

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Marko N. Buta

**Prognostički značaj klasičnih i
molekularnih biomarkera ranog
karcinoma dojke u praćenju toka
bolesti**

- Doktorska disertacija -

Beograd, 2016

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE**

Marko N. Buta

**Prognostical value of classical and
molecular biomarkers in the follow-up
of early breast cancer**

- Doctoral dissertation -

Belgrade, 2016

Mentor: Prof.dr Radan Džodić, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Komentor: N.Sar.dr sci. med. Milan Markićević, Institut za onkologiju i
radiologiju Srbije, odeljenje za eksperimentalnu onkologiju.

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

1. *Prof. dr Zorica Milošević*, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. *Doc. dr Marina Nikitović*, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. *N. Sar. dr sci. med. Zorka Milovanović*, Institut za onkologiju i radiologiju
Srbije, služba patologije

PROGNOSTIČKI ZNAČAJ KLASIČNIH I MOLEKULARNIH BIOMARKERA RANOG KARCINOMA DOJKE U PRAĆENJU TOKA BOLESTI

SAŽETAK

Uvod: Novi molekularni biomarkeri (uPA, PAI-1, katepsin D), uz klasične prognostičke markere, mogu biti korisni u prepoznavanju visoko-rizične podgrupe pacijenata u relativno dobroj prognostičkoj grupi pacijenata sa karcinomom dojke kod kojih nisu zahvaćeni limfni čvorovi (pN0).

Pacijenti i metode: Procenjivana je prognostička vrednost urokinaznog plazminog aktivatora (uPA), plazminogen aktivator inhibitora-1 (PAI-1) i katepsina D u grupi postmenopauzних pacijentkinja operisanih zbog karcinoma dojke, kod kojih tumori pokazuju pozitivan steroidni receptorski status (estrogen receptor (ER)/progesteron receptor (PR)), a kod kojih nije primenjivana adjuvantna terapija. Značaj biomarkera je analiziran tokom tri različita perioda praćenja. Analizirana su 73 uzorka citosolnog ekstrakta. Vrednosti ER i PR su određivane klasičnom biohemijskom metodom, katepsin D radiometrijskim imuno-esejom a uPA i PAI-1 ELISA testom. Vrednosti HER 2 genske amplifikacije su određivane hromogenom in situ hibridizacijom (CISH).

Rezultati: Tokom ranog perioda praćenja (prvih pet godina nakon hirurškog lečenja) pacijenti sa veličinom tumora pT1 i niskim vrednostima PAI-1 ($PAI-1 < 6.35$ pg/mg) su imali bolju prognozu u odnosu na pacijente sa veličinom tumora (pT2,3) ili koji su imali visoke vrednosti PAI-1. Analizom 4 fenotipa definisanih veličinom tumora i PAI-1 statusom pokazano je da pacijenti koji imaju tumore veličine pT1, bez obzira na nivo PAI-1, ili koji imaju tumore veličine pT2,3 uz niske vrednosti PAI-1 imaju sličan DFI i dobru prognozu kao i pacijenti sa veličinom tumora pT2,3 uz visoke vrednosti PAI-1.

Zaključak: Veličina tumora u kombinaciji sa PAI-1 ima prognostički i moguće prediktivni značaj tokom ranog praćenja postmenopauzних pacijentkinja sa karcinomom dojke kod

kojih tumori pokazuju pozitivan steroidni receptorski status (ER/PR), histološkog gradusa II.

Ključne reči: biomarkeri, prognoza, loko-regionalna terapija, pN0

Naučna oblast: Opšta hirurgija

Uža naučna oblast: Onkologija

PROGNOSTICAL VALUE OF CLASSICAL AND MOLECULAR BIOMARKERS IN THE FOLLOW UP OF EARLY BREAST CANCER

ABSTRACT

Introduction: New molecular prognostic biomarkers (uPA, PAI-1, cathepsin D), together with classical prognostic markers, might be useful to select high risk subgroup of patients within relatively good prognostic group of breast carcinoma patients without metastases in lymph nodes (pN0).

Patients and methods: We evaluated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) prognostic value in postmenopausal, node-negative breast cancer patients bearing tumors with estrogen receptor (ER)/progesterone receptor (PR) expression, treated with locoregional therapy alone, within 3 different follow-up periods: first five years after surgical treatment, second five years and during the whole period of ten years. We focused our analysis on tumors of histological grade II in order to improve its prognostic value and, consequently, to improve a decision making process. The cytosol extracts of 73 tumor samples were used for assessing several biomarkers. ER and PR levels were measured by classical biochemical method. Cathepsin D was assayed by a radiometric immunoassay while both uPA and PAI-1 level determinations were performed by enzyme-linked immunosorbent assays. HER-2 gene amplification was determined by chromogenic in situ hybridization (CISH) in primary tumor tissue.

Results: During the early follow up patients bearing tumors smaller than or equal to 2 cm (pT1) or those with low PAI-1 levels (PAI-1<6.35 pg/mg) showed favorable outcome compared to patients bearing tumors greater than 2 cm (pT2,3) or those with high PAI-1 levels, respectively. Analyses of 4 phenotypes, defined by tumor size and PAI-1 status, revealed that patients bearing either pT1 tumors, irrespective of PAI-1 levels, or pT2,3 tumors with low PAI-1 levels, had similar disease-free interval probabilities and showed favorable outcome compared to those bearing pT2,3 tumors with high PAI-1 levels.

Conclusion: Our findings suggest that tumor size and PAI-1, used in combination as phenotypes are not only prognostic but might also be predictive in node-negative, postmenopausal breast cancer patients bearing histological grade II tumors with ER/PR expression, during an early follow-up period.

Keywords: biomarkers, prognosis, locoregional therapy, pN0

Research area: General surgery

Special topics: Oncology

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1. 1. Kancerogeneza i metastaziranje	3
1.1.1. Modeli heterogenosti tumora: kancerska stem ćelija i stohastički model	3
1.1.2. Epitelno mezenhimalna tranzicija (EMT)	7
1.1.3. Uspavanost tumora	9
1. 2. Faktori prognoze/predikcije toka bolesti za primarni karcinom dojke	14
1. 2. 1. Klasični faktori prognoze/predikcije toka bolesti	15
1.2.1.1. Parametri tumora.....	15
1.2.1.1.1. Status limfnih čvorova pazušne jame.....	15
1.2.1.1.2. Veličina tumora	17
1.2.1.1.3. Histološki tip tumora.....	18
1.2.1.1.4. Histološki gradus tumora	20
1.2.1.2.5. Limfovaskularna invazija	22
1.2.1.2.6. Indeks proliferativnosti ćelija Ki67	22
1.2.1.2. Parametri domaćina tumora – godine i status menopauze.....	23
1. 2. 2. Biohemijski faktori prognoze/predikcije toka bolesti	23
1.2.2.1. Status receptora za estrogen i receptora za progesteron.....	23
1.2.2.2. HER-2 status	25
1. 3. Katepsin D.....	27
1.3.1. Osnovne informacije o katepsinu D	27
1.3.2. Funkcija katepsina D.....	28
1.3.3. Katepsin D kao faktor prognoze/predikcije toka bolesti.....	28
1.4. Urokinazni plazminog aktivator (uPA) i plazminogen aktivator inhibitor (PAI)	29
1.4.1. uPA: Struktura, uloga i mehanizam dejstva	30
1.4.2. Unutrašnji inhibitori uPA.....	31
1.4.3. uPA i PAI-1 kod raka dojke	32
1.4.4. uPA kao prognostički marker kod raka dojke.....	33
1.4.5. PAI-1 kao prognostički marker kod raka dojke	34
1.4.6. Prediktivna vrednost UPA i PAI-1	35
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	36
3. PACIJENTI I METODE	37
3.1. Određivanje koncentracije ER i PR u citosolu ćelija malignog tkiva dojke – DCC metoda.....	37
3.2. Određivanje koncentracije HER-2	39
3.3. Određivanje koncentracije uPA i PAI-1: ELISA test	39
3.4. Određivanje koncentracije katepsina D – imunoradiometrijski esej (IRMA).....	40
3.5. Statističke metode za obradu rezultata	41
4. REZULTATI	42
4.1. Karakteristike tumora i domaćina tumora.....	42
4.1.1. Karakteristike tumora i domaćina tumora u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije	42
4.1.2. Karakteristike tumora i domaćina tumora u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina nakon operacije	44
4.1.3. Karakteristike tumora i domaćina tumora u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije	45

4.2. Raspodela vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija u podgrupama bolesnica definisanih na osnovu klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti tumora	47
4.2.1. Raspodela vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije	47
4.2.1.1. Raspodela vrednosti koncentracija katepsina D	47
4.2.1.2. Raspodela vrednosti koncentracija uPA	49
4.2.1.3. Raspodela vrednosti koncentracija PAI-1	49
4.2.2. Raspodela vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina nakon operacije	50
4.2.2.1. Raspodela vrednosti koncentracija katepsina D	50
4.2.2.2. Raspodela vrednosti koncentracija uPA	51
4.2.2.3. Raspodela vrednosti koncentracija PAI-1	52
4.2.3. Raspodela vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije	53
4.2.3.1. Raspodela vrednosti koncentracija katepsina D	53
4.2.3.2. Raspodela vrednosti koncentracija uPA i PAI-1	53
4.3. Korelacija vrednosti molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija sa vrednostima kontinualnih klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti tumora	55
4.3.1. Korelacija vrednosti molekularnih biomarkera u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije	55
4.3.2. Korelacija vrednosti molekularnih biomarkera u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina nakon operacije	56
4.3.3. Korelacija vrednosti molekularnih biomarkera u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije	57
4.4. Određivanje granične vrednosti za kontinualne klasične i biomarkere estrogene zavisnosti tumora korišćenjem tzv. „pristupa minimalne p vrednosti“	58
4.4.1. Određivanje granične vrednosti za biomarkere u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije	58
4.4.2. Određivanje granične vrednosti za biomarkere u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina nakon operacije	59
4.4.3. Određivanje granične vrednosti za biomarkere u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije	62
4.5. Ispitivanje prognostičkog značaja fenotipova karcinoma dojke definisanih kombinovanjem klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti	64
4.5.1. Prognostički značaj fenotipova karcinoma dojke, definisanih kombinovanjem klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti, tokom prvih 5 godina nakon operacije	64
4.5.2. Prognostički značaj fenotipova karcinoma dojke, definisanih kombinovanjem klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti, tokom drugih 5 godina nakon operacije	67
4.5.3. Prognostički značaj fenotipova karcinoma dojke, definisanih kombinovanjem klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti, tokom prvih 10 godina nakon operacije	71
5. DISKUSIJA	74
6. ZAKLJUČCI	82
7. LITERATURA	85

1. UVOD

Karcinom dojke je najčešća maligna bolest u ženskoj populaciji, ali je izlečiva u visokom procentu ukoliko se dijagnostikuje u ranom stadijumu [1]. Prema epidemiološkim podacima, u toku 2010. godine u svetu je registrovano oko 1,4 miliona novih slučajeva bolesti sa preko 450.000 smrtnih ishoda. Učestalost bolesti na globalnom nivou kontinuirano raste već 30 godina, a taj porast iznosi 3,1% godišnje [2]. Prosečna standardizovana stopa incidencije karcinoma dojke u centralnoj Srbiji u periodu 1999-2009. godine iznosila je 60,8/100.000, a mortalitetna stopa 20,2/100.000 [3].

Primarni operabilni invazivni karcinom dojke predstavlja biološki i biohemijski heterogeno oboljenje, što se manifestuje heterogenim tokom bolesti, odnosno neizvesnošću u pogledu predviđanja pojave udaljenih metastaza.

Prognostički faktori su definisani kao faktori koji predviđaju rizik od nastanaka recidiva ili smrtnog ishoda bolesti nezavisno od terapijskog pristupa. Prognoza ranog (operabilnog) karcinoma dojke podrazumeva određivanje verovatnoće ponovne pojave bolesti (relapsa) nakon hirurškog lečenja primarnog tumora dojke.

Demicheli i sar. su još 1996.godine ukazali na postojanje dva pika na krivoj rizika za relaps kod pacijenata koji su hirurški lečeni zbog karcinoma dojke a nisu nakon toga primili adjuvantnu terapiju. Prvi pik obuhvata vremenski period do tri godine od primarnog hirurškog lečenja a drugi oko pete godine nakon hirurške terapije. [4-6]. Postojanje i identifikovanje ova dva rizična intervala za relaps uočeno je za različite podgrupe pacijenata, bez obzira na faktore prognoze/predikcije toka bolesti (status menopauze, status limfnih čvorova pazušne jame, veličinu tumora, status receptora za estrogen) što upućuje na biološki fenomen. Jedna od hipoteza kojom se može objasniti ova pojava je ta da hirurška trauma može indukovati i stimulisati proliferaciju i/ili angiogenezu ćelija tumora [7, 8]. Prvi pik na krivi rizika se može objasniti transformacijom malignih ćelija iz stanja bez deobe ćelija u stanje rasta bez krvnih sudova, kao i aktivacije faze stvaranja kapilara i daljeg rasta što predstavlja transformaciju mikrometastatskih žarišta u angiogenezni fenotip rezultujući iznenadnim ubrzanjem metastatskog procesa. Drugi pik na krivoj je pripisan

aktiviranju mikrometastatskih depozita koje se, usled „uspavanosti“ tumora, može desiti nekoliko godina nakon hirurške terapije [4,9].

