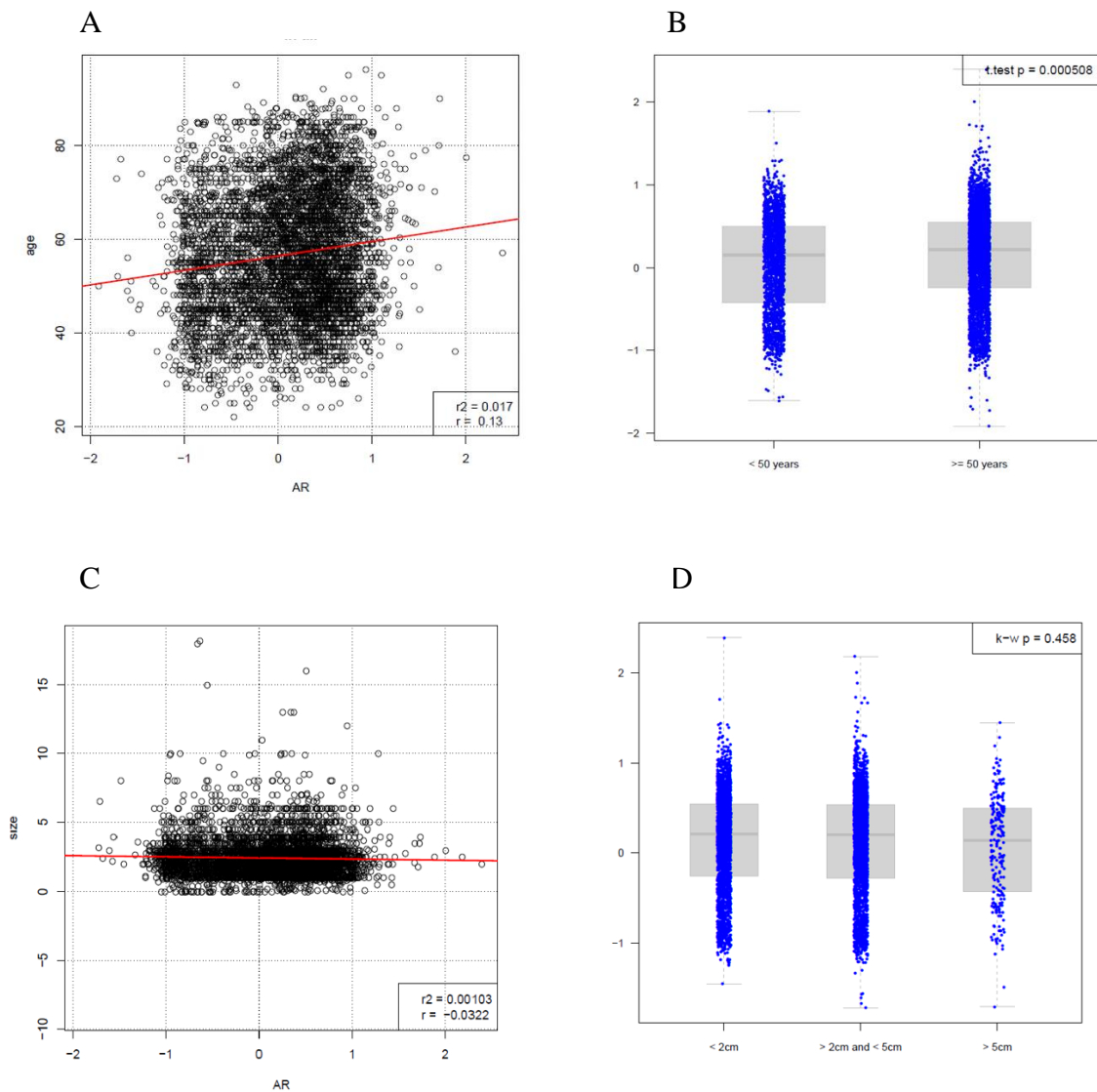
C: veličina tumora, kontinuirana varijabla, D: veličina tumora, kategorijska varijabla (<2 cm, 2 ≥TU <5, ≥ 5cm);

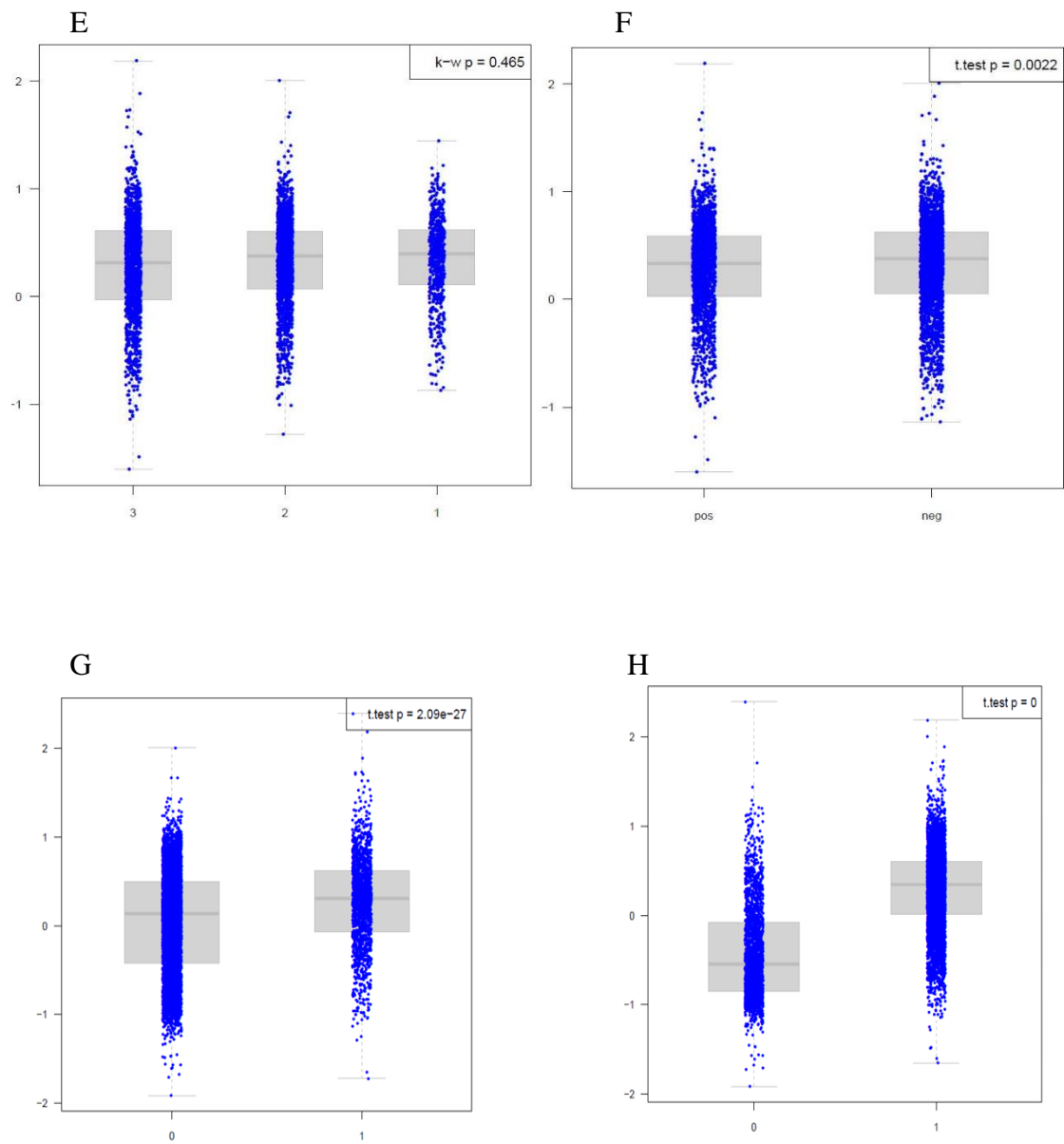
E: gradus tumora, GR1 vs GR2 vs GR3;

F: status limfnih žlezda, pozitivne vs negativne;

G: *ERBB2* genska ekspresija, prisutna vs odsutna,

H: *ESR1* genska ekspresija, prisutna vs odsutna.





4.2.5 Udruženost *iRNK AR* sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke, iz dostupnih setova genske ekspresije

Evaluirali smo korelaciju ekspresije *iRNK AR* sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke, definisanih pomoću PAM50 klasifikatora, iz dostupnih setova genske ekspresije (tabela 10).

Kod luminal A podtipa karcinoma dojke značajna korelacija je nađena između ekspresije *iRNK AR* i tumora manjih dimenzija (kontinuirana varijabla), $p < 0.001$, kao i značajna povezanost sa ekspresijom gena za estrogene receptore, *ESR1*, $p < 0.001$ (tabela 10, grafik 7).

Grafik 7: Korelacija ekspresije *iRNK AR* sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod luminal A molekularnog podtipa:

A: godine, kontinuirana varijabla, B: godine, kategorijska varijabla ($< i \geq 50$ god.);

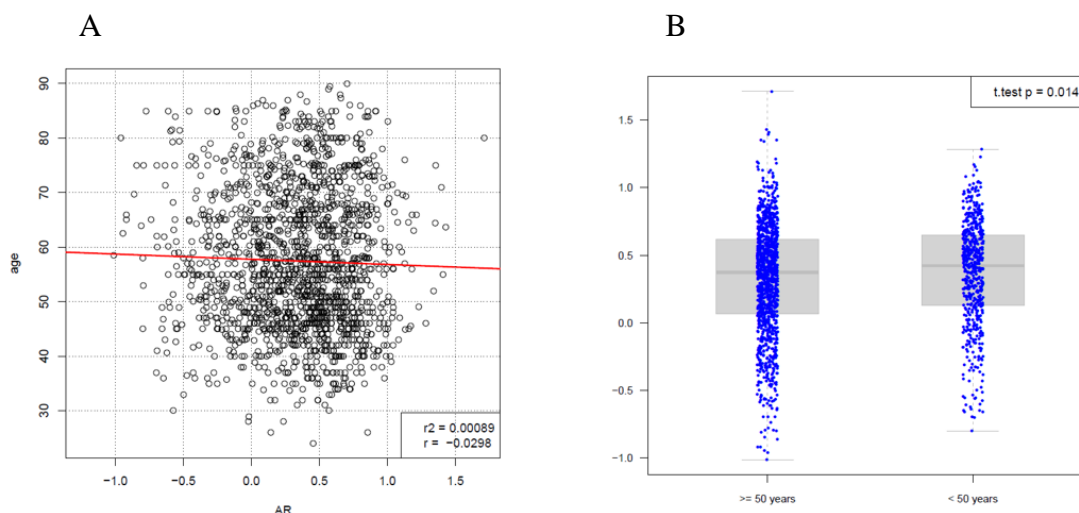
C: veličina tumora, kontinuirana varijabla, D: veličina tumora, kategorijska varijabla (< 2 cm, $2 \geq TU < 5$, ≥ 5 cm);

E: gradus tumora, GR1 vs GR2 vs GR3;

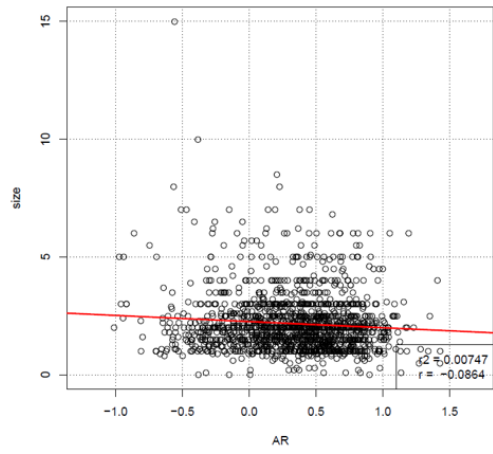
F: status limfnih žlezda, pozitivne vs negativne;

G: *ERBB2* genska ekspresija, prisutna vs odsutna,

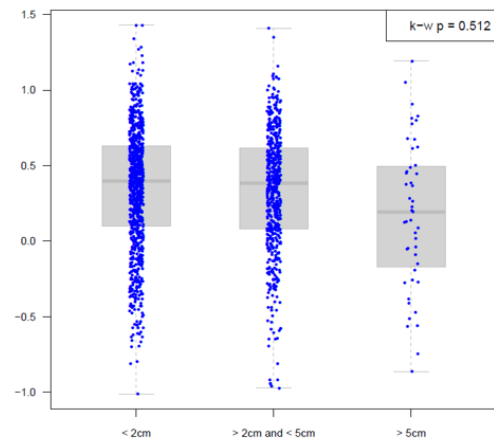
H: *ESR1* genska ekspresija, prisutna vs odsutna.



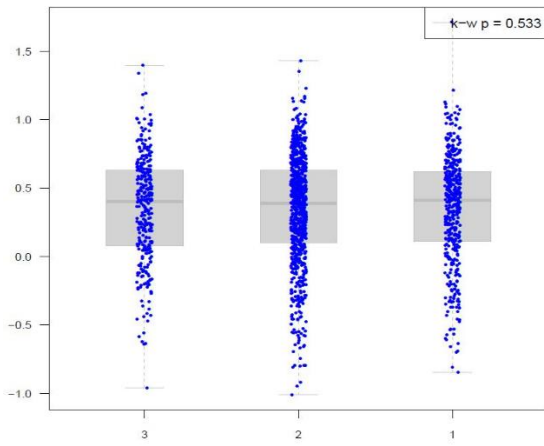
C



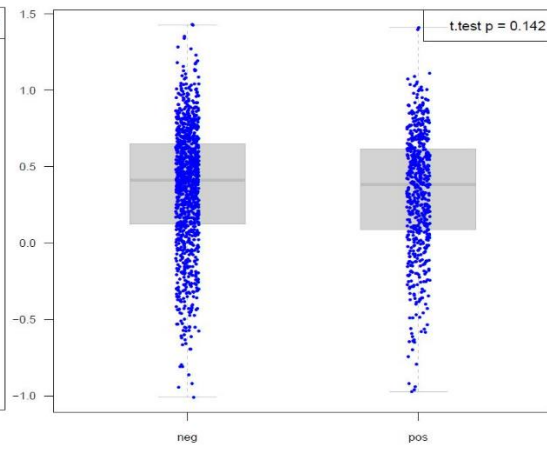
D



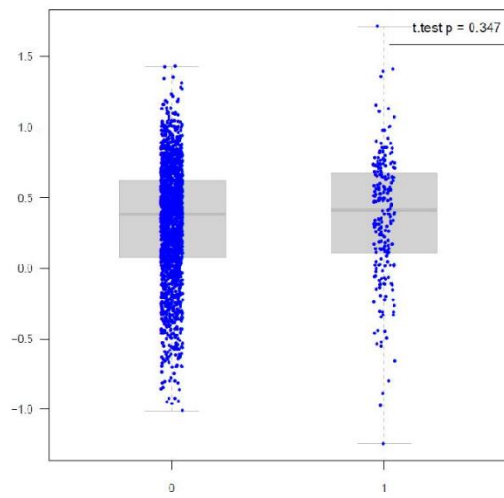
E



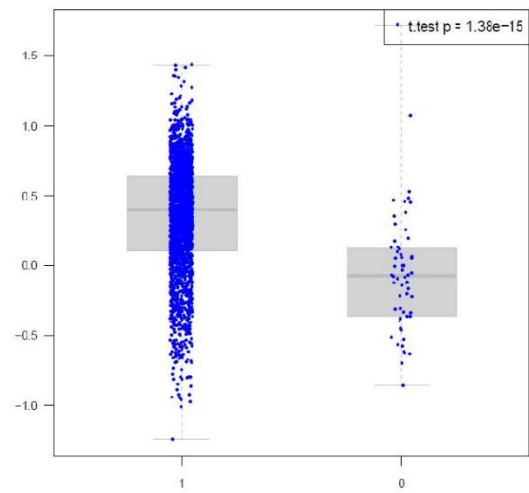
F



G



H



Kod luminal B karcinoma dojke značajna pozitivna korelacija je pokazana između ekspresije *iRNK AR* i starosti iznad 50 godina, $p < 0.001$. Osim toga u podgrupi luminal B tumora pokazali smo granično značajnu korelaciju između ekspresije *iRNK AR* i negativnog statusa aksilarnih limfnih žlezda ($p = 0.05$) (tabela 10, grafik 8).