Pored klasičnih faktora prognoze ranog karcinoma dojke (patološka veličina tumora, status aksilarnih limfnih nodusa, histološki i nuklearni gradus tumora, histološki tip tumora, limfo-vaskularna invazija, Nottingham prognostički indeks (NPI), marker proliferativnosti Ki67, status receptora ER, PR, HER2/neu (c-erb B2), testovi multigenskih profila tumora, starost bolesnice i menstrualni status) istražuju se i novi prognostički markeri zbog činjenice da značajan broj pacijenata sa karcinomom dojke u ranom stadijumu ima mikroskopske metastaze u trenutku dijagnoze. Danas je poznato da aksilarni pN0 status automatski ne podrazumeva odličnu prognozu karcinoma dojke, niti da isključuje neophodnost primene adjuvantnog lečenja. Sistemska adjuvantna terapija poboljšava preživljavanje kod pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke, a ona može uključivati osim hormonske terapije i hemioterapiju antraciklinima i taksanima. Ona je potencijalno toksična i velik izazov predstavlja identifikovanje visoko rizične podgrupe pacijentkinja u okviru relativno dobre prognostičke grupe pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke (pN0).

Stoga je od velike važnosti povezati biološku agresivnost bolesti (izraženu pomoću klasičnih i molekularnih biomarkera) sa njenom kliničkom agresivnošću (izraženom kao vreme do pojave metastaze). Ovaj cilj se, najverodostojnije, može postići posmatrajući biološki tok bolesti, tj. tok bolesti na koji adjuvantna terapija nije uticala.

Osamdesetih godina prošlog veka, konsenzus koji se odnosio na lečenje operabilnog invazivnog karcinoma dojke, kod bolesnica sa aksilarnim pN0 statusom, nalagao je da se ne primenjuje adjuvantna terapija. Ovakav stav se zasnivao na opšte poznatom kliničkom toku bolesti navedene podgrupe bolesnica koji je ukazivao na to da će se kod približno 30 % ovih bolesnica razviti udaljene metastaze tokom 10-ogodišnjeg praćenja toka bolesti [10-12]. Većina pacijenata u ovoj grupi (pN0) će dobiti adjuvantu terapiju iako je rizik od pojave relapsa 20-30%, tj. 70-80% će biti izlečeno samo lokalnom terapijom. Mnogi pacijenti će primiti adjuvantu hemioterapiju kao rezultat neadekvatne procene njihovog rizika.

Danas je, u kliničkoj praksi, prihvaćen konsenzus za lečenje bolesnica obolelih od karcinoma dojke po kome se adjuvantna terapija primenjuje u navedenoj podgrupi bolesnica [13]. Opravdanje za ovakav stav se može naći u činjenici da se, niti na osnovu klasičnih, niti na osnovu molekularnih biomarkera, ne mogu definisati podgrupe bolesnica sa visokim, odnosno niskim rizikom za pojavu udaljenih metastaza.

Prognoza karcinoma prvenstveno zavisi od njegove sposobnosti lokalne invazije i formiranja udaljenih metastaza. Nastanak udaljenih metastaza čini serija uzastopnih koraka koji uključuju remodelovanje ekstraćelijskog matriksa (ECM), lokalnu invaziju, angiogenezu, intravazaciju, preživaljavanje maligne ćelije u cirkulaciji, ekstravazaciju i konačno rast na udaljenoj (sekundarnoj) lokalizaciji. Molekuli koji imaju potencijalno važnu ulogu u procesu nastanka metastaza su urokinazni plazminogen aktivator (uPA) i njegov inhibitor PAI-1. Mnoge studije su pokazale da postoji pojačana ekspresija uPA i PAI 1 u karcinomu dojke u odnosu na normalno tkivo dojke [14-16].

Katepsin D je proteaza koja osim fiziološke uloge u katabolizmu proteina ima i brojne uloge u procesu rasta i metastaziranja karcinoma. Pokazano je da je visoka koncentracija katepsina D u tkivu tumora dojke povezana sa povećanom verovatnoćom za invazivni rast tumora i za nastanak metastaza, verovatno usled toga što katepsin D stimuliše rast mikrometastaza na udaljenim mestima, pre nego lokalnu invaziju putem razaranja bazalne membrane [17].

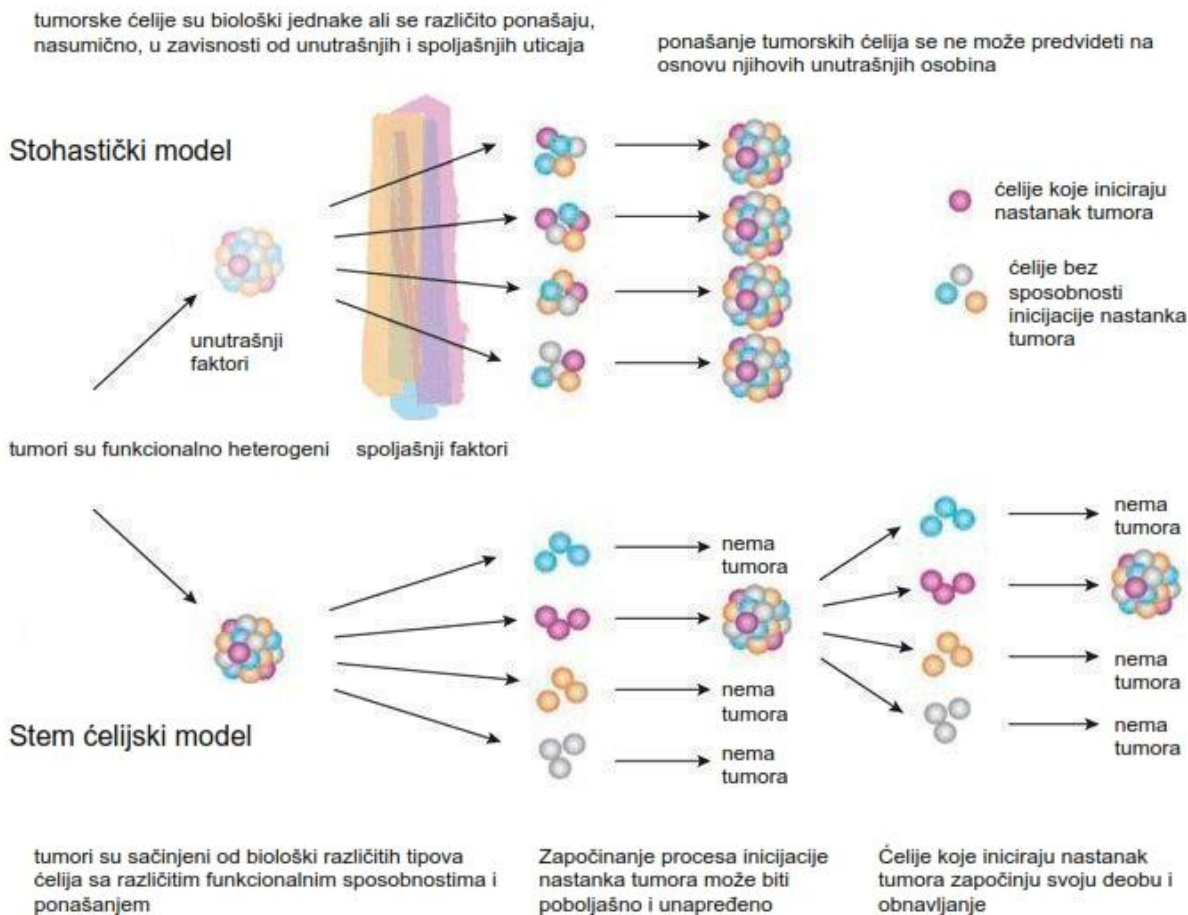
1. 1. Kancerogeneza i metastaziranje

1.1.1. Modeli heterogenosti tumora: kancerska stem ćelija i stohastički model

Moderno shvatanje nastanka kancera datira iz 1858 godine kada je Rudolf Virchow postavio revolucionarnu tezu “*somnis cellula e cellula*”, što znači da sve ćelije nastaju iz ćelija. Iz ove teorije je kasnije nastala ideja da ćelije karcinoma nastaju iz normalnih ćelija kod kojih je došlo do somatskih mutacija. Danas je opšte prihvaćeno da je kancer genetska bolest koja nastaje usled klonalnog, ekspanzivnog rasta jedne neoplastične ćelije. Ovo bi takođe moglo da znači da kancer predstavlja nekontrolisan rast abnormalnih ćelija, tj. da sve

ćelije u okviru tumora nekontrolisano proliferišu [18]. Daleke 1963.godine primećeno je da samo frakcija limfomskih ćelija ima sposobnost klonogenog rasta kada su transplantirana kod miševa [19] a biolozi su ustanovili da je potrebno da ubrizgaju veliki broj ćelija, najmanje 10^4 do 10^5 u eksperimentalne životinje kako bi žapočeli tumorski rast a od ovog broja samo mali procenat ćelija će biti sposoban da formira metastaze [20,21,22].

Predložene su dve glavne teorije koje će pokušati da objasne zašto od svake tumorske ćelije ne može da nastane novi tumor i koje objašnjavaju heterogenost tumora [22]. Prema stohastičkoj teoriji sve tumorske ćelije su biološki ekvivalentne ali spoljašnji faktori (odbrambeni mehanizmi domaćina, koncentracije faktora rasta, mikrosredina rasta tumora) i/ili unutrašnji faktori (vreme u toku ćelijskog ciklusa) sprečavaju da se svaka ćelija isto ponaša. Drugim rečima, ponašanje svake ćelije je potpuno nepredvidivo i nasumično i pod uticajem je nekih ili možda svih unutrašnjih i spoljašnjih faktora. Kao rezultat toga tumor će sačinjavati ćelije sa različitim proliferativnim kapacitetom. Glavna karakteristika ovog modela je ta da svaka ćelija ima podjednak potencijal za inicijaciju i održivost tumorskog rasta ali većina ćelija neće nastaviti proliferaciju zbog male kumulativne šanse za ostvarivanje pogodnih unutrašnjih i spoljašnjih faktora. Teorija pretpostavlja da je tumor sastavljen od homogene populacije ćelija i da su tumorogeni mehanizmi funkcionalni u svim ćelijama [slika 1.].



Slika 1. Stem ćelijski i stohastički model. Preuzeto iz De Vita, Hellman, Rosenber. *Cancer principles and practice of oncology*, 9th ed 2011 Lipincott Williams and Wilkins [18]

Drugi model je hijerarhijski model, koji se zasniva na modelu biologije normalnog somatskog tkiva. Prema ovom modelu većinu ćelija u normalnom tkivu čine neproliferišuće odrasle ćelije koje se neprekidno zamenjuju velikom grupom brzo proliferišućih mladih ćelija koje nastaju od retkih stem ćelija na vrhu te hijerarhije. Prema ovoj teoriji samo ograničen broj ćelija u okviru heterogenog tumora je sposoban da inicira tumorogeni rast. Ova fenotipski-različita populacija tumorogenih ćelija predstavlja ćelije slične “stem” ćelijama, ili “stem” ćelije kancera (CSCs) [23-28].

“Stem” ćelija kancera je definisana kao ćelija kancera koja ima sposobnost i da se samostalno obnovi i da bude prekursor ostalim tumorogenim ćelijama ali i da pretrpi diferencijaciju, kao bi od nje nastala fenotipski raznovrsna (netumorogena) populacija ćelija koja čini ostatak tumora [29,30].

Međutim, definitivno ćelijsko poreklo CSC ostaje nejasno. Ukoliko ove ćelije potiču od normalne “stem” ćelije, onda bi ćelije kancera mogle da preuzmu postojeće regulatorne puteve “stem” ćelije za samostalno obnavljanje. Sa druge strane, ako ove ćelije potiču od zrelih, diferentovanih ćelija, potrebne su onkogene mutacije za de-diferencijaciju i samostalno obnavljanje [22,26, 29,30].

Diskutabilno je to što zrele ćelije imaju veoma ograničen životni ciklus i, stoga, nije verovatno da bi sve potrebne mutacije mogle da se dogode tokom relativno kratkog života ovih ćelija. Nasuprot tome, neograničen kapacitet normalne “stem” ćelije za samo-obnavljanje znači da ove ćelije mogu da budu jedine ćelije koje su prisutne dovoljno dugo da bi akumulirale potrebne mutacije [22,25,26,29,30].

Iako većina normalnih ćelija u dojci ima ograničen kapacitet za samo-obnavljanje, nedavne studije su pokazale da mlečna žlezda može u celosti da bude rekonstruisana pomoću jedne epitelne “stem” ćelije [31].

Pored samo-obnavljanja, nekoliko drugih, klasičnih karakteristika normalne “stem” ćelije u velikoj meri podseća na uočeno eksperimentalno i kliničko ponašanje malignih ćelija kancera dojke, uključujući aktivaciju anti-apoptotskih puteva, povećan kapacitet za rezistenciju na lekove i potreba za tzv. “utočištem” ili mikro-okruženjem za rast tumora.