Grafik 8: Korelacija ekspresije *iRNK AR* sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod luminal B molekularnog podtipa:

A: godine, kontinuirana varijabla, B: godine, kategorijska varijabla ($< i \geq 50$ god.);

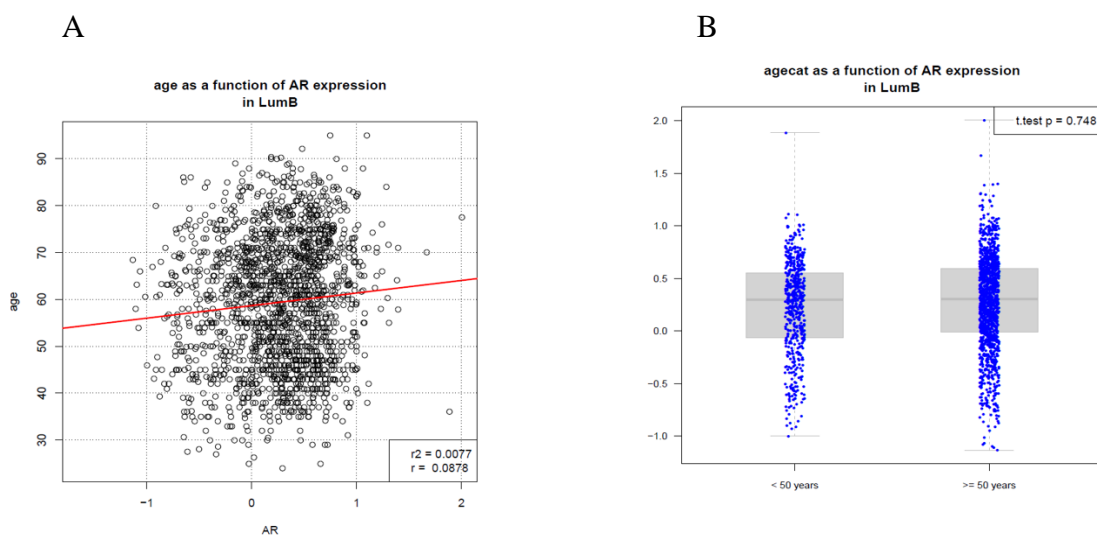
C: veličina tumora, kontinuirana varijabla, D: veličina tumora, kategorijska varijabla (< 2 cm, $2 \geq TU < 5$, ≥ 5 cm);

E: gradus tumora, GR1 vs GR2 vs GR3;

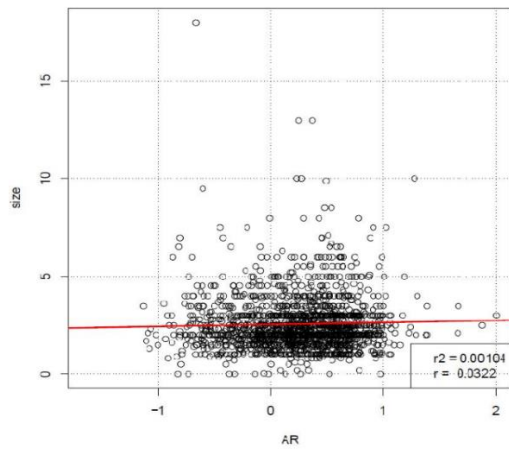
F: status limfnih žlezda, pozitivne vs negativne;

G: *ERBB2* genska ekspresija, prisutna vs odsutna,

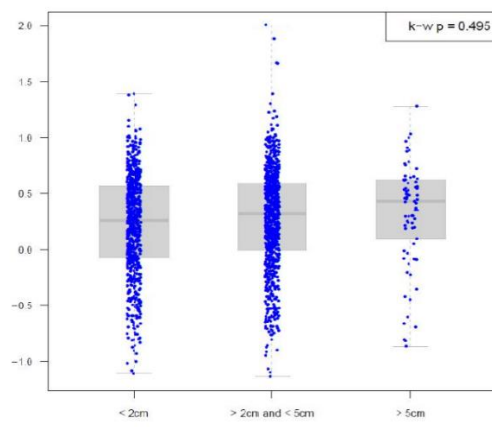
H: *ESR1* genska ekspresija, prisutna vs odsutna.



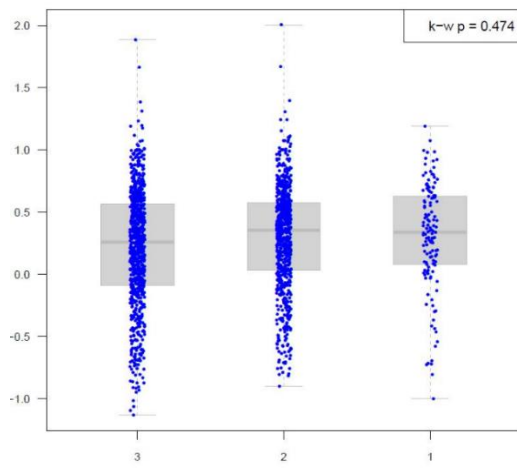
C



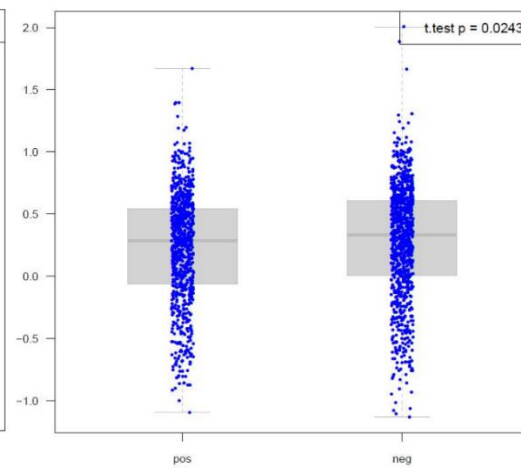
D



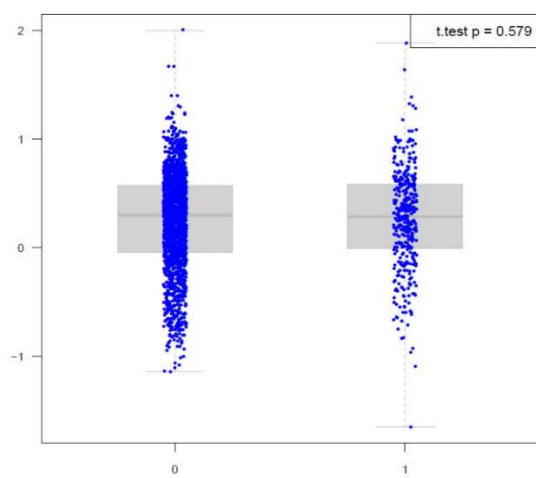
E



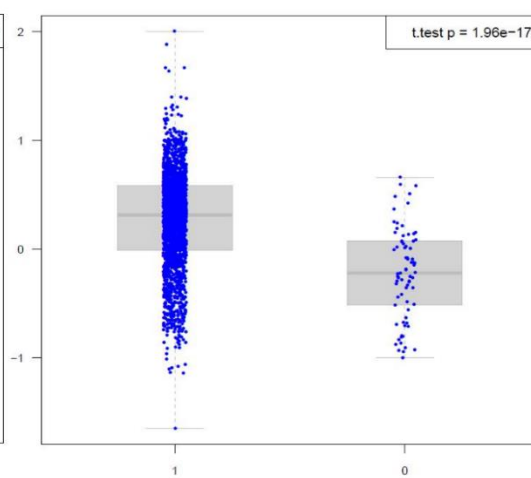
F



G



H



Kod HER-2 sličnog karcinoma dojke pokazali smo korelaciju između ekspresije *iRNK AR* i ekspresije *ERBB2* gena, kao i *ESR1* gena, $p < 0.001$ za oba, (tabela 10, grafik 9).

Grafik 9: Korelacija ekspresije *iRNK AR* sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod HER2 sličnog molekularnog podtipa:

A: godine, kontinuirana varijabla, B: godine, kategorijska varijabla (< i ≥ 50 god.);

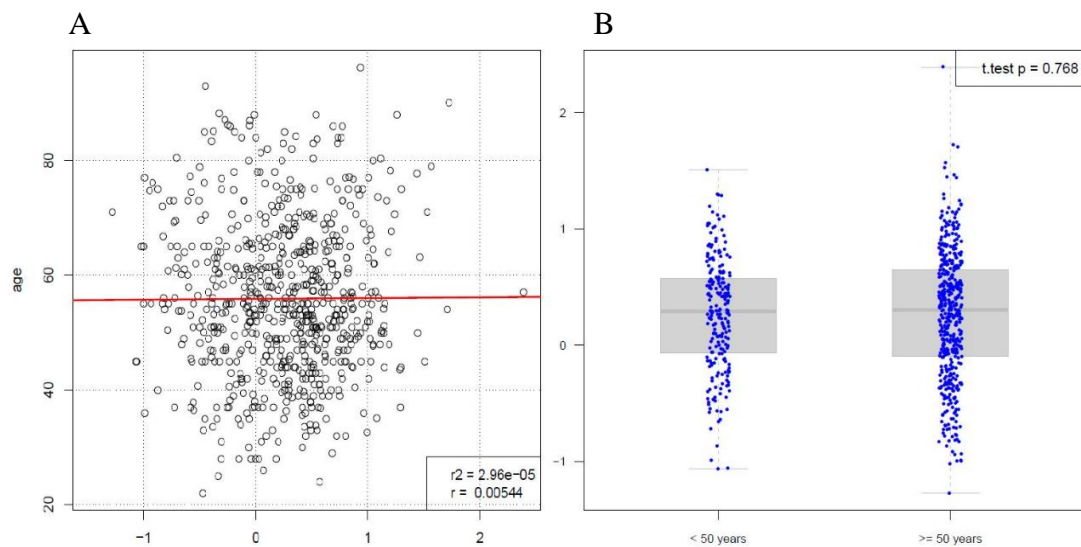
C: veličina tumora, kontinuirana varijabla, D: veličina tumora, kategorijska varijabla (<2 cm, 2 ≥TU <5, ≥ 5cm);

E: gradus tumora, GR1 vs GR2 vs GR3;

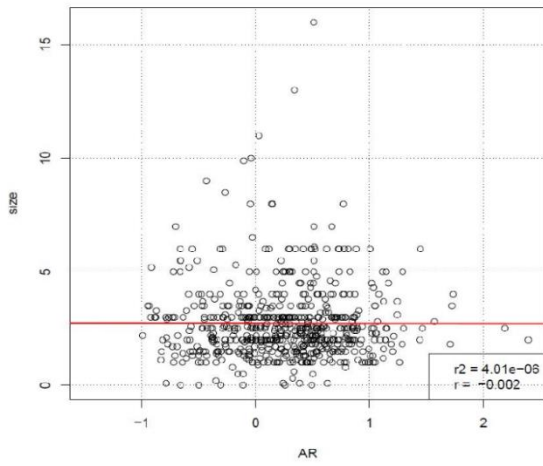
F: status limfnih žlezda, pozitivne vs negativne;

G: *ERBB2* genska ekspresija, prisutna vs odsutna,

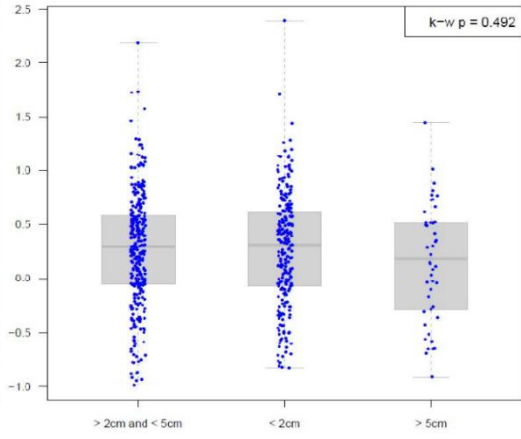
H: *ESR1* genska ekspresija, prisutna vs odsutna.



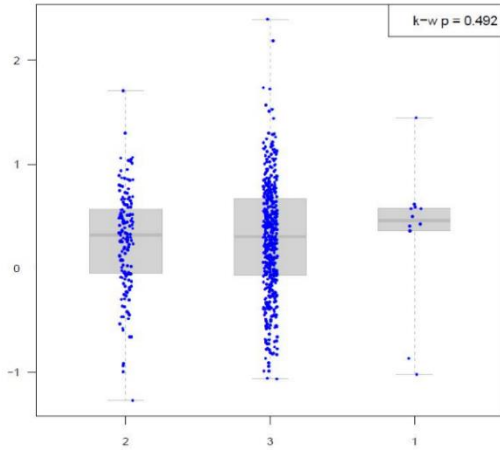
C



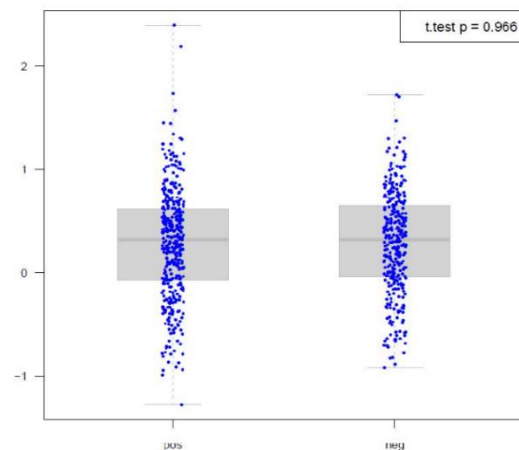
D



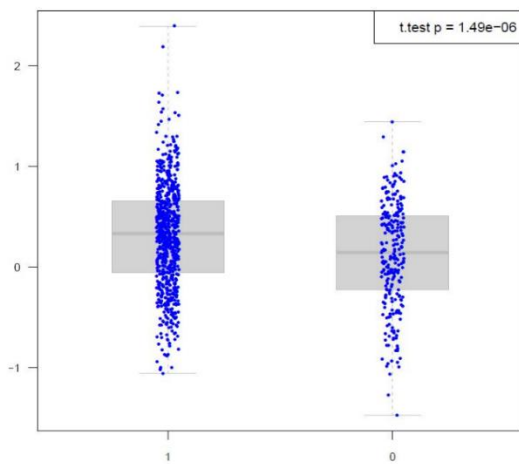
E



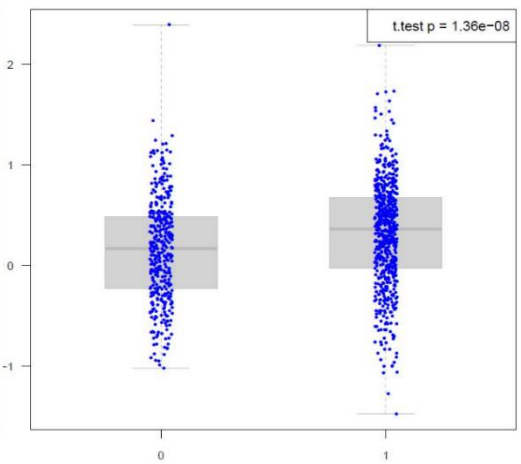
F



G



H



Kod trostruko negativnog (eng. *triple-negative*) podipa karcinoma dojke zabeležena je korelacija između ekspresije *iRNK AR* i *ERBB2*, kao i *ESR1* gena, $p < 0.001$ za oba, (tabela 10, grafik 10).

Grafik 10: Korelacija ekspresije *iRNK AR* sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod bazalnom epitelu sličnog molekularnog podtipa:

A: godine, kontinuirana varijabla, B: godine, kategorijska varijabla (< i ≥ 50 god.);

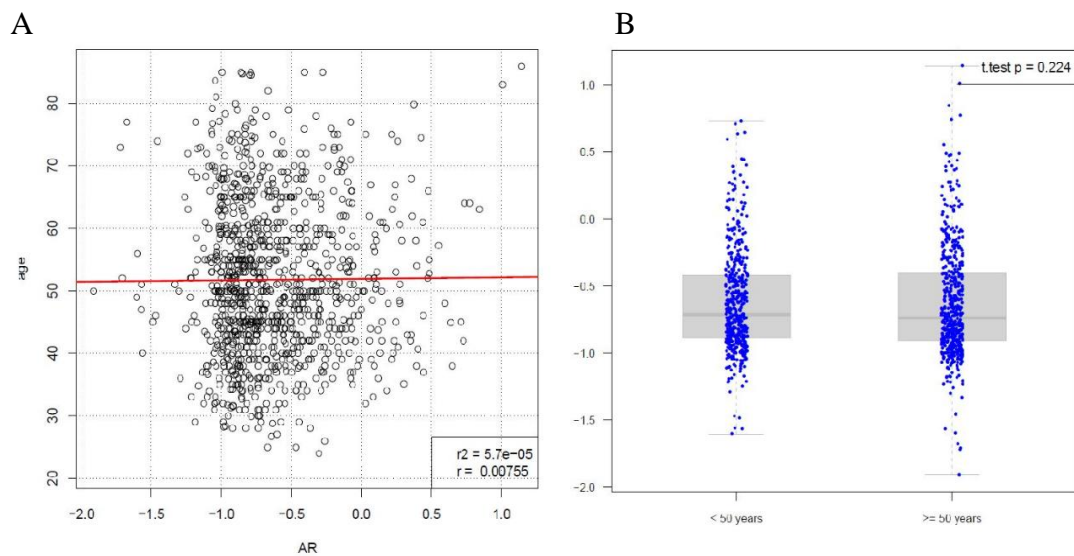
C: veličina tumora, kontinuirana varijabla, D: veličina tumora, kategorijska varijabla (<2 cm, 2 ≥TU <5, ≥ 5cm);