Smatra se da su “stem” ćelije otpornije nego diferentovane ćelije na agense koji oštećuju DNK zbog njihove sposobnosti da pretrpe asinhronu sintezu DNK i zbog njihovog povećanog kapaciteta za popravku DNK. Uprkos neograničenom kapacitetu za samo-obnavljanje, normalne “stem” ćelije su u relativnom stanju mirovanja i retko se dele osim ako nisu aktivirane [26,32,33] Obzirom na to da su mnogi lekovi za lečenje kancera napravljeni tako da ubijaju ćelije koje se aktivno dele, “stem” ćelije kancera mogu da ih izbegnu. Normalne "stem" ćelije opstaju u fiziološki-jedinstvenom okruženju tzv. “utočište” "stem" ćelije. Ovo utočište obezbeđuje mesto za vezivanje za "stem" ćelije preko molekula adhezije, koji vezuju "stem" ćelije za vanćelijski matriks. Utočište, takođe, stvara

spoljašnje faktore koji kontrolišu broj, rast i diferencijaciju "stem" ćelija [34-38]. U normalnim fiziološkim uslovima ono obezbeđuje finu kontrolu proliferacije, uglavnom putem zadržavanja ćelija u G0-fazi ćelijskog ciklusa i/ili uravnotežavanjem proliferacije i apoptoze tako da populacija "stem" ćelija ostane konstantna [39, 40, 41, 42].

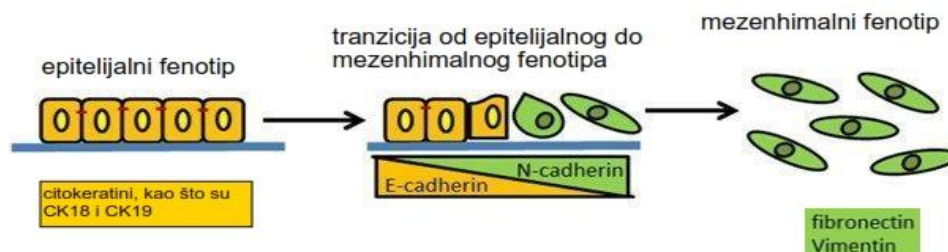
1.1.2. Epitelno mezenhimalna tranzicija (EMT)

Epitelno mezenhimalna tranzicija (EMT) predstavlja složen molekularni i ćelijski program u toku embrionalnog ravoja u kome epitelne ćelije gube svoje karakteristike diferencijacije i dobijaju mezenhimalni fenotip. Ovaj fenomen EMT je najčešće korišćena teorija koja objašnjava nastanak udaljenih metastaza porekla epitelnih ćelija, uključujući i karcinom dojke. Postoje podaci da indukcija EMT dovodi do progresije tumora usled tumorske invazije, sposobnosti za metastaziranje i rezistencije na terapiju.

Glavne karakteristike EMT-a uključuju razaranje tesnih veza (tight junctions) i posledični gubitak kontakta između ćelija. Kao rezultat ovog procesa tkiva gube svoje epitelne karakteristike i dobijaju mezenhimalnu morfologiju. Ove ćelije tada imaju veći kapacitet za obnavljanje stvarajući heterogenu subpopulaciju koja ima veliki motilitet dovodeći do odvajanja od matičnog epitelnog tkiva organa. [43,44].

Ova subpopulacija kancerskih ćelija dobija karakteristike slične stem ćelijama (stem like cells) [45], i ispoljava mezenhimalne karakteristike, migrira od primarnog tumorskog ishodišta ka udaljenom mestu metastatskom mestu. [46] Tumorske ćelije koje su prošle kroz epitelno mezenhimalnu tranziciju dobijaju neke markere na površini ćelije koje su slične kancerskim stem ćelijama. [47,48].

Morfologija mezenhimalnih ćelija je takva da su odlično adaptirane za migraciju. U toku EMT dolazi do gubitka epitelnog adhezionog protein E-kaderina i citokeratina uz dobijanje tipično mezenhimalnih molekula kao što su N-kaderin, Vimentin i fibronektin.



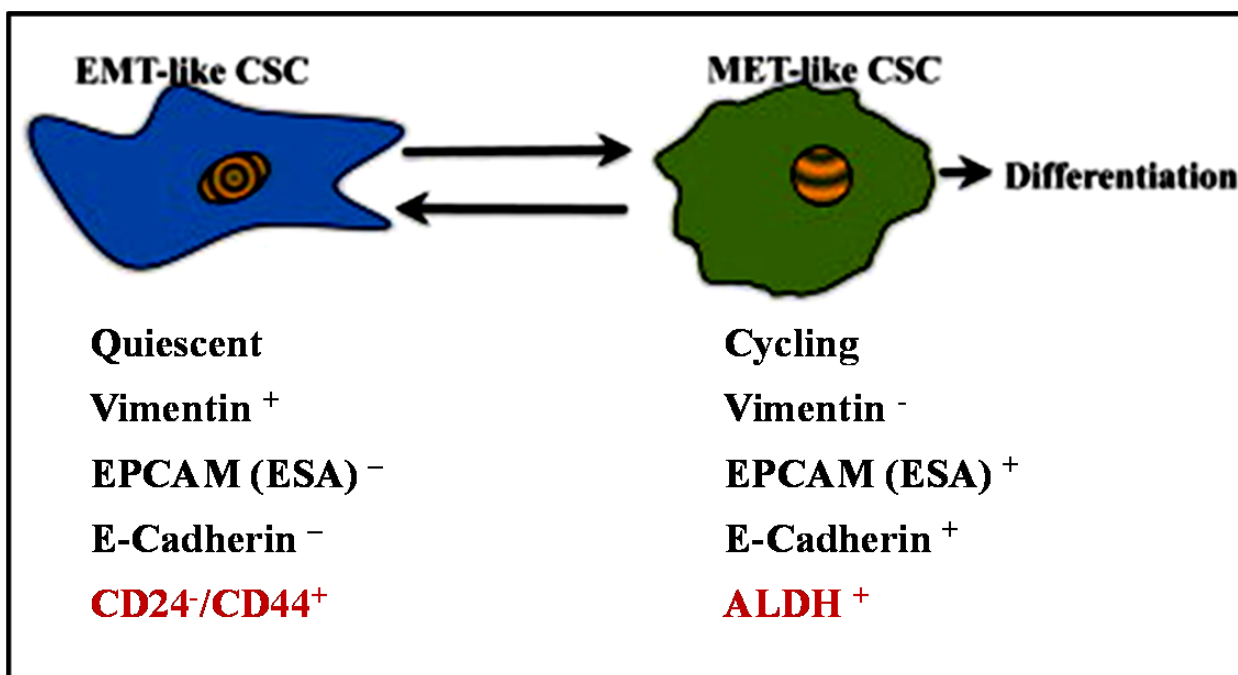
Slika 2. EMT prelaz: cadherin switching [50]

Ovaj process se naziva “cadherin switching” uz tzv. down regulaciju E-kaderina i up regulaciju N-kaderina [49,50] [Slika 2]. U nekoliko studija koje su uključivale različite podtipove raka dojke su istraživani markeri vezani za process EMT, kao što su Vimentin, N-kaderin, Snail, Slug, Twist, N-Kaderin i ekspresija citokertina, imunohistohemijskom metodom (IHC). Ekspresija ovih biomarkera je bila veća kod basal-like podtipova karcinoma dojke koji su agresivniji [45,51-54].

Aleskandarany i sar. su pokazali da je kaderinski prelaz (cadherin switch) tj. E-cadherin-/N-cadherin+ fenotip češći kod HER2+ karcinoma dojke [53].

Postoji sve više podataka da tumorske ćelije koje pokazuju osobine slične kancer stem ćelijama mogu lako da prežive hemioterapijske agenske i ciljane terapije. Fenotipski, ćelije slične stem ćelijama karcinoma dojke ekspimiraju visok nivo CD44, nizak nivo CD22 (CD44^{high}/CD24^{low}) kao i povišen nivo ALDH1 (aldehid dehidrogenaza 1) [55,56,57].

Liu i saradnici su identifikovali jedinstvenu stem ćeliju karcinoma dojke sa mezenhimalnim karakteristikama MET (mesenchymal-like BCSCs) koja ima visok nivo CD44, nizak nivo CD 24 (CD44^{high} /CD24^{low} fenotip) kao i visok nivo ALDH1 [58]. Ove MET ćelije se ne dele rapidno i lokalizovane su na marginama tumorske invazije dok se epitelnim ćelijama slične stem ćelije karcinoma dojke deli ubrazano i lokalizovane su u centralnom delu tumora [Slika 3.].



Slika 3. Plastičnost: Čelije slične stem ćelijama karcinoma dojke ispoljavaju mogućnost transformacije od EMT do MET [50]

1.1.3. Uspavanost tumora

Tokom poslednjih nekoliko decenija postignuti su veliki napredci vezani za detekciju i lečenje raka dojke. Uprkos svemu, rak dojke je i dalje najčešći tumor u ženskoj populaciji [59] i vodeći uzrok smrti, uglavnom usled metastaziranja u regionalne limfne noduse i udaljenja mesta kao što su pluća, jetra, mozak i kosti [60,61].

U koliko se primarni tumor detektuje i ukloni pre nastanka metastaza šanse za izlečenje su velike uz očekivano dugo preživljavanje bez bolesti DFI (disease-free survival). Međutim, u koliko je već došlo do diseminacije primarnog tumora, terapijska strategija uglavnom podrazumeva korišćenje citotoksičnih lekova koji često imaju ozbiljna neželjena dejstva, i često ne dovode do izlečenja bolesti. Metastatsko širenje nakon uklanjanja tumora je teško identifikovati što pacijenta dovodi u stanje neizvesnosti i zabrinutosti zbog ponovnog

javljanja bolesti koje se kod raka dojke može javiti čak i desetinama godina nakon perioda bez bolesti i završenog lečenja [62,63].

Ova obzervacija se naziva klinička uspavanost tumora i podržana je autopsijskim studijama koje su rađene na osobama koje su umrle usled nesreća ili trauma tj. na osobama koje nisu imale kancer [64,65].

U ovim studijama koje su analizirali Black and Welsh [64], in situ kancer dojke je nađen u 39% žena starosti 40 do 50 godina uprkos činjenici da je kod samo 1% žena u ovoj populaciji dijagnostikovani karcinom in situ u toku života.

Metastaziranje se definiše kao širenje ćelija kancera od primarnog tumora i stvaranje sekundarnog depozita na udaljenoj lokaciji [60,61,66].

Metastatski process se sastoji od niza kompleksnih i uzastopnih koraka a kancerske ćelije moraju uspešno da savladaju svaki korak u toj kaskadi kako bih došlo do stvaranja metastatskog tumora. Ovi koraci uključuju tzv.beg od primarnog tumora (ekstravazacija), limfnu ili hematogenu diseminaciju, preživljavanje u cirkulaciji, ekstravazaciju na sekundarnu lokalizaciju, rast i stvaranje mikrometastaza na sekundarnog lokaciji, nastavak rasta uz obezbeđivanja adekvatne vaskularizacije i stvaranje klinički detektabilne makrometastaz [60,61,66-69].

Imajući u vidu kompleksnost i veliki broj koraka kroz koji metastatska ćelija mora uspešno da prođe nije začudjujuće da mnoge kliničke i eksperimentalne studije pokazuju da je u stvari process metastaziranja veoma neefikasan process [70-74].

Eksperimentalne studije pokazuju da su rani koraci u toku hematogenog metastaziranja (intravazacija, preživljavanje, ekstravazacija) veoma efikasni i da čak 80% ćelija uspešno savlada te korake u toku metastatske kaskade. Medjutim samo će mali broj ćelija (procenjeno na oko 2%, u zavisnosti koji eksperimentalni model je korišćen) biti sposobno da započne rast na sekundarnoj lokaciji i da stvori mikrometastaze. Od ovog broja ćelija će takodje još manji broj (procenjeno na oko 0.02% u zavisnosti koji eksperimentalni model je korišćen) ćelija biti sposoban da nastavi svoj rast i da stvori makroskopske tumore [70-73].

Dakle, na osnovu eksperimentalnih modela se može zaključiti da su ovi kasni koraci u metastatskoj kaskadi veoma neefikasni. Postavljena je hipoteza da su ta dva koraka (inicijalni rast sa formiranje mikrometastaza, i nastavak rasta i formiranje makrometastaze) odlučujući u metastatskoj kaskadi u smislu formiranja uspavanih metastatskih ćelija [73,75-79].

Ova hipoteza je podržana i kliničkom obzervacijom da uprkos činjenici da se kod pacijenata sa rakom u krvotoku ali i na udaljenih lokalizacijama mogu detektovati stotine hiljada pojedinačnih diseminovanih ćelija [80], samo mali procenat progredira u smislu ispoljavanja makroskopskih metastaza [71,81,82]. Fiziološki i patološki uticaju koji dovode do prevage ka strani mirovanja ili proliferaciji i dalje nisu potpuno jasni.

Do sada je veoma poznato da pojedini tipovi karcinoma daju metastaze u specifičnim organima. Rak dojke ima poseban afinitet za metastaziranje u regionalne limfne čvorove, pluća, jetru, kosti i mozak [60].

Džejms Juing (James Ewing) je dvadesetih godina prošlog veka snatrao da je samo metastaziranje krvotokom dovoljno i odgovorno za transport tumorskih ćelija do sekundarnih lokalizacija i za organ-specifičnu implantaciju metastatskih ćelija [83]. Medjutim, nakon Juingove teorije pojavile su se teorije naspram njegove, koje su smatrale da postoji dodatni mehanizam na molekularnom nivou koji može da objasni zašto i kako se ćelija kancera zaustavljaju i započinju rast na svojim omiljenim metastatskim mestima. Glavna, centralna, teorija medju mnogim je “seed and soil” teorija, tzv. teorija plodnog tla koju je 1889 godine postavio Stephen Paget [84,85]. Pedžet je predvideo da ćelije kancera (the “seed”-seme) mogu da prežive i proliferišu samo na onim sekundarnim lokalizacijama (the “soil”-tlo) koje proizvode faktore rasta koji odgovaraju tim određenim tipovima metastatskih ćelija, i ta teorija je preživela kroz vreme [86-90].

U meta analizi publikovanih autopsijskih studija [91], Weiss je pokazao da postoji znatno veći broj metastatskih ćelija raka dojke u kostima nego što bi se očekivalo samo na osnovu analize protoka krvi. Ovo govori u prilog da su mikrosredina tj plodno tlo “soil” veoma važni u metastatskom procesu. Faktori mikrosredine na sekundarnoj lokalizaciji ne samo da

utiču na rast tumorskih ćelija, već mogu da utiču i da dovedu do uspavanosti tumora, putem supresije imunih mehanizama, angiogeneze i izmene signala u kaskadi regulacije rasta tumorskih ćelija (growth-related signaling pathways) [92-105].

Dakle, uloga mikrosredine u metastatskom procesu je značajna, posebno sa započinjanje i održavanje rasta metastatskih ćelija ali i za održavanje uspavanosti tumorskih ćelija na sekundarnoj lokalizaciji.

Studije na eksperimentalnim modelima metastaziranja su pokazale da se uspavanost može javiti na dva kritična mesta u toku razvoja metastaza na sekundarnoj lokalizaciji, u stadijumu postojanja jedne ćelije i mikrometastatskoj fazi. [75-79].

Sudbina metastatske ćelije nakon dolaska do sekundarnog mesta može ići u tri pravca; mogu da proliferiši i formiraju mikrometastaze, mogu da umru, ili mogu da budu žive ali uspavane [60,73].

Ove pojedinačne, uspavane ćelije se nalaze u produženoj G0 fazi ćelijskog ciklusa, u fazi u kojoj nema proliferacije niti apoptoze a ova uspavanost ih u stvari štiti od mnogih uobičajenih citotoksičnih lekova koji deluju samo na ćelije koje prolaze kroz ceo ćelijski ciklus [73, 75,79,106].

Još uvek nije poznato da li ove pojedinačne uspavane ćelije predstavljaju specijalizovanu subpopulaciju ćelija koje su programirane da ostanu uspavane ili ne-specijalizovanu populaciju ćelija kojoj ne odgovara određena mikrosredina za rast, ili možda kombinaciju ova dva mehanizma.

U koliko ove solitarne ćelije počnu da proliferišu i da formiraju mikrometastaze, njihova sudbina takođe može ići u tri praca: mogu da nastave sa proliferacijom i da formiraju vaskularizovane makrometastaze, mogu da umru ili mogu da nastave život kao uspavane mikrometastaze. Uspavanost na ovom nivou je rezultat balansa između proliferacije i apoptoze u okviru ćelijske populacije tako da ne dolazi do uvećanja veličine mikrometastaze [60,76,107]. Smatra se da je ovaj tip uspavanosti rezultat nemogućnosti stimulacije angiogeneze koja je potrebna za dalji rast tumora, verovatno usled zaštitnih

mehanizama mikrosredine koji sprečavaju uključivanje procesa angiogeneze (*angiogenic switch*) [65,108].

Uspavane mikrometastaze i solitarne, pojedinačne uspavane ćelije doprinose mogućoj pojavi relapsa bolesti iako su njihove karakteristike, i verovatno mehanizmi različiti.

Postoji značajan broj problema vezanih za eksperimentalno proučavanje uspavanosti ćelija, koji se uglavnom odnose na ograničen broj *in vivo* modela usled bioloških i tehničkih problema vezanih za identifikaciju, kvantifikaciju i praćenje pojedinačnih uspavanih ćelija i malih uspavanih mikrometastaza.

Sa biološke tačke gledišta, heterogena priroda kancerskih ćelija nosi sa sobom određene probleme zbog toga što subpopulacija pojedinačnih uspavanih ćelija i ćelija koje su aktivne, rastu i formiraju mikrometastaze koegzistiraju u istom organu [70,73, 79, 109], uz prisutnu destrukciju okolnog tkiva, otežavajući praćenje jedne ćelijske populacije kroz vreme. Takođe, ćelijska populacija tumora sadrži zajedno neangiogenu i angiogenu subpopulaciju ćelija [110,111]. Nekoliko studija su uspele da pokažu prisustvo solitarnih uspavanih ćelija *in vivo* koristeći fluorescentne markere, negativna histološka bojenja za proliferaciju i markere za apoptozu (i.e. Ki67, TUNEL) [70,73,75,79,106,109,112-114]. Detekcija uspavanih mikrometastaza je manje tehnički zahtevna od detekcije pojedinačnih uspavanih ćelija. Tehnologija vizualizacije tumorskih ćelija koji vrše ekspresiju luciferaze (luciferase-expressing tumor cells) omogućava praćenje uspavanih tumora u realnom vremenu, kao i analizu angiogenog prelaza [115]. Na žalost ova tehnika još uvek ne može da se koristi za vizualizaciju uspavanih mikrometastaza kod pacijenata ali je u toku razvoj NMR visoke rezolucije [109,116] i trodimenzionalnog visoko frekventnog ultrazvuka [117] koji pokazuju obećavajuće rezultate za kliničku primenu.

Klinički dokazi za postojanje uspavanih tumora

Iako se klinička uspavanost tumora može javiti kod svih karcinoma, najjači dokazi se odnose na non-Hodgkinov limfom [118,119], karcinom bubrega [120], melanom [121], i rak dojke [122,123]. Do skoro je uspavanost tumora raka dojke bila podcenjivana [123] i

definisana u kliničkoj praksi kao DFI (disease free survival - period bez bolesti) tj period od momenta inicijalnog lečenja raka dojke do pojave relapsa bolesti. Prisustvo bolesti bez njegove kliničke manifestacije je u stvari veoma često kod raka dojke a podržano je broj autopsijskim studijama [6,7] i činjenicom da pacijenti sa naizgled lokalizovanom bolešću (na osnovu sadašnjih kliničkih parametara) imaju pojedinačne tumorske ćelije u koštanoj srži i ili krvi [124-130]. Brojne studije su pokazale da je postojanje izolovanih tumorskih ćelija u koštanoj srži nezavistan prognostički faktor i da oko 30% pacijenata sa rakom dojke imaju mikrometastaze u koštanoj srži u momentu postavljanja dijagnoze. Medjutim od ovog broja će samo 30–50% pacijenata razviti klinički evidentne mikrometastaze u toku petogodišnjeg praćenja [131-137]. Ove obzervacije i činjenice ukazuju na progresiju bolesti od uspavane minimalne rezidualne bolesti ka klinički evidentnoj bolesti utiču najpre fenotipske karakteristike pojedinačnih diseminovanih ćelija, faktori mikrosredine i ili karakteristika pacijenata (npr imuni odgovor), ili interakcija ovih faktora.

1. 2. Faktori prognoze/predikcije toka bolesti za primarni karcinom dojke

Prognostički i prediktivni faktori u svakodnevnoj praksi služe za stratifikaciju bolesnika u dve grupe: prvu, sa bolesnicima za koje se očekuje da će imati benefit od adjuvantne sistemske terapije, u koju su uključeni i bolesnici sa limfonodalnim metastazama, kao i podgrupa bolesnika sa negativnim limfnim nodusima; i drugu, sa bolesnicima kod kojih rizik i troškovi adjuvantne terapije prevazilaze očekivani benefit iste [138]. U tom smislu treba razlikovati ova dva pojma.

Prognostički faktor je varijabla koja pokazuje da su neke heterogenosti tumora i domaćina povezane sa prirodnim tokom bolesti i njenim ishodom, a u odsustvu terapije. U tom smislu predstavlja marker značajan za relaps bolesti.

Sa druge strane, *prediktivni faktor* je termin koji se obično koristi u kontekstu odgovora tumora na neki terapijski pristup. Ovi faktori zavise od karakteristika samog tumora, kao i karakteristika bolesnika, a njihova identifikacija nam može pomoći u određivanju najboljeg terapijskog modaliteta za svakog bolesnika individualno. Naročito je važna identifikacija visokorizične grupe bolesnika.

Neki faktori, kao npr. status estrogenskih i progesteronskih receptora, ili Her2/neu genska amplifikacija i/ili prekomerna ekspresija su i prediktivni i prognostički faktori.

U rutinskoj kliničkoj praksi, u upotrebi je nekoliko dobro poznatih prognostičkih i prediktivnih faktora koji su važni u izboru terapijskog režima [139-141]. To su: status limfnih čvorova pazušne jame, veličina tumora, histološki tip i gradus tumora, limfovaskularna invazija, status receptora za estrogen i progesteron, Her2/neu status, starost i menopauzni status bolesnice. Pored njih, definisani su i faktori koji se ne koriste u svakodnevnoj praksi ali mogu da imaju prognostički uticaj kod bolesnika sa karcinomom dojke [142-144]. Tu spadaju: povećana ekspresija UPA i njegovog inhibitora PAI-1, detekcija mikrometastaza u kostnoj srži u trenutku postavljanja dijagnoze, markeri invazije i angiogeneze i dr.

1. 2. 1. Klasični faktori prognoze/predikcije toka bolesti

Klasični faktori prognoze/predikcije toka bolesti se mogu podeliti na one vezane za karakteristike tumora i one vezane za karakteristike domaćina tumora (bolesnika).

1.2.1.1. Parametri tumora

U patohistološke parametre tumora spadaju: status limfnih čvorova pazušne jame, veličina tumora, histološki tip i gradus tumora i limfovaskularna invazija.

U daljem tekstu će svaki od navedenih parametara bit posebno obrađen.

1.2.1.1.1. Status limfnih čvorova pazušne jame

Status limfnih čvorova pazušne jame se obično procenjuje intraoperativno metodom biopsije sentinel limfnih čvorova ili nakon disekcije pazušne jame, obzirom da je klinička evaluacija neprecizna. Definiše se kao broj pozitivnih u odnosu na ukupan broj limfnih čvorova dostavljenih na pregled. Veličina metastatskih depozita u limfnom čvoru definiše se kao:

- izolovane tumorske ćelije (ITC), ako su metastaze $\leq 0.2\text{mm}$,

- mikrometastaze, ako su metastaze $>0.2\text{mm}$, a $\leq 2\text{mm}$, i
- makrometastaze, ako su metastaze $>2\text{mm}$.

Prisustvo, odnosno odsustvo metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame predstavlja najznačajniji prognostički faktor kod karcinoma dojke [145,146]. Recidivi karcinoma dojke, prema nekim podacima u literaturi, javе se kod 20-25% pacijentkinja bez zahvaćenih limfnih čvorova u pazušnoj jami u 10-godišnjem periodu od primarnog lečenja, a kod 75% pacijentkinja sa aksilarnim limfonodalnim metastazama [147]. Ipak, značajnijaprognostička informacija dobija se na osnovu broja metastatskih limfnih čvorova nego na osnovu samog prisustva/odsustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima [148].

Pacijenti se prema broju zahvaćenih limfnih čvorova razvrstavaju u 4 grupe [149]:

- I grupa, sa 0 zahvaćenih limfnih čvorova,
- II grupa, sa 1 do 3 pozitivna limfna čvora,
- III grupa, sa 4 do 9 pozitivnih limfnih čvorova,
- IV grupa, sa 10 i više pozitivnih limfnih čvorova.

Većina studija pokazala je da postoji povezanost između broja zahvaćenih limfnih čvorova i verovatnoće za pojavu relapsa bolesti, kao i preživljavanja [145, 150]. Procenat recidiva u prvih 5 godina od inicijalnog onkološkog lečenja karcinoma dojke raste od 19.4% kod pacijentkinja bez limfonodalnih metastaza do 82.2% kada su zahvaćeni 21 ili više limfnih čvorova, dok odgovarajuće 5-godišnje stope preživljavanja padaju sa 71.6% na 22.2% [151]. Prognostički značaj aksilarnih metastaza se održava i u studijama u kojima je kod pacijentkinja primenjena preoperativna hemioterapija [152]. Položaj zahvaćenih limfnih čvorova (aksilarni nivo I, II ili III), veličina intranodalnih metastaza (mikroskopske, makroskopske) i prisustvo ektranodalne ekstenzije su takođe prognostički značajni parametri, ali ipak sa manje značaja u odnosu na broj metastatskih limfnih čvorova [153,154].

Status limfnih čvorova pazušne jame je parametar koji se uzima u obzir pri odlučivanju o primeni adjuvantne sistemske terapije [155]. Adjuvantno lečenje, prema preporukama,

indikovano je kod svih pacijenata sa pozitivnim aksilarnim limfnim čvorovima jer kod njih stope recidiva u 10-godišnjem periodu dostižu 70% [156].