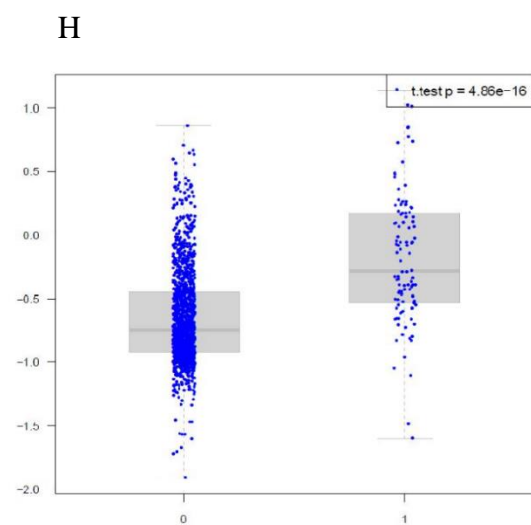
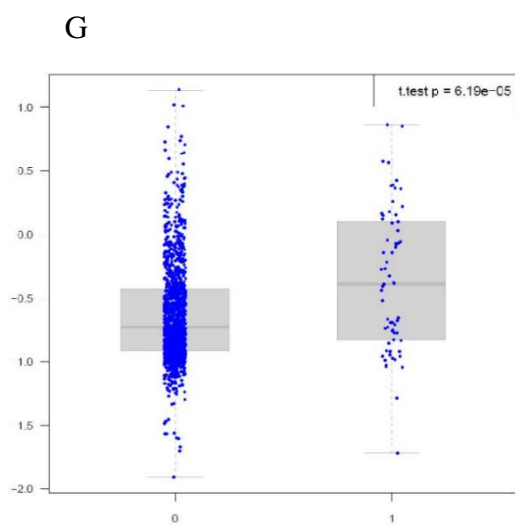
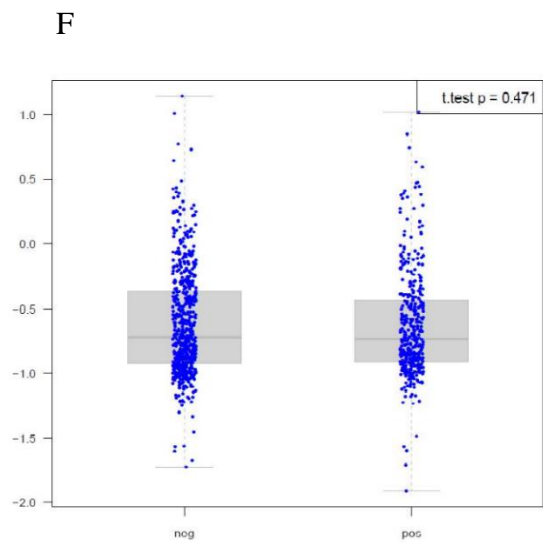
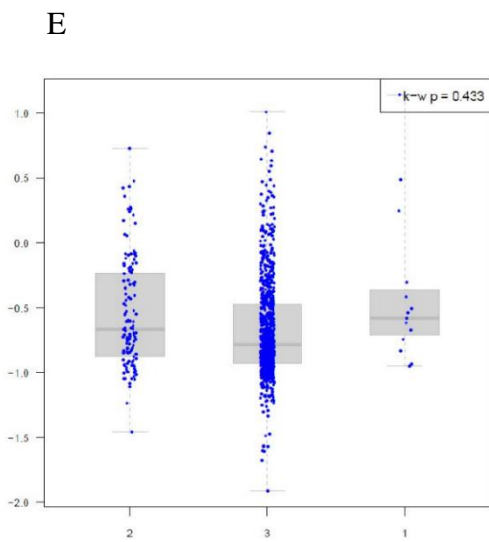
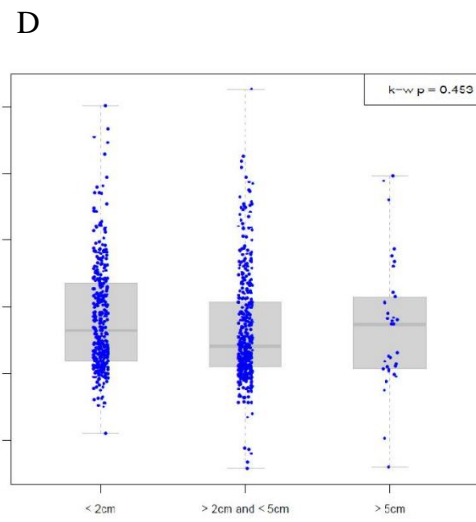
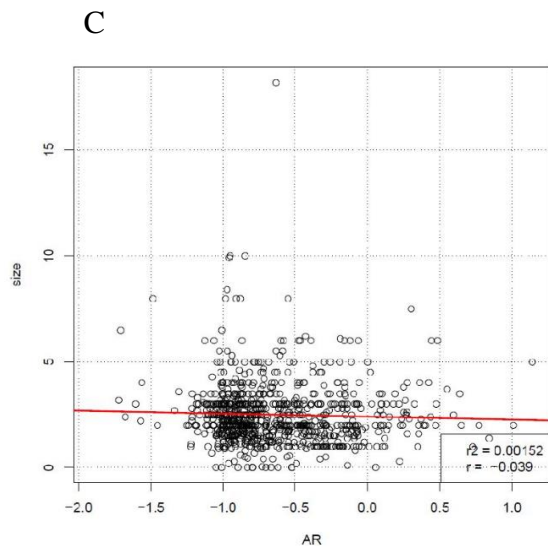
E: gradus tumora, GR1 vs GR2 vs GR3;

F: status limfnih žlezda, pozitivne vs negativne;

G: *ERBB2* genska ekspresija, prisutna vs odsutna,

H: *ESR1* genska ekspresija, prisutna vs odsutna.





Kod svih navedenih molekularnih podtipova karcinoma dojke pokazali smo pozitivnu korelaciju između ekspresije *iRNK AR* mRNA i *ESR1* gena, odnosno ekspresije gena za estrogenski receptor ($p < 0.001$) (tabela 10, grafik 11).

Grafik 11: Prikazana je ekspresija AR u odnosu na ekspresiju ESR1 gena kod molekularnih podtipova karcinoma dojke

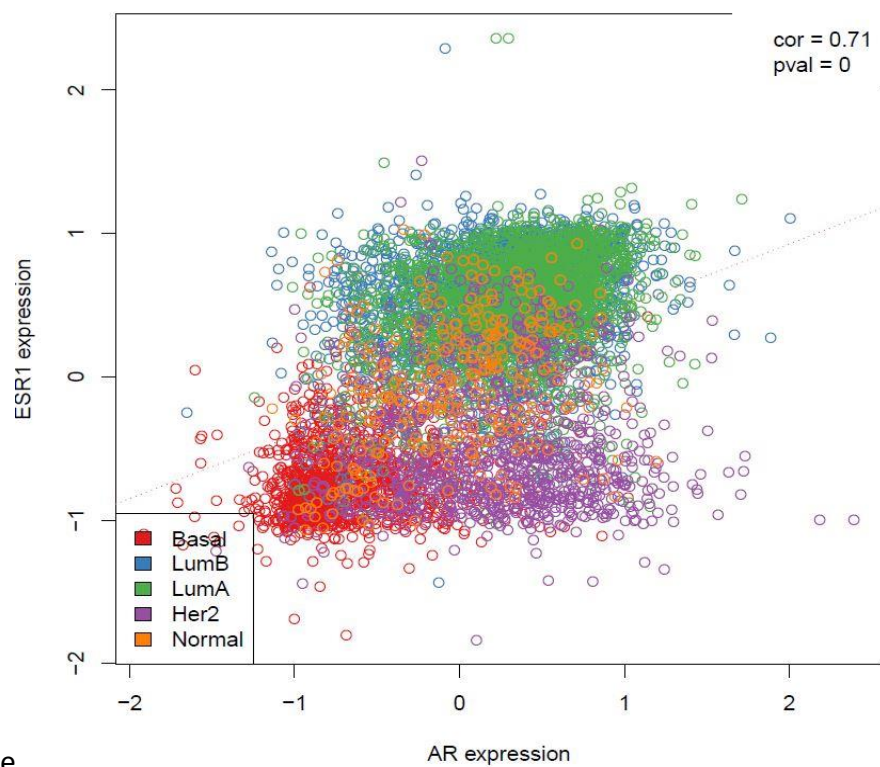


Tabela 10: Korelacija ekspresije *iRNA AR* sa karakteristikama pacijentkinja i tumora kod molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke

Varijable	LUMINAL A				LUMINAL B				HER2 slični				BASAL-nom tipu slični			
	p value	cor	Wilco x p value	Kw p value	p value	cor	Wilcox p value	Kw p value	p value	cor	Wilcox p value	Kw p value	p value	cor	Wilcox p value	Kw p value
Godine*	0.60	-0.01	NA	NA	<0.001	0.09	NA	NA	0.86	0.005	NA	NA	0.79	0.008	NA	NA
Godine‡	NA	NA	0.30	NA	NA	NA	0.015	NA	NA	NA	0.86	NA	NA	NA	0.44	NA
Tumor*	<0.001	-0.09	NA	NA	0.193	0.032	NA	NA	0.96	-0.002	NA	NA	0.26	-0.038	NA	NA
Tumor‡	NA	NA	NA	0.512	NA	NA	NA	0.495	NA	NA	NA	0.492	NA	NA	NA	0.45
Gradus‡	NA	NA	NA	0.533	NA	NA	NA	0.474	NA	NA	NA	0.492	NA	NA	NA	0.43
LGL‡	NA	NA	0.142	NA	NA	NA	0.047	NA	NA	NA	0.63	NA	NA	NA	0.65	NA
ESR1‡	NA	NA	<0.001	NA	NA	NA	<0.001	NA	NA	NA	<0.001	NA	NA	NA	0.001	NA
ERBB2‡	NA	NA	0.46	NA	NA	NA	0.85	NA	NA	NA	<0.001	NA	NA	NA	0.001	NA

Wilcox – Wilcoxon test; KW –Kruskal Wallis test; godine kategorija: <50god. vs ≥50god.; tumor kategorija: <2cm vs ≥2TU<5cm vs ≥5cm; gradus kategorija: GR1 vs GR2 vs GR3; LGL – aksilarne limfne žlezde: pozitivne vs negativne; ESR1- estrogen gen, ERBB2 - (*erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*) gen.

*kontinuirana varijabla; ‡kategorijska varijabla;

4.2.6 Korelacija ekspresije *iRNK AR* sa individualnim genima i genskim zapisima (eng. *gene signature*), kod svih pacijentkinja zajedno

Ispitali smo korelaciju između ekspresije *iRNK AR* i ekspresije individualnih gena, ili genskih zapisa (eng. *gene-signature*), od potencijalne kliničke važnosti i relevantnosti kod svih pacijentkinja sa karcinom dojke zajedno.

Naši rezultati su pokazali sledeće značajne korelacije: negativnu korelaciju sa genskim zapisima koji su udruženi sa proliferacijom poput AURKA GS[72], CIN70[73], GGI[75] i GENE70[74] (svi $p < 0.001$); negativnu korelaciju sa genima udruženim sa imunim odgovorom kao i genskim zapisima poput Immune 1 GS[76] ($p = 0.004$) i Immune 2 GS[77] ($p < 0.001$), kao i sledećim individualnim genima poput *CTLA4*, *IDO1*, *IFNG*, *IGKC*, *PD1*, *CXCL9*, *CXCL13* i *PDL1* (svi, $p < 0.001$) (tabela 11).

Pozitivnu korelaciju sa genskim zapisima udruženim sa tumorskom stromom poput stroma1 GS[78] ($p < 0.001$), ali ne i sa stroma2 GS[77] ($p = 0.13$).

Konačno, pozitivnu korelaciju smo pronašli sa nekoliko bitnih onkogenih puteva (eng. *oncogenic pathways*) poput *WNT7B*, *ESR1*, *HER3*, *PIK3CA*, *BRCA1* gena (svi $p < 0.001$), i negativnu korelaciju sa IGF1[81], BetaCatenin, PTEN, MAPK, MYC, RAS, SRC GS[79] i *BRCA2*, *VEGFA*, *CD80*, *CD8A*, *CD3D* i *SQLE* genima (svi, $p < 0.001$) (tabela 11, grafik 12).

Grafik 12: Korelacija ekspresije *iRNK* AR sa individualnim genima i genskim zapisima (eng. gene signatures) od kliničkog interesa, kod svih pacientkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno iz dostupnih setova genske ekspresije

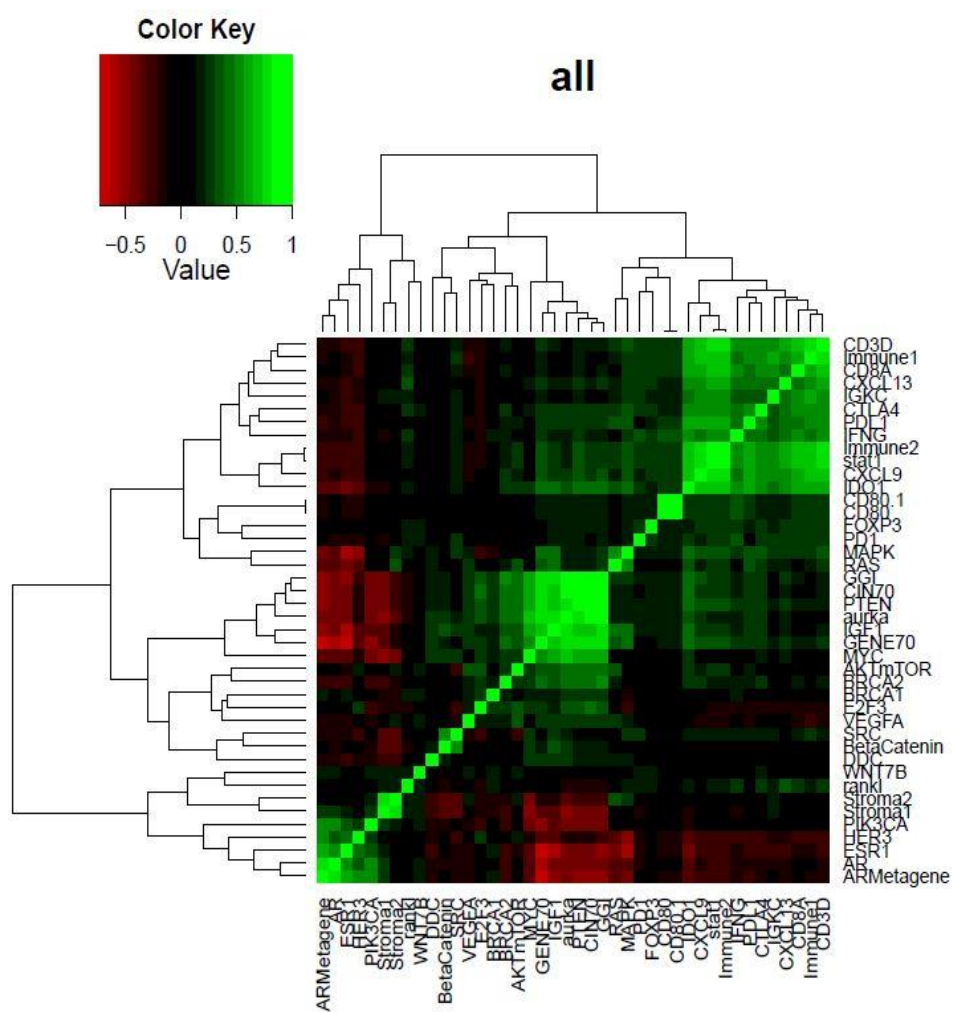


Tabela 11: Korelacija ekspresije *iRNK AR* sa individualnim genima i genskim zapisima (eng. gene signatures) od kliničkog interesa, kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno iz dostupnih setova genske ekspresije

GENSKI ZAPISI / GS	Korelacija	¥p vrednost	*p vrednost
Proliferacija			
GGI[75]	-0,369621923	1,8318E-111	7,8766E-111
AURKA[72]	-0,344294537	1,5713E-101	6,1425E-101
CIN70[73]	-0,346027107	2,77406E-88	9,17575E-88
GENE70[74]	-0,533554026	2,99372E-97	3,1455E-232
Imuni odgovor			
Immune1[76]	-0,11765965	2,64441E-19	4,37344E-19
Immune2[77]	-0,245158598	5,66684E-61	1,52296E-60
INDIVIDUALNI GENI / IG			
Imuni odgovor			
CTLA4	-0,161591958	2,50512E-24	4,68348E-24
IFNG	-0,129932948	3,75882E-12	5,05091E-12
IGKC	-0,115088918	1,08387E-10	1,41231E-10
PD1	-0,100282108	8,12133E-09	9,97764E-09
PDL1	-0,166928285	7,2268E-20	1,24301E-19
IDO1	-0,303635342	2,79292E-68	8,00637E-68
Stroma			
Stroma1[78]	0,154191017	4,89864E-20	8,77672E-20
Stroma2[77]	0,030694123	0,122489418	0,131676124
CXCL9	-0,163092575	1,20849E-27	2,36206E-27
CXCL13	-0,095950324	1,41513E-10	1,78973E-10
Drugi IG i/ili GS			
ESR1	0,517688213	1,6436E-254	1,7668E-253
WNT7B	0,210563901	4,067031E-54	9,71570E-54
HER3	0,431141674	1,0169E-186	7,2879E-186
CD80	-0,117313256	4,1091E-14	5,69972E-14
CD8A	-0,124203743	1,01379E-18	1,61456E-18
CD3D	-0,189612975	6,4974E-48	1,39694E-47
BetaCatenin[79]	-0,162618056	8,88212E-41	1,81872E-40
IGF1[81]	-0,437290968	4,0104E-170	2,4635E-169
PTEN[84]	-0,41560242	1,3376E-122	6,3907E-122
MAPK[82]	-0,38890502	7,3413E-157	3,946E-156
MYC[79]	-0,257205926	1,69921E-48	3,84559E-48
RAS[79]	-0,297594809	6,37209E-92	2,28333E-91
SRC[79]	-0,228046251	2,38894E-69	7,33747E-69
PIK3CA[83]	0,483978486	1,4142E-283	2,027E-282
BRCA1	0,087362067	7,93424E-15	1,17646E-14
BRCA2	-0,099751346	9,89997E-08	1,1825E-07
VEGFA	-0,102373118	7,10173E-05	8,25336E-05
SQLE	-0,14880857	1,14431E-18	1,75733E-18

¥ Wilcoxon p vrednost, * Korigovana eng. *adjusted p* vrednost; IG – individualni geni, GS – genski zapisi, eng. *gene signatures*

4.2.7 Korelacija ekspresije *iRNK AR* sa individualnim genima i genskim zapisima (eng. *gene signature*) kod molekularnih podtipova karcinoma dojke iz dostupnih setova genske ekspresije