Iako su u slučaju operabilnih pacijenata metastaze u pazušnoj jami najvažnija determinanta prognoze bolesti, brojni pacijenti sa metastazama su živi i bez recidiva i nekoliko godina nakon hirurške terapije. Sa druge strane, približno 25% pacijenata bez metastaza ne bude izlečeno lokalno-regionalnom terapijom, što ukazuje na to da je status limfnih čvorova pazušne jame nepotpun pokazatelj sistemske bolesti [157,158].

1.2.1.1.2. Veličina tumora

Veličina tumora predstavlja najveću dimenziju tumora, nakon merenja u najmanje dva pravca [159]. Razlikuju se makroskopska i mikroskopska (histopatološka, pT) veličina tumora, ali je mikroskopska ona koja može preciznije odrediti invazivnu komponentu tumora, a samim tim je i kao parametar pouzdanija za prognozu. Naime, grupa autora je pokazala da su među pT1N0 pacijentima, oni slučajevi kod kojih je tumor bio makroskopski „mali“ a mikroskopski „veliki“ imali lošije preživljavanje bez znakova udaljene bolesti u odnosu one sa suprotnim karakteristikama tumora – 77% vs. 100%, respektivno [160].

Veličina tumora predstavlja funkciju vremena tokom koga tumor raste, odnosno funkciju brzine rasta tumora [161]. Ona je u direktnoj korelaciji sa verovatnoćom za nastanak regionalnih metastaza, kao i sa brojem zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova [146,150]. I broj udaljenih metastaza raste sa povećanjem veličine tumora, te je veličina tumora u direktnoj korelaciji sa verovatnoćom za pojavu relapsa bolesti i smrtni ishod [162]. Međutim, ni tumori iste veličine ne moraju imati istu brzinu rasta, proliferativne karakteristike malignih ćelija i agresivnost [163].

Veličina tumora je od posebnog interesa u grupi pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova. Prema podacima SEER (*engl. Surveillance, Epidemiology and End Results*), na uzorku od preko 13 000 pacijentkinja sa karcinomom dojke i nezahvaćenim limfnim čvorovima, pokazano je da su one sa tumorima manjim od 1cm

imale ukupno 5-godišnje preživljavanje od skoro 99%, u poređenju sa 89% kod tumora između 1 i 3cm i 86% za tumore između 3 i 5cm [145]. Ova povezanost je primećena i kod dužeg praćenja pacijenata. 20-godišnje preživljavanje bez znakova bolesti kod T1/T2N0M0 pacijentkinja iznosilo je 88% za tumore manje ili veličine 1cm, 72% za tumore veličine od 1.1 do 3cm, odnosno 59% za tumore veličine od 3.1 do 5cm [164]. Pored toga, medijana vremena do progresije bolesti je kraća što je veći tumor [165].

Veličina tumora je, dakle, prediktivni faktor za status limfnih čvorova pazušne jame, ali i nezavistan prognostički faktor kod pacijenata sa negativnim statusom limfnih čvorova. Rutinski se koristi pri odlučivanju o primeni adjuvantne sistemske terapije. Pacijenti sa negativnim aksilarnim limfnim čvorovima i tumorima veličine do ili 1cm predstavljaju grupu sa najpovoljnijom prognozom bolesti koji ne bi imali značajne koristi od primene adjuvantne sistemske terapije [166]. Generalno, za pacijente sa tumorima 1-2 cm treba razmotriti primenu adjuvantne terapije jer kod njih postoji rizik za pojavu udaljenih metastaza od preko 20% [167].

Sa druge strane, u slučaju pozitivnog statusa limfnih čvorova pazušne jame, veličina tumora nije nezavisan parametar prognoze [151].

1.2.1.1.3. Histološki tip tumora

U skladu sa preporukama Svetske zdravstvene organizacije [168], invazivni karcinomi se, na osnovu porekla malignih ćelija, mogu podeliti na invazivne duktalne karcinome (IDC) i invazivne lobularne (ILC) karcinome. Uprkos ovoj podeli, maligni tumori oba tipa nastaju iz iste regije dojke - terminalne duktalno-lobularne jedinice [169].

Prema histološkoj slici i imunohistohemijском profilu razlikuju se [170,171]:

- Invazivni duktalni karcinom
- Morbus Paget
- Invazivni lobularni karcinom
- Tubularni karcinom

-
- Kribriformni karcinom
 - Adenoid cistični karcinom
 - Mucinozni (koloidni) karcinom
 - Endokrini tumori
 - Karcinoid
 - Medularni karcinom
 - Papilarni karcinom
 - Lymphoepithelioma-like karcinom
 - Acinic cell karcinom
 - Maligni mioepiteliom (mioepitelni karcinom)
 - Retki tipovi karcinoma (metaplastični, apokrini, lipid-rich, sebacealni, sekretorni, clear-cell, karcinom sa džinovskim ćelijama tipa osteoklasta, karcinom dojke sa horiokarcinomskim karakteristikama, melanotični karcinom).

Definisana su tri tipa invazivnih karcinoma na osnovu zastupljenosti karakteristične histološke slike [171,173]:

Specijalni tip - karakteristična histološka slika čini 90% karcinoma, bolja prognoza.

Tip koji nije drugačije specificiran – najčešći, karakteristična histološka slika zastupljena sa manje od 50%.

Mešoviti tip - relativno često zastupljen, u više od 50%, ali manje od 90% tumora zastupljene karakteristike specijalnog tipa.

Brojne studije o prognostičkom značaju histološkog tipa karcinoma dojke su dale kontradiktorne rezultate [174,175]. Za najčešće histološke tipove karcinoma dojke (IDC i ILC) nije nađena korelacija sa pojavom udaljenih metastaza. Za nekoliko posebnih histoloških tipova karcinoma dojke, kao što su mucinozni, tubularni, papilarni i tipični medularni, pokazano da korelišu sa manjim rizikom za rasejavanje malignih ćelija, te da imaju povoljniju prognozu kod N0 grupe pacijenata, dok pacijenti sa atipičnim medularnim karcinomom imaju lošiju prognozu [176-179]. Ipak, ovi specifični tipovi karcinoma čine mali procenat, tačnije manje od 6 % svih invazivnih karcinoma [180].

1.2.1.1.4. Histološki gradus tumora

Usled nesavršenosti statusa limfnih čvorova i veličine tumora kao faktora prognoze/predikcije toka bolesti, u kliničku praksu je uveden novi parametar - histološki gradus tumora- kako bi se adekvatnije procenila prognoza bolesti i optimizovalo lečenje pacijenata [181].

Histološki gradus tumora obuhvata dve, međusobno nezavisne osobenosti malignih ćelija: proliferativnost i diferentovanost [182]. Proliferativnost je izražena kroz prisustvo/odsustvo malignih ćelija u mitozu, ćelija sa hiperhromatizmom i ćelija koje pokazuju pleomorfizam. Diferentovanost je izražena kroz prisustvo/odsustvo sposobnosti malignih ćelija da obrazuju tkivo (tubularne strukture) dojke. Diferentovanost tumora je morfološki pokazatelj agresivnosti tumora [183].

U pokušaju da se poboljša neusaglašenost koje je bila prisutna između nalaza različitih patologa, predloženi su višegradni sistemi za gradiranje tumora.

Najčešće se koristi Nottingham sistem gradiranja [184] koji je Elston-Ellis modifikacija Scarff-Bloom-Richardson sistema gradiranja [185]. Prema ovom sistemu, gradus skor se izračunava evaluacijom tri elementa:

- a - procenat zastupljenosti tubularnih struktura (skor 1 - 3);
- b - nuklearni pleomorfizam/atipija (skor 1 - 3);
- c - broj mitozu (skor 1 - 3).

Sumiranjem ovih skorova, dobija se ukupni gradus skor koji može biti u opsegu od 3 do 9, a shodno njemu, definišu se gradusi tumora:

- Gradus I (ukupni skor 3, 4 ili 5) - dobro diferentovani tumori; niska proliferativnost i visokadiferentovanost malignih ćelija;
- Gradus II (ukupni skor 6 ili 7) - umereno diferentovani tumori; niska proliferativnost i niskadiferentovanost ili visoka proliferativnost i visoka diferentovanost malignih ćelija;

- Gradus III (ukupni skor 8 ili 9) - slabo diferentovani tumori; visoka proliferativnost i niskadiferentovanost malignih ćelija.

Većina studija je potvrdila da pacijenti čiji su tumori visokog gradusa, odnosno slabo diferentovani, imaju veći rizik za relaps bolesti od onih čiji su tumori niskog gradusa, odnosno dobro diferentovani [186].

Histološki gradus je značajan prognostički faktor i za ukupno preživljavanje, kako za pacijente sa pozitivnim, tako i za pacijente sa negativnim statusom limfnih čvorova [149]. Ustanovljeno je da adjuvantna hemioterapija dovodi do značajnog poboljšanja toka bolesti i u grupi pacijenata sa negativnim i u grupi pacijenata sa pozitivnim statusom limfnih čvorovima koji imaju slabo diferentovane tumore, u poređenju sa odgovarajućim pacijentima koji imaju dobro diferentovane tumore [187]. Dakle, visok histološki gradus može da ukaže na bolji odgovor pacijenta na adjuvantnu hemioterapiju.

Najveći prognostički značaj, međutim, ima kombinacija tri do sada opisana faktora: statusa limfnih čvorova pazušne jame, veličine tumora i histološkog gradusa [188].

Povezivanje stadijuma bolesti sa histološkim gradusom tumora omogućava definisanje dve dijametralnosuprotne grupe pacijenata u pogledu prognoze bolesti, odnosno vremena do pojave relapsa bolesti:

- jedne, sa najmanjim rizikom, u kojoj su pacijenti sa tumorima manjim od ili jednakim 2 cm, bezmetastaza u limfnim čvorovima pazušne jame i histološkog gradusa I,
- druge, sa najvećim rizikom, u kojoj su pacijenti sa tumorima većim od 5 cm, sa metastazama u četiri ili više limfnih čvorova i histološkog gradusa III.

Ipak, najveći broj primarno operabilnih pacijenata sa karcinomom dojke, oko 66%, može se svrstati u intermedijarni stadijum bolesti, sa intermedijarnim histološkim gradusom tumora – gradus II [189].

Rezultati studija su kontradiktorni kada je u pitanju prognoza bolesti za pacijente sa tumorima histološkog gradusa II. Sa obzirom na nedovoljnu pouzdanost prognostičkog značaja histološkog gradusa tumora, predložena je upotreba dodatnih biomarkera - biohemijskih faktora prognoze/predikcije toka bolesti.

1.2.1.2.5. Limfovaskularna invazija

Pokazano je da je limfovaskularna invazija (LVI) jak prediktor za zahvaćenost limfnih čvorova pazušne jame. Prema podacima jedne studije [160], 10% pacijenata bez LVI ima metastaze u limfnim čvorovima pazušne jame, a od pacijenata sa potvrđenom LVI njih 52%. Osim toga, LVI je i prognostički značajna za udaljenu progresiju bolesti kod pacijenata sa negativnim statusom limfnih čvorova pazušne jame, koji nisu imali adjuvantnu sistemsku terapiju. 10-godišnje preživljavanje bez udaljenih metastaza iznosi 89% za pacijente bez LVI, a 69% za pacijente sa LVI [160].

1.2.1.2.6. Indeks proliferativnosti ćelija Ki67

Ki-67 je jedarni protein koji se dovodi u vezu sa ćelijskom proliferacijom. Otkriven je od strane Gerdes i sar. tokom ranih osamdesetih godina koristeći mišija monoklonska antitela usmerena ka jedarnim antigenima ćelijske linije Hodgkinovog limfoma. [190]

Najzastupljeniji način analize Ki-67 je imunohistohemijski metod. Poznato je da do ekspresije antigena na Ki-67 protein dolazi u svim fazama ćelijskog ciklusa dolazi u G0 fazi. [191,192]. U uzorcima normalnog tkiva dojke Ki-67 se eksprimira u niskom procentu (<3 % ćelija) kod ER negativnih ćelija. [193] Imunohistohemijskim bojenjem sa monoklonskim antitelom Ki-67 moguće je proceniti stepen proliferativnosti populacije neoplastičnih ćelija.

Meta analiza rađena na 12,155 pokazala je da Ki-67 pozitivnost ukazuje na visok rizik od pojave relapsa bolesti i lošije preživljavanje pacijenata sa rakom dojke. Na konferencijama u St.Gallenu 2011.i 2013.godine Ki-67 je preporučen za određivanje stepena proliferativnosti i razlikovanje luminal A od luminal B karcinoma dojke [194–196], Većina panelista St.Gallen koncenzus konferencije održane 2013.godine su se složili da Ki-67 treba uzeti u obzir pri donošenju odluke o primeni adjuvantne hemioterapije kod pojedinačnih pacijenata. [196].

1.2.1.2. Parametri domaćina tumora – godine i status menopauze

Analiza parametara domaćina tumora, kao faktora prognoze primarnog karcinoma dojke, pokazala je značajnu neusaglašenost rezultata [163,197-199]. To je dovelo do potrebe za napuštanjem pojednostavljenih analiza prognostičkog značaja godina i statusa menopauze domaćina tumora u sklopu podela na mlađe, odnosno pacijentkinje starije od 50 godina, kao i premenopauzne, odnosno postmenopauzne pacijentkinje, a definisanjem međusobnog odnosa godina i statusa menopauze [200]. Tako je starost pacijentkinja direktno povezana sa statusom menopauze. Naime, pacijentkinje mlađe od 45 godina su uglavnom premenopauzne, one starije od 59 godina postmenopauzne, a pacijentkinje starosne dobi između 45 i 59 godina mogu biti premenopauzne i postmenopauzne.

Pretpostavlja se da su karcinomi dojke koji se javljaju u mlađoj, odnosno starijoj životnoj dobi, biološki zapravo različiti entiteti, te se, stoga, i „prirodan“ tok bolesti kod mlađih i starijih pacijentkinja značajno razlikuje [201]. Dva relativno velika trajala pokazala su da pacijentkinje mlađe od 35 godina, kao poseban entitet, imaju izrazito nepovoljniju prognozu bolesti, čak i posmatrano u kontekstu sa ostalim prognostičkim parametrima [202-204].

1. 2. 2. Biohemijski faktori prognoze/predikcije toka bolesti

1.2.2.1. Status receptora za estrogen i receptora za progesteron

Receptor za estrogen (ER), tačnije receptor za estrogen alfa (obeležava se i kao ER- α) i receptor za progesteron (PR) su najviše izučavani biohemijski parametri prognoze/predikcije toka bolesti pacijenata obolelih od karcinoma dojke [205,206]. Poznato je da 50 - 80% pacijenata obolelih od karcinoma dojke sadrže merljive koncentracije ER. PR se, uglavnom, eksprimira zajedno sa i pri višim koncentracijama ER, a ustanovljeno je i da približno 5% pacijenata obolelih od karcinoma dojke ima tumore sa merljivim koncentracijama PR u kojima, istovremeno, nije eksprimiran i ER [161].

Značaj ekspresije ER i PR u prognozi i predikciji toka bolesti pacijenata obolelih od karcinoma dojke ispitan je poslednjih tridesetak godina, uglavnom, u okviru “pozitivnog” i “negativnog” statusa receptora [161,207,208]. Sa obzirom na to da je granična vrednost za definisanje pozitivnog/negativnog statusa steroidnih receptora arbitrarna i da obuhvata interval od 3 do 20 fmol/mg proteina malignog tumora dojke, kao i da su niske koncentracije steroidnih receptora (do 50 fmol/mg proteina) najzastupljenije u raspodeli koncentracija steroidnih receptora [161], razumljiva je i neusaglašenost rezultata u objavljenim radovima koja se tiče njihovog značaja.

Status ER i PR u karcinomu dojke predstavlja i faktor prognoze i faktor predikcije tokaboolesti pacijenta.

Prognostički značaj ER i PR u karcinomu dojke se može ispitivati uslučajevima kada su pacijenti oboleli od karcinoma lečeni samo hirurškom terapijom [167]. U NSABP studiji, jednoj od najznačajnijih studija o prognostičkom značaju ER, u okviru koje pacijentkinje obolele od kancera dojke u ranoj fazi nisu primale adjuvantnu sistemsku terapiju [209], utvrđeno je da su pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER u tumorima imale verovatnoću od 0.74 za vreme do pojave relapsa bolesti i verovatnoću od 0.92 za ukupno preživljavanje, u toku prvih 5 godina praćenja toka bolesti, dok su one sa negativnim statusom ER u tumorima, u istom periodu, imale odgovarajuće verovatnoće od 0.66 i 0.82, respektivno. Studije sa dužim intervalom praćenja toka bolesti su ukazale da se povoljna prognoza toka bolesti, koja je povezana sa tumorima sa pozitivnim statusom ER, ne održava tokom vremena. Tako je Hilsenbeck ustanovio da je prognoza toka bolesti pacijenata sa pozitivnim statusom ER povoljnija tokom prve 3 godine praćenja toka bolesti, ali ne i posle toga [210]. Studije ukazuju da je status ER slab pokazatelj prognoze toka bolesti i da, kada se statusi ER i PR analiziraju zajedno, status PR ne doprinosi značajno povećanju prognostičke vrednosti statusa ER [205].

Status ER/PR u karcinomima dojke je, međutim, moćan faktor predikcije toka bolestipacijenata koji ukazuje na efikasnost adjuvantne hormonske terapije [167]. Klinički značaj ER se odnosi principijelno na činjenicu da njegovo prisustvo identifikuje tumore koji su osetljivi na delovanje estrogena. Ustanovljeno je da približno 55% pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke, koje imaju pozitivan status ER, povoljno odgovaraju na

adjuvantnu hormonsku terapiju [211], u smislu da pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER u tumorima imaju duži interval do pojave relapsa bolesti nakon primarne terapije, duže preživljavanje nakon pojave relapsa i značajno bolje ukupno preživljavanje, u poređenju sa pacijentkinjama koje imaju tumore sa negativnim statusom ER. Ukoliko tumori pacijentkinja, pored ER, sadrže i PR, odgovor na neku vrstu adjuvantne hormonske terapije je prisutan kod 75 - 80% pacijentkinja [161,212].

Iz ovoga se može zaključiti da se status steroidnih receptora optimalno može koristiti kao faktor predikcije za efikasnost adjuvantne hormonske terapije (tamoksifen) [213]. Sve pacijentkinje sa pozitivnim statusom steroidnih receptora, koje je opravdano lečiti adjuvantnom sistemskom terapijom, trebalo bi da budu lečene hormonskom terapijom, osim ako postoje kontraindikacije.

Kao potencijalni faktori prognoze/predikcije toka bolesti, predloženi su brojni molekularni biomarkeri ili zato što su oni direktna meta terapije ili zato što njihova ekspresija predstavlja sekundarni fenomen u mehanizmu delovanja terapije [155].

1.2.2.2. HER-2 status

HER2 ili HER2/neu (engl. human epidermal growth factor receptor 2) je protein koji se postoji na površini pojedinih ćelija raka dojke. Kodira ga protoonkogen ERBB2, lociran na dugom kraku hromozoma 17 (17q12). HER2/neu onkogen je amplifikovan i/ili prekomerno ekspimiran kod približno 20% karcinoma dojke [214] i snažan je prognostički faktor za recidiv i loše opšte preživljavanje, naročito kod pacijenata sa pozitivnim aksilarnim statusom [215,216].

HER2 protein ima važnu ulogu u rastu i preživljavanju ćelija. Obzirom da je jedan od faktora koji određuju terapijski pristup u lečenju raka dojke, HER2 status se rutinski određuje kod svakog invazivnog karcinoma dojke [217]. Za određivanje HER2 statusa koriste se [218]:

1. Imunohistohemija (IHH): dodavanje antitela na HER2 protein dovodi do promene u boji uzorka, što se posmatra mikroskopom i označava kao 0, 1+, 2+, ili 3+. Ovom metodom se određuje zapravo broj HER2 proteinskih receptora u ćelijama raka.

2. Metode hibridizacije: određuje se broj HER2 gena u ćelijama raka

- Fluorescentna *in situ* hibridizacija (*engl.* fluorescent in situ hybridization, FISH): dodavanje fluorescentnih delića DNK koji se specifično vežu za kopije HER2/neu gena u ćelijama, a potom se kopije gena prebrojavaju pod specijalnim mikroskopom.
- Hromogenska *in situ* hibridizacija (*engl.* chromogenic in situ hybridization, CISH): slično kao kod FISH metode, dodaju se delići DNK, ali se posmatra promena u boji, što ne zahteva specijalni mikroskop i redukuje troškove analize.
- Dvostruka *in situ* hibridizacija (*engl.* dual ISH). Test je odobren od strane Američkog FDA u junu 2011. godine

FISH test je precizniji od IHH, ali je skuplji i duže traje obrada, tako da se rezultati više čekaju [218]. U praksi se najčešće koristi IHH za određivanje HER2 statusa, a ukoliko su rezultati nekonkluzivni (HER2 2+), primenjuje se FISH metoda. U nekim ustanovama se i rezultat HER2 3+ testira dodatno FISH metodom.

Karcinomi dojke kod kojih je pojačano eksprimiran HER2 (HER2 3+) nazivaju se HER2 pozitivni, a ostali (HER2 0 ili 1+) HER2 negativni. HER2 negativni karcinomi nemaju ciljanu terapiju. Sa druge strane, HER2 pozitivni karcinomi mogu biti lečeni ciljanim molekulskim agensima kao što su trastuzumab (Herceptin[®]) i lapatinib (Tykerb[®]) [218, 219].

Pozitivan HER2 status snažan je prediktor: dobrog odgovora na lečenje anti-HER2 monoklonalnim antitelom trastuzumabom, rezistencije na alkilizirajuće hemioterapeutike, potrebe za višim dozama hemioterapije, benefita od adjuvantne terapije antraciklinima i rezistencije na tamoksifen [220].

1. 3. Katepsin D

1.3.1. Osnovne informacije o katepsinu D

Katepsini se u zavisnosti od pozicije amino kiseline dele u tri velike grupe: serinske proteaze (A,G), cisteinske protease (B, C, H, F, K, L, O, S, V, i W) i aspratanske proteaze (D, E) [221].

Njihova glavna uloga je razgradnja proteina i peptida u lizozomima u kiseljoj sredini (nizak pH). Prvi put termin katepsin korišćen je od strane Wilstattera i Bammana [222] još 1928. godine a njegovu ulogu u karcinomu dojke prvi put su opisali Westly i Rochefort [223] 1980.godine. Katepsin D se može javiti u vidu tri izoforme :1) neaktivna, pro-katepsin D (52 kDa),2) intermedijarna, aktivna izoforma (48 kDa) i 3) stabilna, aktivna izoforma koja se sastoji od teškog (34 kDa) i lakog lanca (14 kDa).

Katepsin D pripada A1 familiji aspratanskih proteaza, tj.familiji kojoj pripada većina endoproteza u ljudskom organizmu [224]. Nalaze su u skoro svim ćelijama u okviru lizozoma osim u eritrocitima [224,225]. Do sada nije izolovan njegov inhibitor [226]. Na kratkom kraku hromozoma 11 se nalazi gen koji kodira ovaj protein [227]. Najpre se sintetiše u obliku pre-pro-katepsina D koji se sastoji od 412 amino-kiselinskih ostataka. Nakon prvog proteolitičkog cepanja nastaje pro-katepsin D, molekul sa 392 amino-kiseline i molekulskom masom od 52 kDa [228]. Nakon glikolizovanja u endoplazmatskom retikulumu on se transportuje do Goldžijevog kompleksa [229]. Aktivacija pro katepsina D se događa u lizozomima pri kiselom pH nakon uklanjanja pro-peptida stvarajući na taj način pseudo-katepsin D čiji je C-terminalni deo povezan za zrelim enzimom. [224, 230]. Daljim proteolitičkim delovanjem drugih lizozomskih peptidaza nastaje funkcionalni katepsin D koji predstavlja jednolančanu, intermedijarnu izoformu [231] koja se sastoji od 348 aminokiselinskih ostataka, molekulske mase 48 kDa [224]. Intermedijarna forma se potom transformiše u zrelu formu koga čine laki i teški lanac koji su povezani hidrofobnom vezom a potom daljom transformacijom nastaje zrela izoforma dvolančanog katepsina D, koja je sastavljena od 337 aminokiselinskih ostataka [232]. U normalnim uslovima u

tkivima se pro-katepsin D nalazi u tragovima a preko 90% katepsina D se nalazi u intermedijarnoj izoformi u zrelom, dvolančanom obliku [233]. Brojne studije su pokazale da se u ćelijama karcinoma dojke katepsin D nalazi u koncentraciji čak i do 50 puta većoj u odnosu na normalno tkivo dojke [234-237].

1.3.2. Funkcija katepsina D

Katepsin D pripada proteazama i ima svoju ulogu u normalnim ali i patološkim ćelijskim procesima. Proteolitičkim delovanjem on je sposoban da aktivira prekursore enzima, faktore rasta ali i da učestvuje u regulaciji programirane ćelijske smrti [230,238-240]. Dobro je poznata činjenica da katepsin D ispoljava proteolitičku aktivnost u kiseloj sredini ali brojne novije studije su potvrdile njegovu aktivnost i u baznim sredinama, što govori u prilog njegove aktivnosti i izvan lizozomskog kompleksa [241]. Uloga katepsina D ispitivana je u Alchajmerovoj bolesti i aterosklerozi ali najviše u karcinomu dojke obzirom da je pro-katepsin D, prekomerno eksprimiran u karcinomu dojke. Nekoliko studija je ukazalo da katepsin D utiče na proliferaciju ćelija karcinoma dojke i postavljene su brojne hipoteze koje objašnjavaju njegovu ulogu u kancerogenezi [168]. Pokazano je da je mitogena aktivnost rezultat vezivanja aktivacionog peptida prokatepsina D za površnu ćelija kancera, tj domena između aminokiselina na pozicijama 27 i 44 [242,243]. Uprkos brojnim istraživanjima koja su ukazivala na važnost receptorskog kompleksa pro-katepsina D M6P/M6P-R još uvek nije izolovan receptor koji učestvuje u aktivaciji proliferacije kancerskih ćelija [244,245]. Mnoge studije su ukazale da pro-katepsin D pored proliferativne uloge ima uticaja i na procese kancerske invazije, stimulacije angiogeneze, regulaciji apoptoze i metastaziranja [246-250].