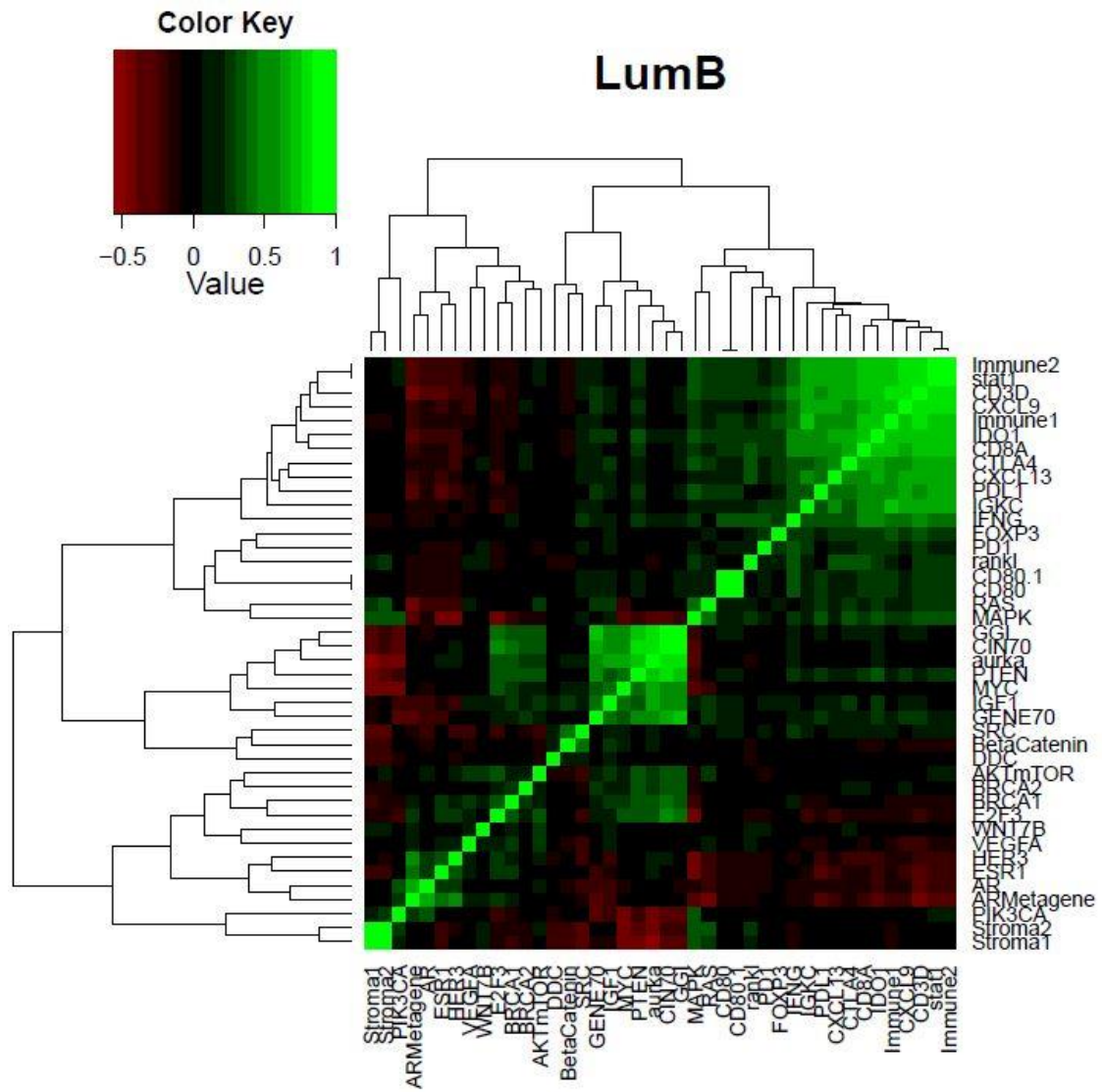
Značajna korelacija ekspresije *iRNK AR* sa individualnim genima i genskim zapisima kod molekularnih podtipova karcinom dojke je prikazana u tabeli 12 i grafikonu 13.

Tabela 12: Korelacija <i>iRNK AR</i> i individualnih gena i genskih zapisa (eng. <i>gene-signatures</i>) kod molekularnih podtipova karcinoma dojke			
GENSKI ZAPISI/GS I individualni geni /IG	Korelacija	¥p-vrednost	*p vrednost
LUMINAL A			
ESR1	0,270065549	7,95785E-08	4,41592E-07
Proliferacija			
GENE70	-0,27577657	4,10768E-08	2,34725E-07
Imuni odgovor			
IGKC	-0,176149147	0,000533878	0,001725668
Stroma			
Stroma1	-0,174509981	0,00060264	0,001909354
Stroma2	-0,108340333	0,034041965	0,069829672
CXCL13	-0,1116944	0,028844826	0,060197897
Ostali individualni geni			
HER3	0,194077817	0,000132285	0,000479219
WNT7B	0,140549726	0,005863634	0,014813392
AKTmTOR	0,253719833	4,86058E-07	2,46887E-06
E2F3	0,115349938	0,023970311	0,051764213
RAS	-0,155936968	0,00220957	0,006238787
LUMINAL B			
ESR1	0,271401012	4,74667E-07	2,42383E-06
Proliferacija			
GGI	-0,118353734	0,030580403	0,063269799
GENE70	-0,294846996	3,99966E-08	2,31305E-07
Imuni odgovor			
Immune1	-0,157831727	0,003830261	0,010129616
Immune2	-0,222481191	4,09102E-05	0,000161509
Imuni odgovor individualni geni			
CTLA4	-0,184706159	0,000693323	0,002147064
IFNG	-0,154366615	0,004690662	0,012040202
IGKC	-0,140812474	0,00997645	0,02364788
PD1	-0,161641274	0,003051192	0,008392964
stat1	-0,222198576	4,1866E-05	0,000164046
Stroma			
CXCL9	-0,160339168	0,003299609	0,008922886

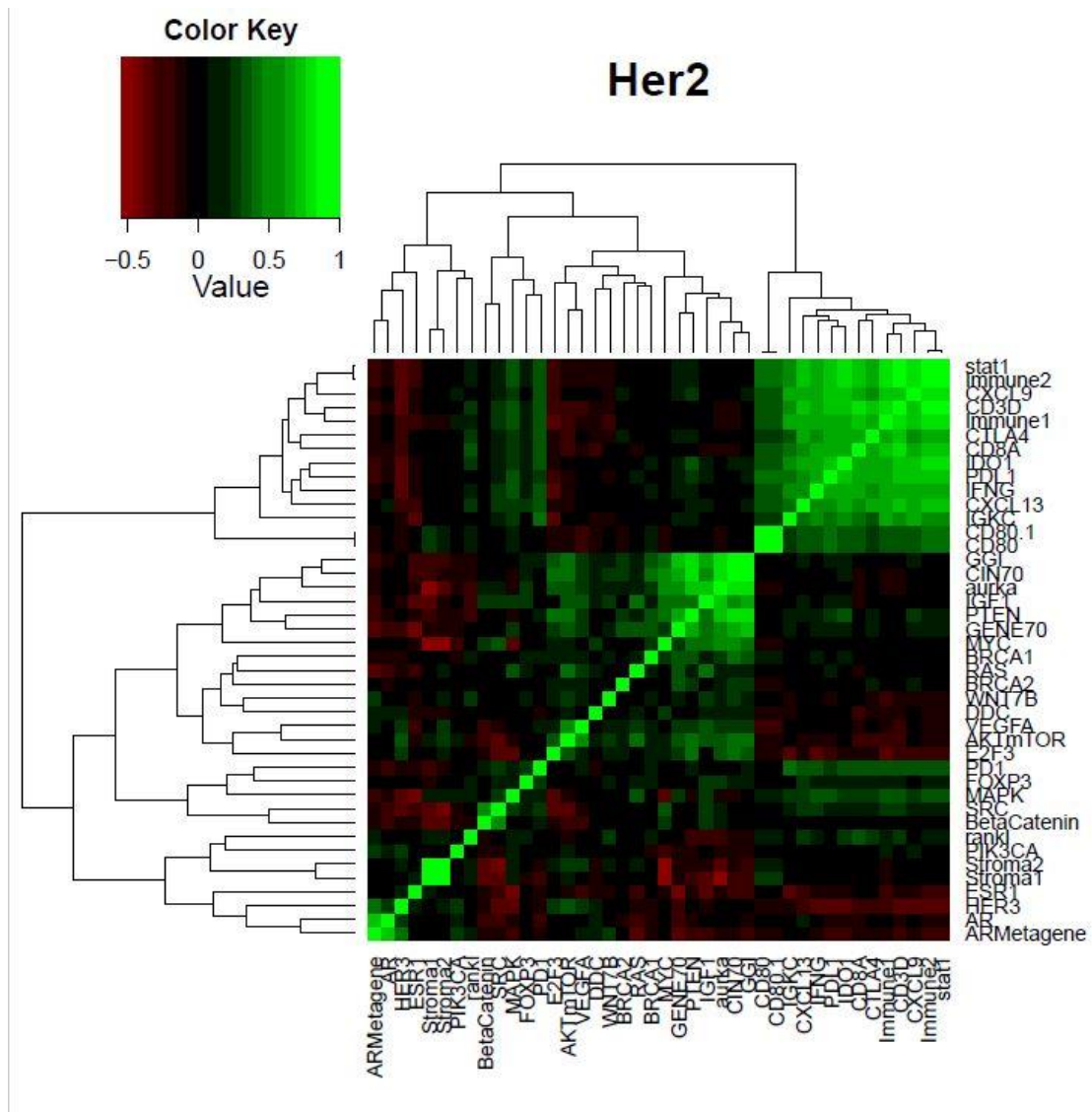
CXCL13	-0,17478419	0,001341066	0,003973528
Ostali individualni geni			
PIK3CA	0,36185165	9,05342E-12	7,18288E-11
HER3	0,29384105	4,46848E-08	2,52338E-07
AKTmTOR	0,131207037	0,016427012	0,037018619
BetaCatenin	-0,138161111	0,011482762	0,026821049
rankl	-0,163926457	0,002655922	0,007408016
IGF1	-0,240937803	8,48541E-06	3,75391E-05
MAPK	-0,145214513	0,007859514	0,019345752
RAS	-0,239489205	9,64528E-06	4,1898E-05
SRC	-0,244606898	6,11193E-06	2,72905E-05
HER2 like			
Proliferacija			
GENE70	-0,258258715	0,000810526	0,002470175
Ostali individualni geni			
PTEN	-0,162905602	0,036560477	0,074360291
MAPK	-0,187156504	0,016079704	0,036321213
BRCA1	-0,197867521	0,010847578	0,025586426
PD1	-0,201880377	0,00931379	0,022353095
BetaCatenin	-0,208137178	0,007303259	0,01811661
RAS	-0,259278718	0,000771358	0,002358293
SRC	-0,290498199	0,000153643	0,000544271
HER3	0,286530602	0,000190637	0,000665496
PIK3CA	0,182997203	0,018638969	0,041516033
DDC	0,175115226	0,024467491	0,052430338
BASAL like			
ESR1	0,194843067	0,003412131	0,009175478
Proliferacija			
GENE70	-0,311208063	2,03252E-06	9,56478E-06
GGI	-0,324048033	7,1522E-07	3,61374E-06
aurka	-0,387223208	1,98947E-09	1,25651E-08
Stroma			
Stroma1	0,31307837	1,75093E-06	8,31728E-06
Stroma2	0,260486709	7,97603E-05	0,000299101
Ostali individualni geni			
HER3	-0,146553147	0,028308147	0,059206582
SRC	-0,150168455	0,024595182	0,052586581
MYC	-0,206963333	0,001845702	0,005273435
E2F3	-0,210846162	0,001504799	0,004404289
IGF1	-0,291105953	9,47619E-06	4,13507E-05
CIN70	-0,304429198	3,46009E-06	1,60468E-05
BetaCatenin	-0,317789591	1,19719E-06	5,83403E-06
PTEN	-0,33755282	2,26088E-07	1,2058E-06
PIK3CA	0,251594868	0,000141311	0,00050244

‡ t-test, p vrednost; * korigovana (eng. *adjusted*) p-vrednost;

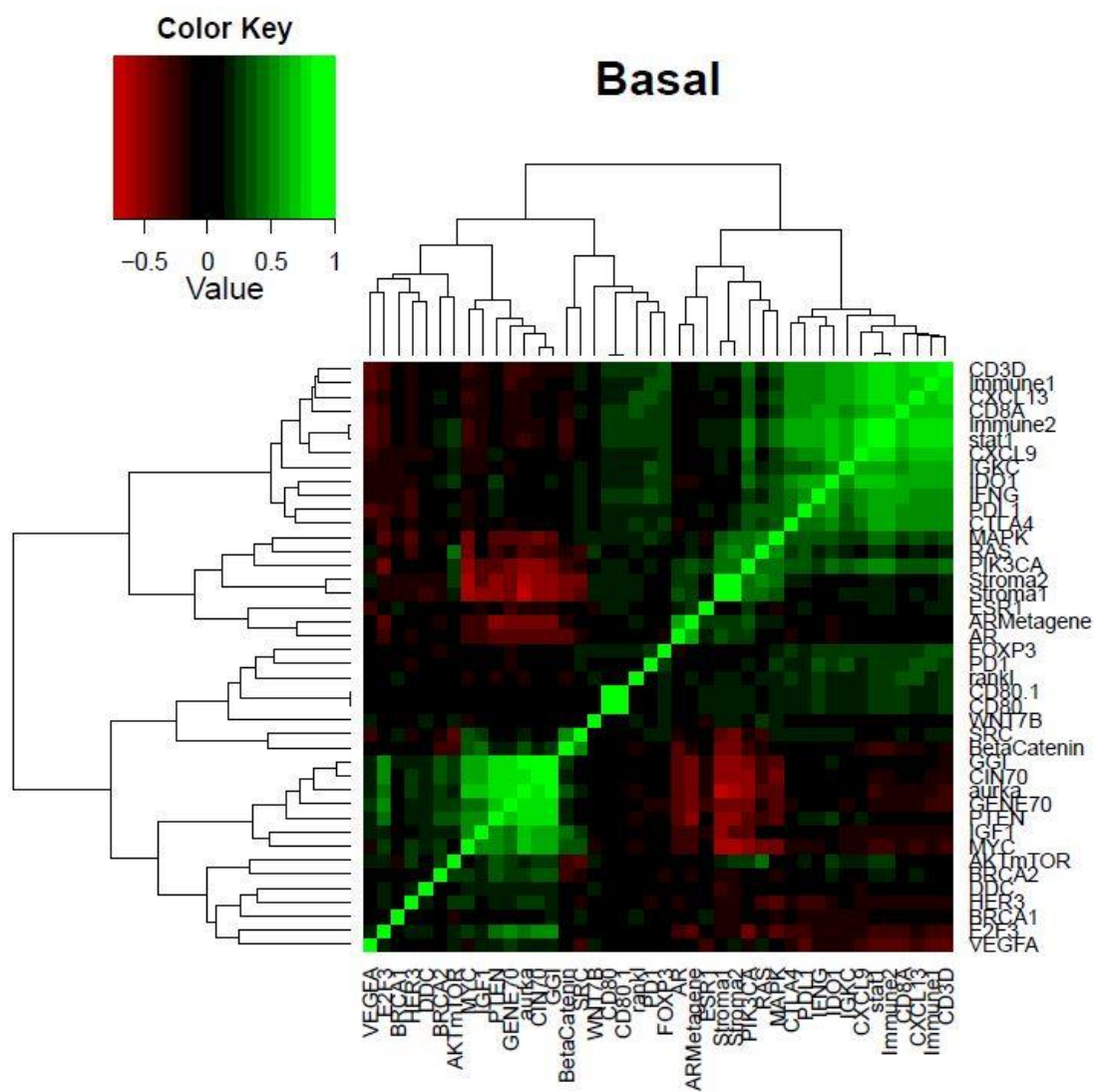
B) Korelacija između ekspresije *iRNK AR* i ekspresije individualnih gena i genskih zapisa od interesa (eng. *gene-signatures*), kod luminal B podtipa



C) Korelacija između ekspresije *iRNK AR* i ekspresije individualnih gena i genskih zapisa od interesa (eng. *gene-signatures*), kod HER2 like podtipa



D) Korelacija između ekspresije *iRNK AR* i ekspresije individualnih gena i genskih zapisa od interesa (eng. *gene-signatures*), kod Basal like podtipa



4.2.8 Odgovor na neoadjuvantnu terapiju u odnosu na ekspresiju *iRNA AR* kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno, kao i u okviru molekularnih podtipova

Želeli smo da ispitamo uticaj ekspresije *iRNA AR* na postizanje patološkog kompletnog odgovora, pCR, na neoadjuvantnu terapiju u sastavu antraciklina, sa ili bez taksana i/ili trastuzumaba, kod svih pacijentkinja zajedno, kao i u okviru molekularnih podtipova definisanih na osnovu PAM50 klasifikatora.