1.3.3. Katepsin D kao faktor prognoze/predikcije toka bolesti

Brojne kliničke studije su pokazale da je koncentracija katepsina D u citosolu karcinoma dojke nezavisan prognostički/prediktivni parametar [251-259] i da je pokazatelj loše prognoze za pacijentkinje obolele od raka dojke [253,258-263]. Visoka koncentracija katepsina D u tkivu tumora dojke povezana sa povećanom verovatnoćom za invazivni rast tumora i za nastanak metastaza, imajući u vidu da on stimuliše rast mikrometastaza na

udaljenim mestima i da ne vrši lokalnu invaziju razaranjem bazalne membrane [247,251,255,264-267]. U većini studija je prekomerna ekspresija katepsina D bila povezana sa kraćim DFI i sa kraćim OS [251,255, 257-260, 267-270].

Bevilacqua i sar. [271] su ukazali da je katepsin D koristan prognostički pokazatelj u ranom stadijumu karcinoma dojke a Aaltonen i sar. [272] da je prekomerna ekspresija katepsina D povezana sa kraćim OS i kraćim DFI. Studija Foekens-a i sar. [259], bila je naročito značajna obzirom da je obuhvatila veliki broj (2810) pacijentkinja tokom perioda praćenja od 88 meseci, koji je određivan pomoću IRMA eseja. Rezultati ove studije su pokazali da su visoke ili srednje koncentracije katepsina D određivane iz citosola karcinoma dojke povezane sa lošim ishodom bolesti u pN0 i pN1 grupama pacijentkinja. Billgren-a [270] je u studiji na 1851 pacijentkinje potvrdio rezultate Foekensa. Katepsin D se pokazao kao nezavistan prognostički faktor kod pacijentkinja sa rakom dojke bez zahvaćenih limfnih nodusa u smislu kraćeg ukupnog preživljavanja i DFI. [267, 273]. Sa obzirom na promenljiv značaj biomarkera tokom vremena, treba naglasiti da dosadašnje studije o prognostičkoj/prediktivnoj vrednosti katepsina D nisu ispitivale relevantnost biomarkera u zavisnosti od perioda praćenja toka bolesti.

1.4. Urokinazni plazminog aktivator (uPA) i plazminogen aktivator inhibitor (PAI)

Prognoza raka prevenstveno zavisi od njegove sposobnosti lokalne invazije i formiranja udaljenih metastaza. Nastanak udaljenih metastaza čini serija uzastopnih koraka koji uključuju remodelovanje ekstraćelijskog matriksa (ECM), lokalnu invaziju, angiogenezu, intravazaciju, preživaljavanje maligne ćelije u cirkulaciji, ekstravazaciju i konačno rast na udaljenoj (sekundarnoj) lokalizaciji [274]. Maligna ćelija mora da ima sposobnost izbegavanja apoptoze i ulaska u stanje ćelijske uspavanosti, kako bi se zaokružila ova metastatska kaskada. Ključni molekul koji je uključen u znatan broj ovih koraka je tripsin-like proteaza, urokinazni plazminogen activator (uPA).

1.4.1. uPA: Struktura, uloga i mehanizam dejstva

Gen za *uPA* se kod ljudi nalazi na hromozomu 10q (10q22) i on kodira protein molekulske težine 53kDa [275]. Ovaj protein se sintetisuje kao katalitički neaktivna forma jedno-lančani peptid. Konverzija u aktivnu formu se događa, barem *in vitro*, nakon aktivacije plazminom, katepsinom B i katepsinom L [276]. Aktivna forma uPA se sastoji od dvolančanog molekula kod koga je amino terminalni A-lanac povezan sa B-lancem pomoću jedne disulfidne veze. A- lanac (amino kiseline 1–158) sadrži epidermalnom faktoru rasta (EGF like) sličan domen (amino kiseline 1–49) dok se u sklopu B- lanca nalazi katalitičko mesto. Proteaza, uPA katalizuje pretvaranje zimogena plazminogena u aktivni plazmin.

Za razliku od uPA, plazmin je proteaza sa širokim dejstvom koja je sposobna da hidrolizuje različite substrate. Najpre, ona započinje obradivanje raznolikih substrata ekstraćelijskog matriksa kao što su fibrin, fibronektin i laminin [277]. Dalje, ona može da aktivira prekursorske forme specifičnih matriks metaloproteinaza (MMP) kao što su MMP-3, MMP-9, MMP-12 i MMP-13 [277]. Formiranjem aktivnih MMP omogućava dalje procesuiranje ekstraćelijskog matriksa (ECM), pogotovu intersticijalnog i tip IV kolagena. Konačno, plazmin može da aktivira ili oslobodi određen broj faktora rasta kao što su fibroblastni faktor rasta-2 (FGF-2), vaskularni endotelni faktor rasta(VEGF), i transformišući faktor rasta β (TGF- β) [278]. Ovi raznoliki peptidi imaju potencijal da pospeše progresiju tumora stimulišući angiogenezu, ćelijsku proliferaciju i migraciju.

In vivo, uPA katalizovana proteoliza se dešava dok je proteaza vezana za receptor koji se zove uPA receptor (uPAR). uPAR je glikoprotein težine 55–60-kDa, član Ly-6 familije molekula. Sastoji se od tri homologna domena D1, D2 i D3, i vezan je za ćelijsku membranu putem glikozil-fosfatidilinozitola [276].

Primarno mesto vezivanja uPa za uPAR se nalazi u domenu koje pripada faktoru rasta, tačnije u predelu sekvenci koje sadrže amino kiseline od 19 do 32 [279]. Najmanje četiri jasno definisane regije na uPAR se direktno vezuju za uPA. Ove sekvence uključuju amino kiseline 13–20 i 74–84 koje pripadaju domenu 1 kao i regijama koje se nalaze na petljama domena 2 i 3 [280].

Vezivanje uPA za njegov receptor dovodi do ubrzane proteolize a interakcija ligand-receptor omogućava prenos signala koji će aktivirati mitogen aktiviranu protein kinazu (MAPK), ekstracelijski regulisanu kinazu (ERK) 1 i 2, i ostale signalne puteve. Ovi signalni putevi omogućavaju da uPA stimuliše ćelijsku migraciju i mitogenezu, moduliše ćelijsku adheziju i sprečava uspavanost ćelija [281].

1.4.2. Unutrašnji inhibitori uPA

Aktivnost uPA može biti blokirana sa najmanje tri inhibitora koje normalno srećemo u biološkim uslovima; plasminogen activator inhibitor-1 i 2 (PAI-1, PAI-2) i maspin.

Ovo su relativno nehomoloni proteini koji pripadaju Serpin porodici inhibitora proteaza [282,283]. Među njima PAI-1 se smatra primarnim unutrašnjim inhibitorom uPA. Zrela forma PAI-1 se sastoji od 381 amino kiseline i ima molekulsku težini od 50 kDa. PAI-1 može da postoji u različiti konformacijama [282]. Aktivna konformacija se spontano konvertuje u latentni, neaktivni oblik, koji se može u in vitro uslovima reaktivirati od strane agenasa koji denaturišu proteine kao sto su urea i natrijum dodecil sulfat. Osim vezivanja za uPA, PAI-1 se dovodi u vezu sa različitim brojem proteina kao što su fibrin, heparin, α 1 glikoproteinske kiseline i proteina ekstraćelijskog matriksa vitronektina. Istovremeno vezivanje za α -1 glikoproteinsku kiselinu i vitronektin stabilizuje PAI-1 [283]. Interakcija sa vitronektinom omogućava da PAI+1 modulira ćelijsku adheziju zbog kompeticije sa uPAR i integrinina za vezivanje za vitronektin [284]. Vezujući se za fibrin, PAI-1 kontroliše razgradnju krvih ugrušaka [285] a vezivanje za heparin pojačava inhibicioni kapacitet PAI-1 protiv trombina [286].

Nedavno je pokazano da PAI-1 sprečava spontanu i lekovima izazvanu apoptozu kod određenog broja ćelijskih linija. Apoptoza može biti blokirana samo stabilnom varijantom PAI-1, koja nije inaktivisana specifičnim neutrališućim antitelima i ne čini kompleks sa uPAR. Ovo govori u prilog da anti-apoptotski efekat zavisi samo od PAI 1 i da uPAR nije uključen u ovaj proces [287].

Jasno je da PAI-1 ima nekoliko funkcija, osim one dobro poznate uloge kao inhibitora uPA katalitičke aktivnosti. Specifična aktivnost može biti uslovljena njegovom koncentracijom, ćelijskom ili vanćelijskom lokalizacijom i konformalnim stanjem.

1.4.3. uPA i PAI-1 kod raka dojke

Mnoge studije su pokazale da postoji pojačana ekspresija uPA i PAI-1 u karcinomu dojke u odnosu na normalno tkivo dojke [288-280]. Mehanizam (i) koji je odgovaran za ovu pojačanu ekspresiju kod raka dojke nije poznat. U kulturama ćelija raka dojke, mnogi hormoni i faktori rasta moduliraju ekspresiji uPA [291-300]. Ostali faktori koji mogu da utiču na uPA ekspresiju in vitro uključuju metilaciju gena u promoter regijama [301], određeni faktori transkripcije, pogotovo članovi ets familije [302].

Mnoge studije su proučavale odnos nivoa uPA i PAI-1 kod pacijenata sa rakom dojke, sa karakteristikama tumora i pacijenata. U Look-ovoj studiji na 8175 pacijenata sa primarnim rakom dojke, nivo uPA nije značajno bio povezan sa godinama pacijenata, menopauzalnim i limfonodalnim statusom. Nivoi uPA su bili u pozitivnoj korelaciji sa gradusom tumora, a u negativnoj korelaciji sa hormonskim receptorskim statusom. Veći stepen korelacije je primećen između nivoa uPA i pT2 i pT4 tumora nego kod pT1 i pT3 uzoraka [303].

Za razliku od uPA, nivoi PAI-1 su značajno korelisani sa uzrastom pacijenata, i veći su kod postmenopauzalnih u odnosu na premenopauzne žene, veći su kod pacijenata sa pozitivnim limfnim nodusima u odnosu na one kod kojih limfni nodusi nisu zahvaćeni.

Kao i kod uPA, nivoi PAI-1 su u pozitivnoj korelaciji sa gradusom tumora, a u negativnoj korelaciji sa hormonskim receptorskim statusom. Nivoi PAI-1 su veći kod pT2 i pT4 tumora u odnosu na pT1 i pT3 uzorke [303].

Različite studije su publikovane sa kontraverznim rezultatima o tome koji tipovi ćelija ekspresiraju uPA i PAI-1 kod raka dojke. Najranije studije bazirane na imunohistohemiji su sugerisale da se protein uPA uglavnom nalazi u malignim ćelijama [288,304,305].

Christensen i sar. [306], su pokazali na osnovu imuno-bojenja da je uPA takođe prisutan i u drugim ćelijama, kao što su makrofagi i mast ćelije (najintenzivniji intenzitet bojenja),

epitelnim i endotelnim ćelijama i fibroblastima (umeren intenzitet bojenja). Kennedy i sar. [307] su takođe našli da je uPA prisutan i u stromalnim i u epitelnim ćelijama, ali je predominantna lokalizacija uPA u stromalnim ćelijama. Konačno su Nielsen i sar. [308] identifikovali uPA u miofibroblastima i makrofagima. Ova istraživanja Nielsen i sar. su u skladu sa ranijim in situ hibridizacionim studijama i pokazuju da se mRNA za uPA nalazi gotovo uvek u fibroblastima. Pronalazak uPA u ćelijama strome govori u prilog da ćelije strome i ćelije raka deluju udruženo, sinergistički, u podsticanju i širenju metastaza [309].

Neslaganje takođe postoji u vezi lokalizacije PAI-1 u raku dojke. Reilly i sar. [289] su detektovali PAI-1 protein u endotelinim ćelijama i u ćelijama raka. Christensen i sar. [306] su pored toga izolovali PAI-1 i iz ćelija strome. Nasuprot tome, Jankum i sar. [305] su zaključili da je PAI-1 prisutan uglavnom u malignim ćelijama. Mogući razlozi za ovako različite rezultate lokalizacije uPA i PAI-1 kod raka dojke uključuju korišćenje različitih metoda obrade preparata (sveže tkivo vs. formalinom fiksiran preparat u parafinskom kalupu), različite metode tretiranja preparata, korišćenje antitela različitih specifičnosti i neisključivanje iz studije preparata koji nisu dobro bojani.

1.4.4. uPA kao prognostički marker kod raka dojke

Brojne studije, različito modelirane, su pokazale da je uPA uključen u proces metastaziranja [310,311]. U početku se mislilo da uPA ima jednostavnu ulogu u ovom procesu, koja se odnosi na razaranje ekstraćelijskog matriksa (ECM), i tako doprinosi lokalnoj invaziji sa formiranjem udaljenih metastaza. Degradacija ekstraćelijskog matriksa (ECM) je visoko specifičan process a uPA pored toga pojačava procese angiogeneze, stimuliše proliferaciju i migraciju ćelija i sprečava uspavanost ćelija [276,281]. Poznajući ulogu uPA kao medijatora u procesu metastaziranja, a znajući da su udaljene metastaze vodeći uzrok smri kod pacijenata obolelih od raka dojke, dovodi nas do činjenice da uPA može bit dobar prognostički marker [312].