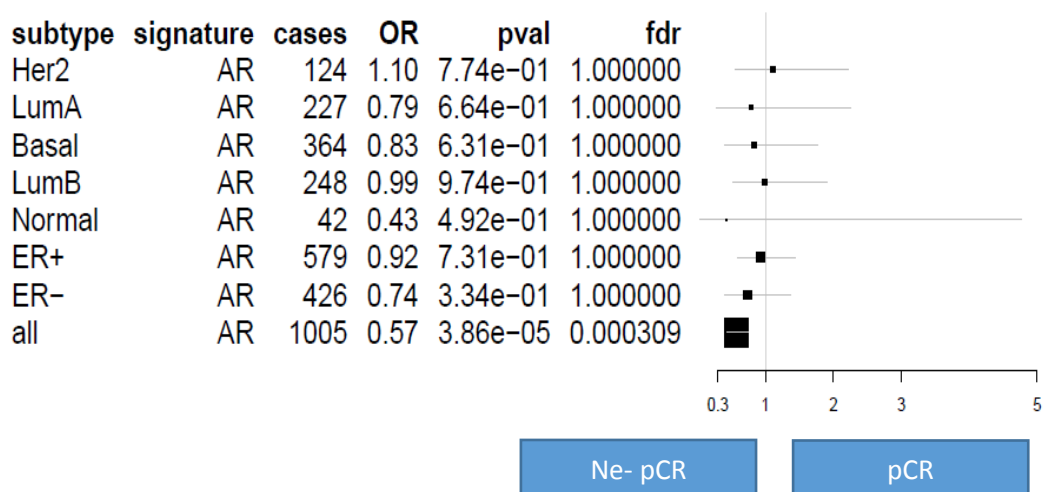
Identifikovali smo 8 setova podataka (eng. *data sets*) [85-90], sa 1005 pacijentkinja čija medijana godina iznosi 49 (tabela 13). Od ukupnog broja identifikovanih pacijentkinja, 235 (23.5%) je postiglo kompletan patološki odgovor pCR, 765 (76.5%) nije postiglo kompletan patološki odgovor, dok je 5 uzoraka bilo nepodobno za analizu (tabela 13). Imunohistohemijske karakteristike tumora pokazuju da je populaciju činilo više ER negativnih tumora u odnosu na ER pozitivne, 556 vs 449, a da je najveći udeo činila populacija ER-HER2-, 414 pacijentkinja (tabela 13).

U univarijantnom modelu ekspresija *iRNA AR*, kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno, ostala je značajna za postizanje nižeg procenta patološkog kompletnog odgovora (pCR OR 0.57, 95%CI 0.44-0.74, $p < 0.001$), ali značajnost iako granična, nije potvrđena u multivarijantnoj analizi, (pCR OR 0.74, 95%CI 0.54-1.01, $p = 0.063$) (Grafik 14 A, B).

Kada je reč o molekularnim podtipovima, ekspresija *iRNA AR* nije se pokazala značajnom za postizanje pCR, kako u univarijantnoj, tako ni u multivarijantnoj analizi za ispitivane molekularne podtipove, luminal A, luminal B, HER2-*like* i Basal-*like* (grafik 14 A i B). Basal-*like* podgrupa je imala najveću zastupljenost sa 364 slučajeva.

Grafik 14: Forest plotovi za univarijantnu i multivarijantnu analizu *iRNA AR* ekspresije i pCR kod svih pacijentkinja zajedno i kod molekularnih podtipova karcinoma dojke

A) Univarijantna analiza



B) Multivarijantna analiza

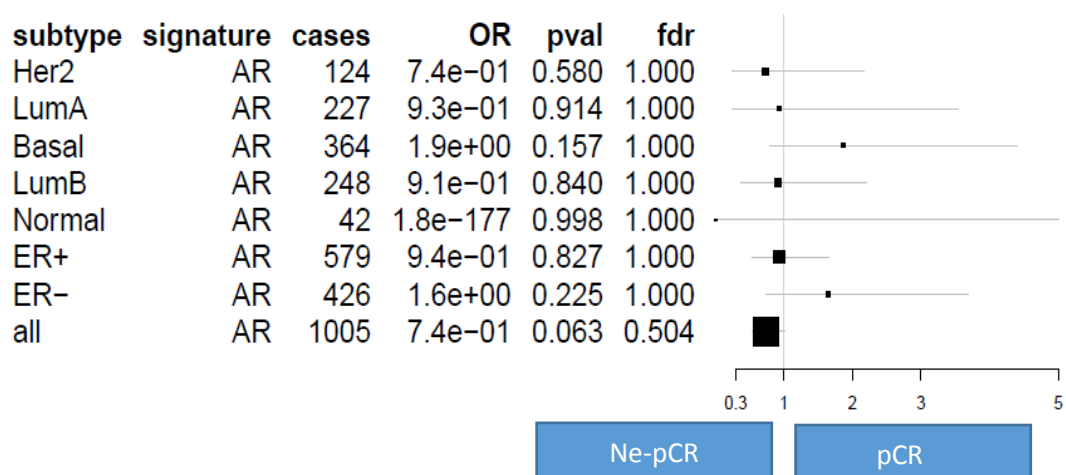


Tabela 13: Neoadjuvantne studije sa karakteristikama pacijentkinja i tumora iz GEO, (eng. *Gene Expression Omnibus*) baze podataka

Setovi podataka	Broj pac.	Godine medijan	ER+	ER -	HER2+	HER2-	HER2 + ER+	HER2 + ER-	HER2- ER+	HER2- ER-	pCR Yes	pCR No
DUKE2 *GSE6861	160	49	42	118	46	114	12	34	30	84	65	95
TOP *GSE16446	114	47	0	114	35	79	0	35	0	79	16	98
MAQC2 MDACC *GSE20194 *GSE25066	269	51	151	118	41	228	16	25	135	93	59	210
PUSZTAI *GSE20271	178	49	103	75	30	148	16	14	87	61	26	152
MAQC3 *GSE22093	82	48	41	41	61	21	35	26	6	15	24	58
USO *GSE23988 *GSE25066	61	47,899	32	29	2	59	1	1	31	28	20	41
ISPY *GSE25066	83	44,8	45	38	2	81	1	1	44	37	14	65
LBJI/INEN/GEICAM *GSE25066	58	47,5	35	23	8	50	2	6	33	17	11	46
ALL	1005	49	449	556	225	780	83	142	366	414	235	765

*referentni brojevi setova podataka (eng. *data sets*) pod kojim se mogu naći u GEO bazi;

ER-estrogen receptor, HER2 – humani epitelijalni faktor rasta 2, pCR patološki kompletni odgovor

5. DISKUSIJA

Naša meta-analiza je uključila 17000 pacijentkinja sa ranim karcinom dojke i može se smatrati jedinom, sveobuhvatnom meta-analizom prognostičke evaluacije androgenog receptora, AR, na nivou proteina, imunohistohemijskom metodom, ili na nivou ekspresije informacione RNK AR, odnosno njegove genske ekspresije, u ranom karcinomu dojke. Na ovako velikom uzorku, ispitali smo i pokazali da je ekspresija AR, bilo na nivou proteina, ili na nivou gena, povezana sa boljim preživljavanjem kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke.

Meta-analizom publikovanih kliničkih studija, u kojima je AR određivan na osnovu IHH analize, pokazali smo da je ekspresija AR bila prediktor boljeg ishoda bolesti, odnosno preživljavanja bez bolesti, DFS, i ukupnog preživljavanja, OS, kada smo analizu sprovedi među svim pacijentkinja sa ranim KD zajedno bez obzira na receptorski status. Ovo se može objasniti povezanošću ekspresije AR sa klinički povoljnim prognostičkim faktorima poput: male veličine tumora[48, 94], niskog gradusa tumora[45, 48, 49, 55], negativnog nodalnog statusa[94], ER i/ili PR pozitivnosti [49] i starije životne dobi[45], koja je opisana u literaturi. Uzevši u obzir da je klinička meta-analiza rađena na osnovu publikovanih kliničkih studija, i da nismo imali uvid u individualne odnosno pojedinačne podatke pacijentkinja, nismo bili u mogućnosti da na osnovu dostupnih rezultata u publikovanim studijama uradimo analizu korelacije proteinske ekspresije AR sa poznatim kliničkim parametrima prognoze bolesti poput veličine tumora, gradusa tumora, nodalnog statusa. Međutim, ovu povezanost smo mogli da ispitamo kroz meta-analizu ekspresije *iRNK AR* koja je u dostupnim setovima podataka imala i podatke o demografskim karakteristikama pacijentkinja i podatke o karakteristikama tumora. Ova analiza je potvrdila da je ekspresija *iRNK AR* u korelaciji sa tumorima malih dimenzija, kao i veću udruženost ekspresije *iRNK AR* kod pacijentkinja starijih od 50 godina. Ista analiza nije pokazala značajnu povezanost u odnosu na ostale prognostičke faktore poput gradusa i nodalnog statusa, kao i ekspresije gena za estrogen, *ESR1* i gena za HER2, odnosno *ERBB2*, tabela 9. Analizom ekspresije *iRNK AR* i njene udruženosti sa poznatim prognostičkim faktorima, kod molekularnih podtipova KD, pokazali smo da je ekspresija

iRNK AR udružena sa ko-ekspresijom *ESR1* i to u svim podtipovima: luminal A i luminal B podtipa, HER2 sličnom i bazalnom tipu sličnom podtipu. Osim pomenute korelacije u luminal A podtipu smo pokazali povezanost ekspresije *iRNK AR* sa tumorima malih dimenzija, dok u luminal B podtipu povezanost sa starijom životnom dobi i nodus negativnom bolešću, tabela 10.

Nedavno je publikovana meta-analiza od strane kanadskih autora, koja je takođe, ispitivala ulogu AR u ranom karcinomu dojke[95]. Vera-Badillo i koautori su analizirali 19 kliničkih studija sa 7.693 pacijentkinja sa ranim KD, evaluirajući dva cilja, DFS i OS nakon 3 i 5 godina praćenja, u odnosu na ekspresiju AR definisanog IHH analizom. Prvo, ova analiza je pokazala da je AR eksprimiran u 61% celokupne ispitivane populacije pacijentkinja sa karcinomom dojke, sa višom zastupljenošću AR pozitivnih tumora kod ER pozitivnih u odnosu na ER negativne tumore, 75% vs 32%. Drugo, kao i naša meta-analiza, i kanadska meta-analiza je pokazala da je ekspresija AR udružena sa boljim ishodom bolesti, DFS i OS, u ranom KD. Autori, za razliku od naše analize, nisu ispitivali ulogu *iRNK AR* kao prognostičkog faktora u ranom karcinomu dojke.

Kao jedina u literaturi, za sada, ova genomska meta-analiza, koja je obuhvatila 7737 pacijentkinja, takođe je potvrdila podatke iz kliničke meta-analize, pokazavši da visoka ekspresija *iRNK AR* jeste faktor boljeg ishoda bolesti u vidu dužeg preživljavanja bez bolesti i ukupnog preživljavanja, kod svih pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke zajedno.

Karcinom dojke je izrazito heterogena bolest u odnosu na molekularne alteracije i ćelijski sastav, kao i prognozu bolesti, odnosno klinički ishod, što predstavlja izazov u razvoju tumorske klasifikacije koja bi bila klinički korisna. Profil genske ekspresije svakako je značajno pomogao u sagledavanju ove kompleksnosti, ali i obezbedio šire prognostičke informacije u odnosu na standarne kliničke informacije[71]. Molekularni podtipovi karcinoma dojke, luminal A, luminal B, HER2-like i basal-like su ekstenzivno ispitivani kroz analize eng. *microarray-a* kao i analize hijerarhijskog grupisanja eng. *hierarchical clustering*[2, 96, 97]. Danas postoji nekoliko multigenskih testova ekspresije u ranom karcinomu dojke poput 21-genski skor za eng. *21-gene recurrence score* [98](Oncotype DxW, Genomic Health Inc, Redwood City, CA,

www.oncotypedx.com), 14-genski zapis udaljenih metastaza, eng. *14-gene distant metastasis signature*[99] (BreastOncPx™, US Labs, Irvine, CA, www.uslabs.net), 97-genski prediktor histološkog gradusa eng. *97-gene histologic grade predictor* [75](MapQuant Dx™ Genomic Grade, Ipsogen, Marseilles, France and New Haven, CT, USA, www.ipsogen.com) i eng. *70-gene prognosis signature* [100](MammaPrintW, Agendia, Irvine, CA, www.agendia.com). Ono što je zajedničko za sve ove testove je činjenica da je najsnažnija varijabla u određivanju prognoze kod ER pozitivnih tumora proliferacija. U 2009.god. Parker i autori su izveli minimalni set gena tzv. PAM50 za klasifikovanje eng. *intrinsic* podtipova karcinoma dojke[71]. PAM50 genski klasifikator pokazuje visoku podudarnost u klasifikaciji podtipova karcinoma dojke u poređenju sa širim eng. *intrinsic* genskim setovima i danas se sve češće koristi. Međutim, u kliničkoj praksi se i dalje rutinski koriste surogatni podtipovi karcinoma dojke na osnovu panela imunohistohemijskih markera. Međutim, pokazano je da eng. *intrinsic* podtipovi jesu nezavisni prediktori preživljavanja kada se u multivarijantnim analizama ispituju sa ostalim faktorima prognoze u ranom karcinomu dojke[71, 101].

Iz navedenih razloga, ispitali smo prognostičku relevantnost ekspresije AR među podgrupama karcinoma dojke koje smo definisali različito; u kliničkoj meta-analizi na osnovu IHH, a u genomskoj meta-analizi na osnovu PAM50 klasifikatora genske ekspresije. U kliničkoj meta-analizi podgrupe karcinoma dojke su zadate i definisane od strane samih autora i to na osnovu imunohistohemijske analize, IHH, proteinske ekspresije tri biomarkera koji se koriste rutinski u svakodnevnoj kliničkoj praksi: estrogenski receptor, ER, progesteronski receptor, PR, humani epidermalni faktor rasta, HER2. Na osnovu dostupnih podataka, u podobnim kliničkim studijama, definisali smo četiri podgrupe pacijentkinja i to: estrogen receptor pozitivne, ER+; estrogen receptor negativne, ER-; humani epidermalni faktor rasta pozitivne, estrogen receptor negativne, HER2+/ER- i trostruko negativne, TN (ER-PR-HER2-) podgrupa.

Pokazali smo da u podgrupi ER pozitivnog karcinoma dojke androgeni receptor ima ulogu dobrog prognostičkog faktora, kako u univarijantnoj tako i u multivarijantnoj analizi, što je u skladu sa prethodno publikovanim studijama [40, 45, 47, 52, 91, 92]. Osim toga rezultati dobijeni na predkliničkim modelima, poput kultura

tumorskih ćelija i ksenografskim modelima, idu u prilog ovom nalazu, jer ukazuju na postojanje AR-ER ukrštene komunikacije i interakcije, ukazujući da androgeni receptor može antagonizovati ili agonizovati delovanje estrogenog receptora u zavisnosti od više faktora, a najvažnije odnosa između ova dva receptora, menstrualnog statusa i hormonskog miljea[22].

Smatra se da kod ER pozitivnog karcinoma dojke AR signalizacija može da antagonizuje proliferativni efekat ER signalizacije kroz nekoliko pretpostavljenih mehanizama[102, 103]: 1) AR direktno inhibira ciljne gene za ER; 2) AR je u konkurenciji sa ER za vezivanje za estrogen responsivne elemente, čime prevenira transkripciju ER zavisnih gena; 3) AR vezuje i izoluje faktore transkripcije, TFs, koji potom više nisu dostupni za transkripciju ER gena; 4) AR utiče na ushodnu regulaciju, tj. povećava reaktivnost i broj, ER β receptora koji inhibiraju rast i invazivnost ER α -pozitivnih ćelija karcinoma dojke[104], 5) AR indukuje apoptozu kroz nishodnu regulaciju genske ekspresije ciklin D1 gena[105]. Međutim, neke ćelijske linije karcinoma dojke poput MCF-7 (estrogen receptor pozitivni podtip karcinoma dojke) i MDA-MB-453 (apokrini podtip karcinom dojke koji je uglavnom ER negativan), su stimulisane u rastu posredstvom androgena, a inhibirane anti-androgenima[106, 107].

Shodno nedavno predloženoj teoriji pod nazivom eng. "*androgen excess theory*", povećana androgena aktivnost je jedna od najvažnijih hormonskih abnormalnosti viđena kod pacijentkinja bilo sa estrogen receptor pozitivnim ili negativnim karcinomom dojke[19]. Ova teorija sugerira da androgeni mogu stimulisati ER pozitivni KD i to povećanom konverzijom androgena u estrogene u okviru samog tumorskog tkiva. Zabeležena je 20 puta viša koncentracija estradiola u tumorskom tkivu nego u cirkulaciji, nalaz koji može da ukazuje na intenzivnu lokalnu proizvodnju hormona (intrakrina funkcija dojke), s obzirom na to, da su androgeni prekursori u visokoj koncentraciji nađeni u tumorskom tkivu. Prema ovoj teoriji estrogen receptor negativni tumori takođe mogu biti stimulisani preko androgene aktivnosti i to u zavisnosti od nivoa testostosterone bilo preko EGFR aktivacije, ili direktne stimulacije preko androgenog molekularnog puta[19].

Kada je reč o ulozi androgenog receptora u ER negativnom karcinomu dojke, nismo pokazali kliničkom meta-analizom da ekspresija AR značajno utiče na ishod bolesti, odnosno ova podgrupa pacijentkinja imala je lošije preživljavanje koje nije dostiglo statističku značajnost (DFS HR 0.33, 95%CI 0.04-2.44, OS HR 1.32 95%CI 0.98-1.80, tabela 6). Međutim, za razliku od naše, meta-analiza kanadskih autora je pokazala bolje preživljavanje u grupi pacijentkinja sa ER negativnom bolešću[95]. Jedno od mogućih objašnjenje ovih rezultata je činjenica da su u svoju analizu autori uključili, kada je reč o ER- podgrupi pacijentkinja, ukupno 6 studija [45, 46, 48, 49, 52, 108] u poređenju sa 4 studije uključene u našu analizu [46, 52, 54, 108]. Ovo stoga što kanadski autori nisu imali restrikcije za uključanje kliničkih studija u meta-analizu za razliku od naše analize u koju nismo uključili studije sa značajnom heterogenošću i neadekvatnom metodologijom. Drugi mogući razlog heterogene uloge AR u ER negativnim tumorima, je različita definicija ER negativnih karcinoma dojke u uključenim kliničkim studijama. Naime, treba razmotriti da li je uzet u obzir status progesteronskog receptora, kao i status HER2 receptora, s obzirom na to da njihovo prisustvo sušinski menja tok i prognozu bolesti i u poseban kontekst stavlja prognostičku ulogu AR.

Dodatno smo ispitali i prognostičku relevantnost pozitivnog AR među molekularnim podtipovima karcinoma dojke koje smo definisali pomoću PAM50 molekularnog klasifikatora u okviru transkriptomске meta-analize. Analiza preživljavanja i prognostičke uloge *ARNK* kod luminalnih podtipova KD nije pokazala razliku u odnosu na nivo ekspresije AR. Luminal A podtipovi karcinoma dojke su inače tumori niske proliferacije, visoke adicije na estrogen i progesterone, indoletnog prirodnog toka bolesti, niskog rizika za relaps i odlične prognoze bolesti. Različitu prognostičku ulogu AR kod IHH definisanog ER pozitivnog karcinoma dojke, u odnosu na luminalne podtipove kod kojih AR nije imao prognostičku ulogu, možemo objasniti heterogenošću ispitivane populacije, kao i saglasnošću IHH klasifikacije i klasifikacije tumora na osnovu genske ekspresije. Studije, koje su ovu problematiku ispitivale, pokazale su nepotpuno preklapanje tumorskih podtipova definisana na ova dva različita načina. Najviši stepen preklapanja je uočen kod hormon receptor pozitivnih tumora. Naime estrogen receptor pozitivnost određena na osnovu IHH pokazuje snažnu povezanost sa luminalnim podtipovima, u čak 92%, dok kod estrogen receptor

negativnih tumora svega 75% je klasifikovano u HER2-*like* i *basal-like* tumore[109]. Oko 60-70% tumora, koji su IHH imali ER-/HER2+, bili su klasifikovani kao HER2-*like*[71, 109], dok je IHH TN karcinom dojke na osnovu genske ekspresije klasifikovan na *basal-like* (57%) i HER2-*like* (30%)[109]. Svakako da ova delimična nepodudarnost između IHH i genskom ekspresijom određenih podtipova ima svoj značaj kada je reč o kliničkom prosuđivanju i terapijskoj koristi.

U HER2 pozitivnom podtipu karcinoma dojke, kliničkom meta-analizom, koja je uključila 358 pacijentkinja u tri kliničke studije [35, 40, 49], pokazali smo lošije preživljavanje pacijentkinja sa ekspresijom AR. Ovi tumori su određivani na osnovu IHH analize i ujedno su bili i estrogen receptor negativni. Literaturni podaci ukazuju na lošije preživljavanje kod pacijentkinja sa ranim KD čiji su tumor bili HER2+ [35], HER2+ER- [49], a ujedno i AR pozitivni. Kod HER2 pozitivnog KD, u odsustvu ekspresije estrogena, postoje jaki dokazi da androgena signalizacija ima proliferativnu ulogu[103]. Biološka osnova ove interakcije između HER2 receptora i AR je proučavana na nivou ćelijskih linija, ukazujući da se onkogeni uloga AR u HER2+ER- tumorima može ostvariti kroz nekoliko mehanizama: 1) AR direktno pozitivno reguliše WNT7B ekspresiju, dovodeći do WNT/ β -catenin aktivacije; nuklearna translokacija aktiviranog β -catenina, u saradnji sa AR, stimuliše gensku transkripciju HER3; posledično, HER3 formira heterodimere sa HER2 i modulira PI3K/AKT signalni put, promovirajući ćelijsku proliferaciju[24]; 2) AR, preko PI3K/AKT aktivacije uzrokovane HER2/HER3 heterodimerima, fosforiliše MAD1 koji je MYC-ov represor transkripcije, promovirajući njegovo odvajanje od MAX-a koji čini obavezni partner MYC-a; bez kompeticije sa MAD1, MYC formira heterodimere sa MAX-om koji se vezuju za transkripciona mesta, koja promoviraju ćelijsku proliferaciju[24, 110]; 3) AR indukuje disocijaciju represornog transkripcionog faktora TCF7L2 od FOXA1, promovirajući transkripciju AR ciljanog gena, MYC-a, sa mitogenom aktivnošću[24]; 4) AR indukuje ErbB2 ekspresiju, koja aktivira ERK, čija aktivacija promovira proteinsku aktivnost cAMP responsivnih elemenata, uključujući ekspresiju AR i stvaranje ERK-AR pozitivne povratne sprege[103]. Ovo pokazuje da je dalje ispitivanje AR kod HER2+ER-KD opravdano i da opravdava ispitivanje klinički dostupnih anti-androgena u ovoj podgrupi pacijentkinja, najčešće u kombinaciji sa anti-HER2 terapijom [24].

Sa druge strane i u kontrastu sa ovom kliničkom meta-analizom, meta-analiza genske ekspresije *iRNK AR* je pokazala značajno bolje ukupno preživljavanje kod HER2-*like* tumora i to u analizi koja je obuhvatila sve pacijentkinje zajedno, odnosno lečene i nelečene, kao i u podgrupi pacijentkinja HER2 sličnih tumora koje su lečene samo hormonskom terapijom. Činjenica da su neki od ovih tumora, koji su na osnovu genske ekspresije klasifikovani kao HER2-*like*, a u rutinskoj kliničkoj praksi lečeni hormonskom terapijom, govori u prilog činjenici da se među molekularnim HER2-*like* podtipovima, a na osnovu IHH analize, nalaze i hormon receptor pozitivni tumori. Heterogenost populacije i nepotpuno preklapanje pacijentkinja na osnovu IHH analize kao i analize genske ekspresije, barem delimično može objasniti razlike u dobijenim rezultatima kliničke i genomske meta-analize.

Takođe, ispitali smo prognostičku ulogu AR kod naročito agresivnog podtipa karcinoma dojke tzv. trostruko negativnog ili eng. *triple* negativnog fenotipa. Rezultati kliničke meta-analize su pokazali da u podgrupi pacijentkinja, koji su na osnovu IHH analize definisani kao TN, ekspresija AR ima ulogu boljeg faktora preživljavanja bez bolesti kao i ukupnog preživljavanja. Ova uloga dobrog prognostičkog faktora se pokazala značajnom samo u univarijanoj analizi, što potvrđuje rezultate ranije publikovanih studija [37, 45, 48, 49, 91]. Neke od ovih studija su pokazale kod TN fenotipa negativnu korelaciju između Ki67 markera ćelijske proliferacije i ekspresije AR[3, 111], ukazujući da kod visoko proliferativnih tumora, sa visokim indeksom proliferacije, odnosno $ki67 \geq 30\%$, nivo ekspresije AR je nizak i obrnuto. Sa druge strane nekoliko publikovanih studija nije potvrdilo vezu između AR i ki67 markera proliferacije[40, 46, 52].

Meta-analiza genomske ekspresija *iRNK AR* nije pokazala prognostičku značajnost kod basal-*like* podtipa. Od ukupnog broja bazalnom podtipu sličnih tumora, svega 13, odnosno 14 pacijentkinja imalo je visok nivo ekspresije *iRNK AR*. Velika većina basal-*like* tumorskih uzoraka bilo je negativno na ekspresiju AR. Nedavni rezultati objavljene studije ukazuju da je basal-*like* podtip KD mnogo kompleksniji nego što smo do sada percipirali, da pokazuje ekstenzivnu heterogenost, te da se u okiru njega mogu izdvojiti najmanje 7 podtipova i da je dalje ispitivanje njegove heterogenosti

neophodno[3]. Ista studija je podelila *basal-like* podtip na sledeće podtipove: *basal-like 1* i *basal-like 2* obogaćeni signalnim putevima koji učestvuju u ćelijskom ciklusu i odgovoru na DNK oštećenja; imunomodulatorni podtip obogaćen genima koji učestvuju u imunim ćelijskim procesima; mezenhimal i mezenhimal *stem-like* podtip obogaćen signalnim putevima za ćelijsku mobilnost, kao i putevima za epitelno–mezenhimalnu tranziciju i putevima za faktore rasta; luminal AR (LAR) podtip (prethodno u literaturi nazivan molekularni apokrini podtip) sa profilom ekspresije gena koji imitiraju luminalni podtip uprkos negativnosti za ER, i obogaćen hormone-regulisanim signalnim putevima, uključujući i puteve za steroidnu sintezu i visoku ekspresiju AR[3, 112].

Sa druge strane predklinički podaci sugerišu da AR može dovesti do progresije u nekim podtipovima TNKD[112]. In vitro studije su pokazale da aktivacija AR može smanjiti efikasnost hemioterapije kod LAR podtipa preko AR-uzrokovane regulacije transkripcije apoptotičkih gena, sugerišući korist od kombinacije hemioterapije i AR blokade[113].

Prvi klinički podaci o upotrebi androgena u lečenju uznapredovalog karcinoma dojke potiču još od 1939.god.[114], a potvrđeni su i nedavnom studijom kod pacijentkinja sa metastatskim hormon receptor pozitivnim karcinomom dojke koje su lečene testosteronom i kod kojih je odgovor zabaležen u 17% pacijentkinja sa prosečnim trajanjem od 19 meseci[115].

Konačno u našem istraživanju smo ispitivali korelaciju između *iRNK* i drugih gena i genskih zapisa od interesa. Shodno literaturnim podacima, a i u korelaciji sa kliničkim podacima, ekspresija AR je u pozitivnoj i snažnoj korelaciji sa ekspresijom *ESR1* genom, odnosno genom za ekspresiju estrogena. Pozitivnu korelaciju smo pokazali i sa ekspresijom *PIK3CA* gena koji je nedavno predložen kao moguća klinička meta za dalje ispitivanje u kombinaciji sa antiandrogenima kod AR pozitivnih trostruko negativnih karcinoma dojke [116]. Druge pozitivne korelacije od interesa, koje smo pokazali u našem istraživanju, su korelacije AR sa *HER3* i *WNT7B* genima, a nedavno objavljeni rad pokazao je molekularnu osnovu za ovu visoku korelaciju između njih[24]. Na kraju, povezanost AR i *BRCA1* pokazana je ranije i zahteva dalje ispitivanje[117].

Androgeni receptor cilja puno gena, ali znanje o njihovoj ulozi u različitim podtipovima KD je ograničeno. Visoko eksprimirani geni u LAR podtipu TNKD su geni uključeni u sintezu masnih kiselina i lipida, sintezu steroida, kao i u metabolizam androgena i estrogena. Ovo uključuje brojne AR nishodne ciljeve i ko-aktivatore poput DHCR24, ALCAM, FASN, FKBP5, APOD, PIP, SPDEF and CLDN8 i luminalne gene poput FOXA1, KRT18 and XBP1[3]. Istraživanje AR-transkripcione mreže na ćelijskim linijama različitih podtipove KD pokazalo je obogaćenost genima uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa i mitoze, metabolizam glukoze, proteina, nukleozida i homeostazu kiseonika[25].

Ispitali smo potencijalni uticaj ekspresije *iRNK* AR na postignuti patološki odgovor nakon primene neoadjuvantne sistemske terapije, kod svih pacijentkinja zajedno, kao i u okviru molekularnih podtipova karcinoma dojke. Iako je univarijantna meta-analiza pokazala da ekspresija *iRNK* AR negativno utiče na postizanje patološkog kompletnog odgovora, značajnost nije dostignuta u multivarijantnoj analizi, kao ni u ispitivanim molekularnim podtipovima (grafik 8, tabela 13). Brojne studije do sada su pokazale da je hormon receptor pozitivnost jedan od najjačih negativnih prognostičkih parametara za postizanje kompletnog patološkog odgovora[93, 118]. Androgen receptor u našem istraživanju se ponaša slično; jeste prediktor nižeg kompletnog patološkog odgovora u univarijantnoj analizi. GepartTrio studija je koristila prospektivno prikupljene uzorke u okviru pomenutog kliničkog ispitivanja, a ekspresija AR je učinjena na 673 TMA (eng. *tissue microarray*) uzorka od core biopsije, na osnovu IHH. Sve pacijentkinje su imale primarni karcinom dojke i bile su lečene sa dva ciklusa neoadjuvantne terapije TAC (taksotera, antraciklin, ciklofosfamid), a potom u zavisnosti od kliničkog odgovora, pacijentkinje su dalje primale istu ili različitu terapiju TAC vs kapecitabin i vinorelbin (KV)[49]. Pacijentkinje kod kojih je zabeležen rani odgovor nakon 2 ciklusa TAC HT bile su randomizovane na grupu koja je primala još 4 ciklusa TAC HT, ili još 6 ciklusa TAC HT, dok pacijentkinje kod kojih nije zabeležen odgovor nakon 2 ciklusa HT, randomizovane su na grupu koja je primila 4 ciklusa TAC, ili 4 ciklusa KV HT. Ova studija je pokazala da je, kod pacijentkinja sa AR pozitivnim tumorima, zabeležen manji procenat patološkog kompletnog odgovora, pCR u poređenju sa pacijentkinjama čiji su tumori bili AR negativni, 12.8% vs 25.4%, $p < 0.0001$. Međutim, pokazano je da ipak AR pozitivni tumori, uprkos tome što imaju manji procenat pCR, postižu značajno bolje preživljavanje bez

bolesti, DFS eng. *disease free survival* kao i ukupno preživljavanje, OS eng. *overall survival*[49]. Štaviše, AR, ER i HER2 su bili nezavisni prediktori za postizanje pCR u multivarijantnoj analizi[49]. Kada je analiziran patološki kompletni odgovor, u odnosu na podtipove karcinoma dojke, koji su određeni na osnovu IHH parametara, autori su pokazali da je AR pozitivnost kod svih podtipova karcinoma dojke, HR+ i HER2+ bila udružena sa malim procentom postignutog pCR, iako ove razlike nisu bile statistički značajne. U istom istraživanju, ekspresija AR je bila najniža u podgrupi pacijentkinja sa TN KD, nije bila povezana sa pCR, ali jeste bila faktor bolje prognoze bolesti, DFS i OS. U studiji, koja je uključila 130 pacijentkinja, koje su lečene neoadjuvantnom sekvencijalnom terapijom, antraciklini-taksani, TNKD je određen na osnovu genske ekspresije po Lehmann-u i autorima[3]. TN KD se pokazao nezavisnim prediktorom pCR ($P = 0.022$), sa najvišim procentom pCR kod *basal-like 1* podtipa (52%) i najnižim kod *basal-like 2* (0%) i luminal androgen podtipa, LAR (10%)[119]. Važno je napomenuti da je LAR podtip imao najbolji ishod bolesti i preživljavanje, iako najniži procenat pCR. Nedavno objavljena studija koja je ispitivala uticaj AR na pCR kod 177 pacijentkinja lečenih neoadjuvantnom hemioterapijom, FAC (fluorouracil, doksorubicin i ciclofosfamid) 4 ciklusa, potom 12 nedeljnih paclitaksela, potvrdila je nizak procenat AR kod TNKD, kao i negativan efekat ekspresije AR na postizanje pCR, ali za razliku od prethodnih rezultata pokazala je da ekspresija AR kod TNKD bila udružena sa lošijim ishodom bolesti, odnosno lošijim DFS[120]. Ovo istraživanje je imalo najvišu zastupljenost ER-HER2-(IHH) 414 pacijentkinja, kao i *basal-like* podtipa KD, 364 pacijentkinja, kod kojih se ekspresija AR nije pokazala značajnom za postizanje pCR.

Ovo istraživanje ima svoja ograničenja koja treba istaći. Naime, studije, koje su uključene u kliničku meta-analizu, imaju izvesne metodološke nedostatke koje smo detaljno ispitali kroz REMARK kriterijume i na osnovu toga sve studije su rangirane po kvalitetu metodološke izrade. Kao najznačajniji parameter, po kome su se kliničke studije međusobno razlikovale, je svakako populacija ispitivanih pacijentkinja, iako su sve studije isključivo ispitivale pacijentkinje sa ranim karcinomom dojke. Međutim, pacijentkinje nisu bile ujednačene u odnosu na klinički stadijum, godine starosti, menstrualni status, medijane praćenja, kao i u odnosu na važne prognostičke faktore poput veličine tumora, broja zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova, gradusa tumora,

receptorskog statusa. Grupe su se, takođe, razlikovale i na osnovu primenjene terapije. Naime, sve pacijentkinje su lečene operativno ali je razlika postojala u odnosu na sprovedenu zračnu terapiju, kao i sistemska terapiju, hormonoterapija sa ili bez hemioterapije. Iz tog razloga nismo bili u mogućnosti da ispitamo povezanost ekspresije AR u odnosu na poznate prognostičke faktore uzevši u obzir prisutnu heterogenost populacije. Ovo pitanje smo mogli da obradimo u populaciji pacijentkinja sa dostupnim podacima genske ekspresije i kliničkim ishodom bolesti. Treba, takođe, napomenuti da su kliničke studije međusobno bile različite u odnosu na metodologiju ispitivanja AR pozitivnosti. Do danas, AR se ne određuje rutinski u tkivu karcinoma dojke, s obzirom na to da anti-androgeni, ali i androgeni, još uvek nemaju kliničku primenu u lečenju karcinoma dojke. S obzirom na navedeno, način ispitivanja AR metodom IHH nije standardizovan i većina studija se međusobno razlikovala po načinu određivanja AR, korišćenju metodologiji, uključujući i antitela, kao i granicu eng. *cut-off* od koje je nivo ekspresije AR smatran pozitivnom vrednošću. Iako je broj pacijentkinja uključenih u kliničku meta-analizu bio zadovoljavajući, oko 8000 pacijentkinja, treba uzeti u obzir da je većina studija bila retrospektivna, pojedine sa malim brojem pacijentkinja ispod 100 i heterogenom populacijom. Kada je reč o genomske meta-analizi, i ona ima svoja ograničenja. Radi se o dostupnim setovima genske ekspresije koji mogu biti "obogaćeni" visoko ekspimiranim genima [121]. Osim toga, ne postoji niti jedna studija do sada koja se bavila korelacijom između AR određenog IHH, u odnosu na nivo ekspresije *iRNK AR*, znajući da smo za svrhu ovog istraživanja pristupili tri nivoa ekspresije *iRNK AR*, nizak, srednji i visok nivo ekspresije.

Uzevši u obzir pomenuta ograničenja, dalja istraživanja vezana za ulogu AR u različitim podtipovima karcinoma dojke, definisanih IHH, kao i genskom ekspresijom, su neophodna radi boljeg razumevanja uloge AR u kancerogenezi karcinoma dojke. Oprez je neophodan kod poređenja podataka kliničke i genomske meta-analize s obzirom na to da ove dve analize ne moraju da klasifikuju iste tumore u iste podgrupe, a u prilog tome govori i podatak da publikovani podaci sugerišu umereno preklapanje između imunohistohemijske analize AR IHH i transkripcione analize, odnosno transkripcionog profila [22].

Poslednjih godina analozi androgena, ali i inhibitori androgena, predmet su intenzivnog ispitivanja u karcinomu dojke, najpre kod trostruko negativnog[122], ali i kod ER pozitivnog[123, 124], kao i HER2 pozitivnog karcinoma dojke[125]. Trenutno više kliničkih studija faze II je u toku, koje ispituju ulogu androgena, ili inhibitora androgena, samostalno, ili u kombinaciji sa hormonskom terapijom, anti-HER2 terapijom, ili drugom ciljanom terapijom poput PIK3CA inhibitora, CK4/6 inhibitora (NCT02000375, NCT02067741, NCT00755885, NCT01990209).

Osim toga, od posebnog je interesa uloga AR u populaciji muškaraca sa karcinom dojke. Trenutno je aktuelan međunarodni program u kojem učestvuje i Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, koji se fokusira na biologiju tumora dojke kod muškaraca, sa ciljem ispitivanja više bioloških markera, od kojih je jedan i AR[126].

Predloženo istraživanje se svojim ciljevima i tezama uklapa u savremeni trend istraživanja bioloških osnova karcinoma dojke. Činjenica o aktuelnosti teme govore i dve nedavno objavljene meta-analize [95, 127] o ulozi AR u ranom karcinomu dojke. Ne samo kod nas, već i u svetski priznatoj naučnoj literaturi ovo je prva i za sada jedina studija koja se bavi sveobuhvatnom kliničkom i genomskom analizom AR u ranom karcinomu dojke. Za razliku od dve skorije objavljene meta-analize o ulozi AR u ranom karcinomu dojke, naše istraživanje je obuhvatilo i meta-analizu ekspresije *iRNK* AR u tumorskom tkivu dojke kod pacijentkinja kod kojih su dostupne i informacije o kliničkom ishodu bolesti. Prava prognostička uloga AR u KD može se pravilno razumeti ispitivanjem onkogene funkcije AR u različitim podtipovima KD.

Istraživanje AR ima naučni doprinos prvenstveno u daljem razdvajanju podtipova karcinoma dojke i definisanju novih meta odnosno ciljeva u lečenju karcinoma dojke u uslovima kada su anti-androgeni lekovi klinički dostupni. Androgeni receptor, kao i drugi potencijalni biomarkeri, mogu se smatrati klinički korisnim jedino ako poznavanje njihovog statusa promoviše promene u lečenju u rutinskoj kliničkoj praksi, koje dovodi do boljeg ishoda bolesti pacijentkinja. Sa druge strane prednosti nove tehnologije su neosporne. U eri multigenских panel testova, sa mogućnošću sekvenciranja stotine gena u istoj analizi, u relativno kratkom vremenskom periodu, od svega nedelju

dana, sa cenom koja postaje prihvatljiva, ostaje da se utvrdi njihova klinička primenljivost i korist.

6. ZAKLJUČCI

1. Meta-analiza sprovedena na 17000 pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke, pokazala je da androgeni receptor i na proteinskom i na nivou *iRNK* ima ulogu dobrog prognostičkog faktora, odnosno faktora bolje prognoze bolesti.
2. U odnosu na IHH definisane podtipove karcinoma dojke ekspresija AR ima ulogu dobrog prognostičkog faktora kod hormon receptor pozitivnog, kao i trostruko negativnog karcinoma dojke, ali ne i kod HER2 pozitivnog karcinoma dojke, gde ima ulogu prognostičkog faktora kraćeg preživljavanja.
3. Analiza prognostičke uloge *iRNK AR* kod molekularnih podtipova karcinoma dojke (luminal A, luminal B, HER2-*like* i bazalnom epitelu sličan podtip) pokazala je bolje ukupno preživljavanje samo kod HER2-*like* tumora, što ukazuje da IHH analiza, kao i analiza genske ekspresije tumora, može klasifikovati iste tumore u različite podtipove karcinoma dojke.
4. Analiza korelacije *iRNK AR* sa prognostičkim faktorima je pokazala da manji tumori, tumori <2cm, kao i starije životno doba, starost >50 godina, su u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ekspresijom AR. U okviru molekularnih podtipova, svi podtipovi su imali značajnu korelaciju između ekspresije *iRNK AR* i *ESR1* gena, odnosno gena za estrogene receptore.
5. Analiza korelacije *iRNK AR* sa drugim genima od interesa je pokazala značajnu korelaciju sa *WNT7B*, *ESR1*, *HER3*, *PIK3CA* genima koji imaju važnu ulogu u razvoju rezistencije HER2+ karcinoma dojke.
6. Ekspresija *iRNK AR* se pokazala kao negativan prognostički faktor za postizanje patološkog kompletnog odgovora, kod svih pacijentkinja zajedno koje su lečene neoadjuvantnom hemioterapijom.

7. LITERATURA

1. Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
2. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.
3. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011; 121: 2750-2767.
4. Heemers HV, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgen activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway: Current insights. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 2265-2277.
5. HG B. Androgen production in women. *Fertil Steril* 2002; 77: S3-5.
6. Longcope C. Adrenal and gonadal androgen secretion in normal females. *Clin Endocrinol Metab* 1986; 15: 213-228.
7. Knochenhauer E, Azziz R. Ovarian hormones and adrenal androgens during a woman's life span. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: S105-115.
8. Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1234-1238.
9. Simental JA, Sar M, Lane MV et al. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 1991; 266: 510-518.
10. Brodie J, McEwan IJ. Intra-domain communication between the N-terminal and DNA-binding domains of the androgen receptor: modulation of androgen response element DNA binding. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 603-615.
11. Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 2006; 20: 1405-1428.
12. Narayanan R, Dalton JT. Androgen Receptor: A Complex Therapeutic Target for Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2016; 8.
13. Pietri E, Conteduca V, Andreis D et al. Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 2016; 23: R485-498.
14. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 2181-2187.
15. Henderson BE, Ross RK, Judd HL et al. Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer* 1985; 56: 1206-1208.
16. Bernstein L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7: 3-15.
17. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 427-433.
18. Grattarola R. [Increased androgenic activity in the etiology of cancer of the breast]. *Cancro* 1970; 23: 147-151.
19. Secreto G, Zumoff B. Role of androgen excess in the development of estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer. *Anticancer Res* 2012; 32: 3223-3228.

20. Zhou J, Ng S, Adesanya-Famuiya O et al. Testosterone inhibits estrogen-induced mammary epithelial proliferation and suppresses estrogen receptor expression. *FASEB J* 2000; 14: 1725-1730.
21. Somboonporn W, Davis SR, National H, Medical Research C. Testosterone effects on the breast: implications for testosterone therapy for women. *Endocr Rev* 2004; 25: 374-388.
22. Doane AS, Danso M, Lal P et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 2006; 25: 3994-4008.
23. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 606-616.
24. Ni M, Chen Y, Lim E et al. Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell* 2011; 20: 119-131.
25. Naderi A, Hughes-Davies L. A functionally significant cross-talk between androgen receptor and ErbB2 pathways in estrogen receptor negative breast cancer. *Neoplasia* 2008; 10: 542-548.
26. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 463-475.
27. Eliassen AH HS. Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancer: prospective studies. In Berstein RJ (ed) *Innovative endocrinology of cancer*. New York: : Landes Bioscience; 2007; 148–165.
28. Tamimi RM, Hankinson SE, Chen WY et al. Combined estrogen and testosterone use and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 2006; 166: 1483-1489.
29. Ness RB, Albano JD, McTiernan A, Cauley JA. Influence of estrogen plus testosterone supplementation on breast cancer. *Arch Intern Med* 2009; 169: 41-46.
30. Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE. Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1856-1865.
31. Sieri S, Krogh V, Bolelli G et al. Sex hormone levels, breast cancer risk, and cancer receptor status in postmenopausal women: the ORDET cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 169-176.
32. Micheli A, Muti P, Secreto G et al. Endogenous sex hormones and subsequent breast cancer in premenopausal women. *Int J Cancer* 2004; 112: 312-318.
33. Kaaks R, Berrino F, Key T et al. Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 755-765.
34. Dorgan JF, Stanczyk FZ, Kahle LL, Brinton LA. Prospective case-control study of premenopausal serum estradiol and testosterone levels and breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R98.
35. Micello D, Marando A, Sahnane N et al. Androgen receptor is frequently expressed in HER2-positive, ER/PR-negative breast cancers. *Virchows Arch* 2010; 457: 467-476.

36. Collins LC, Cole KS, Marotti JD et al. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol* 2011; 24: 924-931.
37. Agoff SN, Swanson PE, Linden H et al. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 725-731.
38. Bryan RM, Mercer RJ, Bennett RC et al. Androgen receptors in breast cancer. *Cancer* 1984; 54: 2436-2440.
39. Schippinger W, Regitnig P, Dandachi N et al. Evaluation of the prognostic significance of androgen receptor expression in metastatic breast cancer. *Virchows Arch* 2006; 449: 24-30.
40. Park S, Koo JS, Kim MS et al. Androgen receptor expression is significantly associated with better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancers. *Ann Oncol* 2011; 22: 1755-1762.
41. Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W, Taube SE. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK): explanation and elaboration. *BMC Med* 2012; 10: 51.
42. Collett K, Hartveit F, Skjaerven R, Maehle BO. Prognostic role of oestrogen and progesterone receptors in patients with breast cancer: relation to age and lymph node status. *J Clin Pathol* 1996; 49: 920-925.
43. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR et al. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology* 2007; 50: 434-438.
44. Soiland H, Skaland I, van Diermen B et al. Androgen receptor determination in breast cancer: a comparison of the dextran-coated charcoal method and quantitative immunohistochemical analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008; 16: 362-370.
45. Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Palla SL et al. Androgen receptor levels and association with PIK3CA mutations and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2472-2478.
46. Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C et al. Androgen receptor inhibits estrogen receptor-alpha activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 6131-6140.
47. Castellano I, Allia E, Accortanzo V et al. Androgen receptor expression is a significant prognostic factor in estrogen receptor positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 124: 607-617.
48. Luo X, Shi YX, Li ZM, Jiang WQ. Expression and clinical significance of androgen receptor in triple negative breast cancer. *Chin J Cancer* 2010; 29: 585-590.
49. Loibl S, Muller BM, von Minckwitz G et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 130: 477-487.
50. Yu Q, Niu Y, Liu N et al. Expression of androgen receptor in breast cancer and its significance as a prognostic factor. *Ann Oncol* 2011; 22: 1288-1294.
51. Peters KM, Edwards SL, Nair SS et al. Androgen receptor expression predicts breast cancer survival: the role of genetic and epigenetic events. *BMC Cancer* 2012; 12: 132.

52. Hu R, Dawood S, Holmes MD et al. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 1867-1874.
53. He J, Peng R, Yuan Z et al. Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med Oncol* 2012; 29: 406-410.
54. Honma N, Horii R, Iwase T et al. Clinical importance of androgen receptor in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen monotherapy. *Breast Cancer* 2012.
55. Witzel I, Graeser M, Karn T et al. Androgen receptor expression is a predictive marker in chemotherapy-treated patients with endocrine receptor-positive primary breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 809-816.
56. Tokunaga E, Hisamatsu Y, Taketani K et al. Differential impact of the expression of the androgen receptor by age in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Med* 2013; 2: 763-773.
57. Takeshita T, Omoto Y, Yamamoto-Ibusuki M et al. Clinical significance of androgen receptor and its phosphorylated form in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20: L15-21.
58. Thike AA, Yong-Zheng Chong L, Cheok PY et al. Loss of androgen receptor expression predicts early recurrence in triple-negative and basal-like breast cancer. *Mod Pathol* 2014; 27: 352-360.
59. Tsang JY, Ni YB, Chan SK et al. Androgen receptor expression shows distinctive significance in ER positive and negative breast cancers. *Ann Surg Oncol* 2014; 21: 2218-2228.
60. Pistelli M, Caramanti M, Biscotti T et al. Androgen receptor expression in early triple-negative breast cancer: clinical significance and prognostic associations. *Cancers (Basel)* 2014; 6: 1351-1362.
61. Kuenen-Boumeester V, Van der Kwast TH, Claassen CC et al. The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 1560-1565.
62. Langer M, Kubista E, Schemper M, Spona J. Androgen receptors, serum androgen levels and survival of breast cancer patients. *Arch Gynecol Obstet* 1990; 247: 203-209.
63. Gonzalez LO, Corte MD, Vazquez J et al. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological characteristics of the tumors, prognosis, and expression of metalloproteases and their inhibitors. *BMC Cancer* 2008; 8: 149.
64. Agrawal AK, Jelen M, Grzebieniak Z et al. Androgen receptors as a prognostic and predictive factor in breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46: 269-276.
65. Narita D, Anghel A, Cimpean AM et al. Interaction between estrogens and androgen receptor genes microsatellites, prostate-specific antigen and androgen receptor expressions in breast cancer. *Neoplasma* 2010; 57: 198-206.
66. Pelekanou V, Kampa M, Kafousi M et al. Erythropoietin and its receptor in breast cancer: correlation with steroid receptors and outcome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2016-2023.
67. Gasparini P, Fassan M, Cascione L et al. Androgen receptor status is a prognostic marker in non-basal triple negative breast cancers and determines novel therapeutic options. *PLoS One* 2014; 9: e88525.

68. Arslan C, Isik M, Guler G et al. Does androgen receptor have a prognostic role in patients with estrogen/progesterone-negative and c-erbB-2-positive breast cancer? *Am Surg* 2012; 78: 992-999.
69. McGhan LJ, McCullough AE, Protheroe CA et al. Androgen receptor-positive triple negative breast cancer: a unique breast cancer subtype. *Ann Surg Oncol* 2014; 21: 361-367.
70. Carreno G, Del Casar JM, Corte MD et al. Local recurrence after mastectomy for breast cancer: analysis of clinicopathological, biological and prognostic characteristics. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 102: 61-73.
71. Parker JS, Mullins M, Cheang MC et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1160-1167.
72. Haibe-Kains B, Desmedt C, Loi S et al. A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular subtypes. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 311-325.
73. Carter SL, Eklund AC, Kohane IS et al. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* 2006; 38: 1043-1048.
74. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-536.
75. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 262-272.
76. Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE et al. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol* 2007; 8: R157.
77. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5158-5165.
78. Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 2009; 15: 68-74.
79. Bild AH, Yao G, Chang JT et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 2006; 439: 353-357.
80. Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R et al. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med* 2004; 10: 594-601.
81. Creighton CJ, Casa A, Lazard Z et al. Insulin-like growth factor-I activates gene transcription programs strongly associated with poor breast cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4078-4085.
82. Creighton CJ, Hilger AM, Murthy S et al. Activation of mitogen-activated protein kinase in estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells in vitro induces an in vivo molecular phenotype of estrogen receptor alpha-negative human breast tumors. *Cancer Res* 2006; 66: 3903-3911.
83. Loi S, Haibe-Kains B, Majjaj S et al. PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 10208-10213.

84. Saal LH, Johansson P, Holm K et al. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 7564-7569.
85. Bonnefoi H, Piccart M, Bogaerts J et al. TP53 status for prediction of sensitivity to taxane versus non-taxane neoadjuvant chemotherapy in breast cancer (EORTC 10994/BIG 1-00): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2011; 12: 527-539.
86. Desmedt C, Di Leo A, de Azambuja E et al. Multifactorial approach to predicting resistance to anthracyclines. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1578-1586.
87. Tabchy A, Valero V, Vidaurre T et al. Evaluation of a 30-gene paclitaxel, fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy response predictor in a multicenter randomized trial in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5351-5361.
88. Shi L, Campbell G, Jones WD et al. The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 827-838.
89. Hatzis C, Pusztai L, Valero V et al. A genomic predictor of response and survival following taxane-anthracycline chemotherapy for invasive breast cancer. *JAMA* 2011; 305: 1873-1881.
90. Iwamoto T, Bianchini G, Booser D et al. Gene pathways associated with prognosis and chemotherapy sensitivity in molecular subtypes of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 264-272.
91. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109: 25-32.
92. Soiland H, Korner H, Skaland I et al. Prognostic relevance of androgen receptor detection in operable breast cancer. *J Surg Oncol* 2008; 98: 551-558.
93. Ignatiadis M, Singhal SK, Desmedt C et al. Gene modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: a pooled analysis. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1996-2004.
94. Park S, Park HS, Koo JS et al. Higher expression of androgen receptor is a significant predictor for better endocrine-responsiveness in estrogen receptor-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133: 311-320.
95. Vera-Badillo FE, Templeton AJ, de Gouveia P et al. Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: djt319.
96. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10869-10874.
97. Fan C, Oh DS, Wessels L et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 560-569.
98. Paik S, Shak S, Tang G et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 2817-2826.
99. Tutt A, Wang A, Rowland C et al. Risk estimation of distant metastasis in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer patients using an RT-PCR based prognostic expression signature. *BMC Cancer* 2008; 8: 339.
100. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999-2009.

101. Nielsen TO, Parker JS, Leung S et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5222-5232.
102. Lim E, Ni M, Cao S et al. Importance of Breast Cancer Subtype in the Development of Androgen Receptor Directed Therapy. *Curr Breast Cancer Rep* 2014; 6: 71-78.
103. Chia K, O'Brien M, Brown M, Lim E. Targeting the androgen receptor in breast cancer. *Curr Oncol Rep* 2015; 17: 4.
104. Rizza P, Barone I, Zito D et al. Estrogen receptor beta as a novel target of androgen receptor action in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 2014; 16: R21.
105. Lanzino M, Sisci D, Morelli C et al. Inhibition of cyclin D1 expression by androgen receptor in breast cancer cells--identification of a novel androgen response element. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 5351-5365.
106. Birrell SN, Bentel JM, Hickey TE et al. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 52: 459-467.
107. Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res* 2014; 16: R7.
108. Park S, Koo J, Park HS et al. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Ann Oncol* 2010; 21: 488-492.
109. Bastien RR, Rodriguez-Lescure A, Ebbert MT et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics* 2012; 5: 44.
110. Zhu J, Blenis J, Yuan J. Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 6584-6589.
111. Sutton LM, Cao D, Sarode V et al. Decreased androgen receptor expression is associated with distant metastases in patients with androgen receptor-expressing triple-negative breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2012; 138: 511-516.
112. Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA et al. Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Mol Cancer Ther* 2015; 14: 769-778.
113. Kach J, Conzen SD, Szmulewitz RZ. Targeting the glucocorticoid receptor in breast and prostate cancers. *Sci Transl Med* 2015; 7: 305ps319.
114. P U. Testosterone (Hormone Male) et son R6le possible dans le Traitment de Certains Cancers du Sein. *Unio Internationalis Contra Cancrum* 1939; 4 377.
115. Boni C, Pagano M, Panebianco M et al. Therapeutic activity of testoterone in metastatic breast cancer. *Anticancer Res* 2014; 34: 1287-1290.
116. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res* 2014; 16: 406.
117. Luo J, Jin J, Yang F et al. The Correlation Between PARP1 and BRCA1 in AR Positive Triple-negative Breast Cancer. *Int J Biol Sci* 2016; 12: 1500-1510.
118. von Minckwitz G, Kummel S, Vogel P et al. Intensified neoadjuvant chemotherapy in early-responding breast cancer: phase III randomized GeparTrio study. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 552-562.

119. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 5533-5540.
120. Asano Y, Kashiwagi S, Onoda N et al. Clinical verification of sensitivity to preoperative chemotherapy in cases of androgen receptor-expressing positive breast cancer. *Br J Cancer* 2016; 114: 14-20.
121. Murray D, Doran P, MacMathuna P, Moss AC. In silico gene expression analysis--an overview. *Mol Cancer* 2007; 6: 50.
122. Gucalp A P-ST, Razavi P,. Androgen receptor (AR) mutations in a cohort of patients with breast cancer (BC) who have undergone tumor genomic profiling. *Cancer Research* 2016; 76: 07-08.
123. Overmoyer BS-A, Partridge, A. et al. Enobosarm for the treatment of metastatic, estrogen and androgen receptor positive, breast cancer. Final results of the primary endpoint and current progression free survival. *Cancer Research* 2015; 75.
124. O'Shaughnessy J CM, Brain E,. Abiraterone acetate, exemestane or the combination in postmenopausal patients with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Annals of Oncology* 2016; 27.
125. Proverbs-Singh T FJ, Morris MJ,. Targeting the androgen receptor in prostate and breast cancer: several new agents in development. *Endocrine-Related Cancer* 2015; 22: 87-106.
126. Cardoso F BJ, Slaets L, et al. . Characterization of male breast cancer: First results of the EORTC10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male BC. *San Antonio Breast Cancer Symposium* 2014. 2014.
127. Qu Q, Mao Y, Fei XC, Shen KW. The impact of androgen receptor expression on breast cancer survival: a retrospective study and meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8: e82650.

SKRAĆENICE

KD – karcinom dojke

AR – androgeni receptor

T - testosteron

DHT - 5 α -dihidrotestosteron

DHEAS - dehidroepiandrosterone sulfat

DHEA – dehidroepiandrosterone

NTD - N-terminalni regulatorni domen (*eng. N-terminal regulatory domain*)

DBD - DNK-vezujući domen (*eng. DNA-binding domain*)

H - mali vezujući domen (*eng. hinge*)

LBD - ligand vezujući domen (*eng. ligand binding domain*)

MAPK - mitogen aktivirajuća protein kinaza, *eng. (Mitogen-Activated Protein Kinase)*

ERK - vanćelijska signal regulisana kinaza, (*eng. Extracellular signal-Regulated Kinases*)

PI3K/AKT – fosfatidil inozitol 3 kinaza, protein B kinaza (*eng. phosphatidylinositol-3-kinase; AKT protein kinase B*)

Ras GTP – *eng. Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, Guanosine-5'-triphosphate*

GPCRs - upareni plazma membranski G protein receptor, *eng. plasma membrane G protein-coupled receptors*

SHBGR - globulinski receptor koji vezuje seksualne hormone *eng. sex hormone-binding globulin receptor*

cAMP – ciklični adenzin monofosfat, *eng. cyclic adenosine monophosphate,*

PKC - protein kinaza C

FOX1 – *eng. forkhead box protein O1*

ER – estrogeni receptor

PR – progesteron receptor

HER2 – humani epidermalni faktor rasta

HR – hormon receptor

TN – trostruko negativni tumor, (eng. *triple negative*)

DFS – preživljavanje bez bolesti, (eng. *disease free survival*)

OS – ukupno preživljavanje, (eng. *overall survival*)

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

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

IHH – imunohistohemija

GEP – profil genske ekspresije, (eng. *gene expression profile*)

GS - genski zapis, (eng. *gene-signatures*)

REMARK – preporuke za publikovanje i objavljivanje rezultata studija prognostičkih markera (eng. *Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies*)

iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina

PubMed - eng. *Publisher/Public Medline*

GEO – eng. *Gene Expression Omnibus*

HT – hormonska terapija

CT – hemioterapija

UA – univarijantna analiza

MA – multivarijantna analiza

pCR – patološki kompletni odgovor, (eng. *pathological complete response*)

Tabela 14_prilog: Karakteristike setova podataka za genomsku meta-analizu

datasets	source	nb	age150	ageu50	agena	size02	size25	size5	sizea	grade1	grade2	grade3	node0	node1	nodena	erpos	erneg	erna	pgrpos	pgrneg	pgrna	her2pos	her2neg	her2na	scmgene.ERposHER2negLP	scmgene.ERposHER2negHP	scmgene.HER2	scmgene.HER2negERn	scmgene.na	
CAL	AE: E-TABM-158	118	50	63	1	47	62	7	2	10	42	61	51	67	0	75	43	0	66	51	1	0	0	118	34	39	15	30	0	
DFHCC	GEO: GSE19615	115	50	61	0	53	58	4	0	23	28	64	62	53	0	70	45	0	64	51	0	36	79	0	32	31	18	34	0	
DFHCC2	GEO: GSE18864	84	37	45	0	0	0	0	84	10	16	58	0	0	84	31	53	0	31	53	0	18	66	0	17	13	10	44	0	
DFHCC3	GEO: GSE3744	40	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	40	0	0	40	0	0	40	5	8	8	19	0	
DUKE	GEO: GSE3143	171	0	0	171	36	47	5	83	0	0	0	53	36	82	114	57	0	65	23	83	0	0	171	21	8	42	100	0	
DUKE2	GEO: GSE6961	160	63	57	35	0	0	0	160	2	37	70	58	95	7	37	123	0	25	133	2	0	0	160	27	30	27	76	0	
EMC2	GEO: GSE12276	204	0	0	204	0	0	0	204	0	0	0	48	0	156	0	0	204	0	0	204	0	0	204	40	62	40	62	0	
EORTC10994	GEO: GSE1561	49	0	0	49	27	22	0	0	4	22	20	19	30	0	27	22	0	18	29	2	0	0	49	8	12	11	18	0	
EXPO	GEO: GSE2109	353	104	248	1	0	0	0	353	32	114	151	0	0	353	161	85	107	129	114	110	61	166	126	119	97	43	94	0	
FNCLCC	GEO: GSE7017	150	0	0	150	0	0	0	150	0	0	0	0	150	0	0	150	0	0	150	0	0	150	38	56	28	28	0	0	
HLP	AE: E-TABM-543	53	16	30	5	18	28	2	5	0	0	53	27	25	1	25	28	0	20	33	0	13	40	0	15	13	8	17	0	
JB1	GEO: GSE20711	129	0	0	129	54	67	8	0	27	32	70	64	65	0	76	53	0	0	129	31	98	0	34	15	19	61	0	0	
KOO	Authors' w ebsite	88	0	0	88	36	47	5	0	0	0	0	19	69	0	73	15	0	65	23	0	0	0	88	10	6	18	54	0	
LUND	GEO: GSE5325	143	48	89	0	128	13	0	0	0	0	0	143	0	0	114	29	0	88	47	8	0	0	143	18	47	9	63	6	
LUND2	GEO: GSE5325	105	0	0	105	0	0	0	105	0	0	0	0	0	105	45	60	0	0	0	105	0	0	105	31	25	17	27	5	
MAINZ	GEO: GSE11121	200	47	149	0	112	85	3	0	29	136	35	200	0	0	162	38	0	0	0	200	0	0	200	74	81	20	25	0	
MAQC2	GEO: GSE20194	230	97	119	0	0	0	0	0	230	13	94	123	66	164	0	141	89	0	104	126	0	40	190	0	59	79	27	65	0
MCCC	GEO: GSE19177	75	0	0	75	0	0	0	0	75	0	0	0	0	75	0	0	75	0	0	75	0	0	75	13	31	4	27	0	
MDA4	MDACC DB	129	56	67	0	70	42	9	8	0	0	0	59	62	8	79	48	2	54	73	2	15	114	0	60	17	10	42	0	
METABRIC	EGAS000000008	1992	426	1566	0	862	1008	102	20	170	775	957	1042	950	0	1508	440	44	0	0	1992	148	676	1168	701	648	238	405	0	
MSK	GEO: GSE2603	99	35	62	0	15	70	14	0	0	0	0	34	65	0	57	42	0	43	55	1	85	0	14	16	35	12	36	0	
MUG	GEO: GSE10510	152	0	0	152	0	0	0	152	0	0	0	0	0	152	0	0	152	0	0	152	0	0	152	26	61	26	39	0	
NCCS	GEO: GSE5364	183	0	0	183	0	0	0	183	0	0	0	0	0	183	0	0	183	0	0	183	0	0	183	35	51	55	42	0	
NCI	Authors' w ebsite	99	26	70	0	36	56	7	0	16	38	45	46	53	0	65	34	0	0	0	99	0	0	99	16	15	13	54	1	
NKI	osetta l npharmtic	337	267	50	0	182	154	1	0	79	109	149	193	144	0	249	88	0	0	0	337	0	0	337	105	109	51	71	1	
PNC	GSE20713	92	27	61	4	29	50	7	6	13	5	70	43	40	9	45	43	4	40	43	9	26	64	2	18	30	22	22	0	
STK	GEO: GSE1456	159	46	106	0	0	0	0	159	28	58	61	0	0	159	130	29	0	0	0	159	0	0	159	49	67	15	28	0	
STNO2	SMD	118	36	81	0	19	94	0	5	11	49	53	34	79	5	82	31	5	0	0	118	0	0	118	27	36	25	30	0	
TCGA	TCG Data Portal	517	143	359	0	0	0	0	517	0	0	0	251	266	0	394	118	5	335	177	5	105	18	394	174	190	54	99	0	
TRANSBIG	GEO: GSE7390	198	131	56	0	102	96	0	0	30	83	83	198	0	0	134	64	0	0	0	198	0	0	198	52	74	26	46	0	
UCSF	Authors' w ebsite	162	64	87	9	84	62	10	6	14	62	74	67	82	13	101	41	20	94	46	22	19	35	108	46	47	23	41	5	
UNC4	UNC DB	305	90	148	59	61	129	43	72	25	80	138	126	134	44	154	99	52	109	126	70	58	203	44	76	98	36	95	0	
UNT	GEO: GSE2990	133	58	72	0	83	49	1	0	32	51	29	133	0	0	86	40	7	56	6	71	0	0	133	70	22	19	22	0	
UFP	GEO: GSE3494	251	51	196	0	128	117	6	0	67	128	54	158	84	9	213	34	4	190	61	0	0	0	251	110	75	33	33	0	
VDX	D: GSE2034/GSE57737	344	120	157	58	278	8	0	58	7	42	148	344	0	0	209	135	0	0	0	344	0	0	344	83	108	51	102	0	
pool		7737	2088	3999	1518	2460	2364	234	2679	642	2001	2566	3538	2713	1485	4657	2026	1054	1596	1270	4871	655	1749	5333	2259	2336	1073	2051	18	

Biografija

Dr Božović-Spasojević Ivana, diplomirala je na Medicinskom fakultetu u Prištini 1999. god. sa prosečnom ocenom 9.79 (devet sedamdesetdevet) i dobitnik je Vidovdanske nagrade 1998. god. za studenta generacije, odnosno studenta sa najboljim uspehom tokom studija na Univerzitetu u Prištini. Nakon završenih studija dobila je stipendiju Ministarstva za nauku i tehnologiju Vlade Republike Srbije za poslediplomske studije koje je upisala na Medicinskom fakultetu u Beogradu, katedra za Kliničku farmakologiju i terapiju. Kliničko istraživanje je započela na odeljenju Kliničke farmakologije i terapije IORS-a, a nakon uspešno položenih ispita, decembra 2005. god. odbranila je magistratsku tezu pod nazivom: "Empirijska validacija kliničkog odgovora u lečenju bolesnika sa febrilnom neutropenijom" kod mentora prof. Ranke Samardžić i komentora Naučnog savetnika dr Snežane Bošnjak.

Dr Božović-Spasojević je završila specijalizaciju iz Interne medicine 2007. god. na Medicinskom fakultetu u Beogradu sa odličnim uspehom. Zaposlena je na Institutu za onkologiju i radiologiju (IORS) Srbije od septembra 2001. godine. Od oktobra 2009. god. do oktobra 2012. god boravila je kao istraživač saradnik na Institutu "Jules Bordet" u Briselu, a u okviru stipendije koju dodeljuje TransBIG konzorcijum pod pokroviteljstvom Evropskog programa FP7, kod mentorke profesorke Fatime Cardoso i profesorke Martine Piccart. Njeno glavno učešće kao kliničkog istraživača bilo je u MINDACT studiji (Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy), prvoj prospektivnoj studiji koja poredi genomski profil tumora (*70-gene expression profile*, Mamma print® Agendia) sa standardnim kliničko-patološkim kriterijumima u selekciji pacijentkinja za primenu adjuvantne hemioterapije kod ranog karcinoma dojke. Rezultati ove studije objavljeni su 2016.god. u časopisu *New England Journal of Medicine*, a dr Božović-Spasojević je navedena kao jedan od saradnika koji su učestvovali u ovom velikom i važnom akademskom projektu.

Dr Božović-Spasojević je završila užu specijalizaciju iz Kliničke onkologije marta 2017. god. na Medicinskom fakultetu u Beogradu, i odbranila je rad pod nazivom: "Terapijski odgovor na neoadjuvantnu hemioterapiju antraciklinima, ili sekvencijalno

antraciklinima i taksanima sa ili bez trastuzumaba kod pacijentkinja sa lokalno odmaklim karcinomom dojke", kod mentora prof. Radana Džodića.

Dr Božović-Spasojević je objavila više revijalnih i originalnih radova kao prvi autor u vodećim onkološkim časopisima od kojih je originalni rad pod nazivom "*Concurrent Use of Anthracyclines and Trastuzumab in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer: Is it really safe?*" publikovan u *Lancet Oncology* 2011. godine.

Dr Božović-Spasojević je stalni član konzilijuma za dojku na IORS-u i oblasti njenog interesovanja su klinička i translaciona istraživanja u karcinomu dojke ali i drugim solidnim tumorima.

Dr Božović-Spasojević je član svih vodećih domaćih i međunarodnih onkoloških udruženja; od 2015.god. član je Republičke stručne komisije za Onkologiju; član je Organizacionog odbora mladih onkologa Srbije koji pripada evropskom udruženju medikalnih onkologa; član po pozivu Agencije za lekove za oblast registracije onkoloških lekova u Republici Srbiji.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Božović-Spasojević Ivana

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

"Prognostički značaj androgenog receptora u ranom karcinomu dojke: meta-analiza"

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 28.04.2017.god.





Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora : Božović-Spasojević Ivana

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada: **Prognostički značaj androgenog receptora u ranom karcinomu dojke: meta-analiza"**

Mentor: Prof. Svetislav Tatić

Komentor: N. Sar. dr Snežana Šušnjar

Potpisani : Božović-Spasojević Ivana _____

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

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

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 28.04.2017.god.





Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

Prognošički značaj androgenog receptora u ranom karcinomu dojke: meta-analiza"

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

U Beogradu, 28.04.2017.god.

Potpis doktoranta