Duffy i sar. [313,314] su daleke 1988.g. bili prvi koji su ukazali da pacijenti oboleli od raka dojke koji imaju visoke vrednosti uPA u primarnom karcinomu imaju kraći DFI (disease-free interval-preživljavanje bez znakova bolesti) i kraći OS (overall survival-ukupno

preživljavanje) u odnosu na pacijente sa niskim vrednostima. Ovi rezultati su kasnije potvrđeni od strane najmanje 20 različitih istraživačkih timova širom sveta [315-334].

Ove unicentrične studije su pokazale da je prognostička vrednost uPA:

- nezavisna u odnosu na klasične prognostičke faktore raka dojke kao što su veličina tumora, gradus tumora, status aksilarnih limfnih nodusa.
- jača od bioloških prognostičkih faktora kao što su estrogen i progesteron receptorski status, *HER2*, EGFR, p53, i Nottingham Index [333,335,336].
- uPA ima i prediktivnu vrednost kada se koristi kao kontinuirana varijabla [337].
- značajna kod pacijenata za nezazvaćenim aksilarnim limfnim nodusima (pN0), uključujući i pacijente koji nisu imali adjuvantnu terapiju [338].

1.4.5. PAI-1 kao prognostički marker kod raka dojke

Na osnovu svih iznesenih podataka o inhibitoru uPA možemo pretpostaviti da visoki nivoi inhibitora uPA u tumorskom tkivu korelišu sa niskom šansom za razvoj metastaza i dobrim ishodom bolesti. Paradoksalno, visoki nivoi PAI-1 u raku dojke se povezuje sa lošim ishodom bolesti. Zajedničko merenje oba ova proteina pruža nam bolje prognostičke informacije nego kada posmatrano nivoje ovih proteina posebno [328-344].

Razlozi zašto visoki nivoi PAI-1 koreliraju sa lošom prognozom nisu jasni. Moguća objašnjenja su:

- PAI-1 je neophodan za angiogenezu [345,346], koja je neophodna za obezbeđivanje adekvatne cirkulacije radi za tumorski rast na primarnom mestu i udaljenoj lokalizaciji.
- PAI-1 može da modulira procese ćelijske adhezije i migracije što može dovesti do ubrzanja procesa metastaziranja.
- PAI-1 može da spreči apoptozu [287]. Maligna ćelija mora da ima sposobnost izbegavanja apoptoze u cilju zaokruživanja metastatskog procesa. Rezistencija na apoptozu povećava šansu za formiranje udaljenih metastaza. Izbegavanje apoptoze može da dovede i do rezistencije na terapiju i lošeg ishoda bolesti [347].

1.4.6. Prediktivna vrednost uPA i PAI-1

Prognostički faktori su prema Clarku [348] važni ne samo za predviđanje ishoda bolesti, već i ukazuju koji pacijenti će imati korist od primena specifičnih terapija. Foekens i saradnici sa u pilot studiji na 235 pacijenata pokazali da žene sa uPA negativnim tumorima imaju bolji odgovor na tamoxifen od bolesnica sa uPA pozitivnim tumorima [349]. Ovaj prediktivni uticaj uPA je nezavistan u odnosu na receptorski status. Kada su pacijenti bili stratifikovani prema koncentraciji receptora, odnos između visokog nivoa uPA i rezistencije na tamoxifen je primećena samo u podgrupi koja ima umerene vrednosti nivoa estrogen i progesteronskih receptora (i.e. >10 fmol/mg proteina za oba receptora pri čemu barem jedan mora imati vrednosti ispod 75 fmol/mg). Visoki nivoi PAI-1 su takođe povezani sa smanjenom korisnošću primene tamoxifena ali je prediktivni značaj inhibitora manje značajan i izražen od efekta proteaza [349].

U Nemačkoj randomizovanoj prospektivnoj studiji [350], primena hemioterapije kod pacijenata sa visokim nivoima uPA i ili PAI-1 je smanjila rizik od pojave recidiva za prosečno 44% (relative risk=0.56, p , NS) Ova studija je ukazala da pacijenti sa nezavaćenim limfnim nodusima a sa visokim nivoima uPA/PAI-1 imaju korist od adjuvantne hemioterapije po CMF protokolu. U skladu sa prethodnom studijom, Nadia Harbeck i sar. [338] su u jedno-institucionalnoj (single-institution) prospektivnoj studiji ($n=761$) pokazali da je nivo uPA/PAI-1 predviđao ishod bolesti kod pacijenata koji nisu primali adjuvantnu sistemsku terapiju a prognostička vrednost ovih biomarkera se gubila u koliko su pacijenti primali ili adjuvantnu hemioterapiju ili hormonsku terapiju. I ova studija je pokazala korisnost adjuvantnog lečenja kod pacijenata sa visokim nivoima uPA/PAI-1.

Harbeck i sar. su 2002.godine (two center study) ($n = 3424$), još bolje pokazali korisnost adjuvante hemioterapije kod pacijentkinja sa rakom dojke i visokim nivoima uPA/PAI-1 u odnosu na bolesnice sa niskim nivoima ovih biomarkera [351].

Ovi rezultati pokazuju da pacijentkinje sa odmaklim rakom dojke i visokim nivoima uPA i PAI-1 ispoljavaju rezistenciju na tamoxifen a one sa ranim rakom dojke imaju veću korist od hemioterapije bazirane na CMF protokolu.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U okviru ranog, kasnog i dugotrajnog praćenja toka bolesti postavljeni su sledeći konkretni ciljevi ovog istraživanja:

1. da se ispita raspodela vrednosti molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija u podgrupama bolesnica definisanih na osnovu klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti tumora;
2. da se ispita korelacija vrednosti molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija sa vrednostima kontinualnih klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti tumora;
3. da se korišćenjem tzv. „pristupa minimalne p vrednosti“ (eng. „minimum p value approach“) odrede granične vrednosti za kontinualne biomarkere, na osnovu kojih bi se definisao status tih biomarkera;
4. da se ispita prognostički značaj fenotipova karcinoma dojke definisanih na osnovu statusa dva ili više ispitivanih biomarkera, sa ciljem identifikovanja podgrupa bolesnica sa niskim/visokim rizikom za ponovnu pojavu bolesti, definisanu pojavom udaljenih metastaza.
5. da se ukaže na značaj određivanja: klasičnih biomarkera domaćina tumora (godine bolesnica), klasičnih biomarkera tumora (veličina tumora, histološki gradus i tip tumora), molekularnih biomarkera estrogene zavisnosti tumora (status receptora za estrogen i receptora za progesteron) i molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija (uPA, PAI-1 i katepsin D), u ranom i/ili kasnom periodu biološkog toka karcinoma dojke u grupi postmenopauzних bolesnica.

Na posredan način, ovim istraživanjem bi bilo omogućeno razmatranje izbora ciljanih terapija: u ranom periodu praćenja toka bolesti, sa ciljem da se spreči nastanak udaljenih metastaza, kao najznačajnijeg parametra za fatalni ishod bolesti, kao i u kasnom periodu praćenja toka bolesti, kako bi se produžio tok bolesti bez pojave udaljenih metastaza.

U odnosu na biologiju karcinoma dojke, rezultati ove disretacije bi mogli da ukažu na značaj određenih signalnih puteva u ranom, odnosno kasnom periodu praćenja toka bolesti.

3. PACIJENTI I METODE

Studijom su obuhvaćeni pacijenti operisani u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije zbog invazivnog karcinoma dojke tokom 1993.godine, koji nisu imali metastaza u limfnim čvorovima a koji nisu, prema tadašnjim protokolima, primili adjuvantu terapiju.

Od ukupno 102 postmenopauzne pacijentkinje sa primarnim operabilnim karcinomom dojke, 10 % pacijentkinja je imalo tumore histološkog gradusa I ili III. Zbog malog broja ovih pacijentkinja, u svrhu statističke analize je uzeto u obzir 89 pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa II, za koje su postojali podaci o praćenju toka bolesti.

3.1. Određivanje koncentracije ER i PR u citosolu ćelija malignog tkiva dojke – DCC metoda

Koncentracija receptora za estrogen i progesteron je određena klasičnom biohemijskom metodom (DCC metod, engl. dextran coated charcoal – ugalj obložen dekstranom) preporučenom od strane EORTC-a (skr. od eng. *European Organization for Research and Treatment of Cancer*) [352]. Metoda se zasniva na vezivanju odgovarajućeg radioaktivno obeleženog steroidnog hormona tricijumom (³H) za receptore prisutne u citosolu malignih ćelija tumora. Ovom metodom mogu se detektovati receptori sa očuvanom vezivnom aktivnošću.

Klasična biohemijska metoda obuhvata sledeće korake:

- a) reakcija vezivanja hormona za receptore prisutne u citosolu;
- b) odvajanje viška nevezanog (slobodnog) hormona aktivnim ugljem;
- c) određivanje radioaktivnosti citosola u beta scintilacionom brojaču;
- d) izračunavanje koncentracije steroidnih hormona (fmol po mg ukupnih proteina).

Ova metoda zahteva najpre pravilno uzimanje uzorka tumorska tkiva mase od 200 mg do 1 g koje se potom čuva u tečnom azotu (-196 oC) do trenutka određivanja koncentracije steroidnih hormona [353]. Na taj način se kvantitativni sadržaj receptora za estrogen ne menja tokom vremena [354].

Za određivanje koncentracija receptora za estrogen korišćen je tricijumom obeleženi 17β -estradiol (*Amersham*, England), specifične aktivnosti 90 Ci/mmol (3,5 TBq/mmol) u koncentraciji 32×10^{-10} M. Kao kompetitivni neobeleženi hormon za ER korišćen je dietilstilbestrol u 100x većoj koncentraciji (32×10^{-8} M) [339]. Za određivanje koncentracije receptora za progesteron, korišćen je tricijumom obeleženi sintetski progesteron ORG 2058 (*Amersham*, England), specifične aktivnosti 40 Ci/mmol (1,5 TBq/mmol), u koncentraciji 32×10^{-10} M. Kao kompetitivni hormon za PR korišćen je neobeleženi ORG 2058 u 200x većoj koncentraciji (64×10^{-8} M). Citosol dobijen iz ćelija tumora, sadrži proteine sa visokim afinitetom ($K_d < 1$ nM) i proteine sa niskim afinitetom ($K_d > 30$ nM) vezivanja za steroidne hormone, odnosno sadrži receptore i ne-receptore [355]. Određivanje ukupno vezanog hormona podrazumeva da se deo hormona vezuje za proteine sa niskim afinitetom (nespecifično vezivanje), a deo za proteine sa visokim afinitetom (specifično vezivanje). Razlika između ukupnog i nespecifičnog vezivanja govori o specifičnom vezivanju hormona za receptore. Određivanje ukupnog i nespecifičnog vezivanja hormona, zasniva se na kompetitivnoj inhibiciji tj. međusobno isključivom vezivanju obeleženog ili neobeleženog hormona za molekule receptora.

Ukupno vezivanje hormona određuje se u 200 μ l citosola, poznate koncentracije proteina (0.2–3.3 mg/ml) u prisustvu 25 μ l saturacione koncentracije obeleženog hormona i 25 μ l fosfatnog pufera. Nespecifično vezivanje hormona određuje se u identičnim uslovima u pogledu obeleženog hormona, ali umesto pufera, dodaje se po 25 μ l neobeleženog hormona. Reakcija između vezivanja hormona za receptore odigrava se na 4°C tokom 18 sati.

Za odvajanje frakcije nevezanog hormona koristi se aktivni uglj norit A (*Sigma*, Germany) koji je obložen dekstranom T-70 (*Pharmacia*, Sweden) [356]. Oblaganje uglja dekstranom je potrebno da bi se sprečio pristup velikih molekula površini aktivnog uglja i njihova adsorpcija. Postupak oblaganja uglja dekstranom izvodi se na temperaturi od 4°C uz mešanje oko 12 sati. Dodavanjem 500 μ l ovako pripremljenog reagensa (0.25 % norit A, 0.025% dekstran u 0.01 M tris puferu, pH 8) u 250 μ l uzorka (kako pri analizi ukupnog, tako i nespecifičnog vezivanja) omogućava se adsorpcija nevezanog hormona. Ova reakcija se izvodi 30 min na 4°C, uz povremeno mešanje. Centrifugiranjem na 2000-3000 g, 30 minuta na 4°C, dobija se talog u kome

je aktivni ugalj sa adsorbovanim nevezanim hormonom i supernatant koji sadrži kompleks hormon – receptor, koji se koristi za merenje radioaktivnosti.

Koncentracija ukupnih proteina u citosolnom ekstraktu je određivana metodom po *Lowry* [357]. Određivanje radioaktivnosti odnosi se na određivanje broja dezintegracija u minuti (dpm) obeleženog hormona, vezanog bilo u frakciji u kojoj se određuje ukupno ili u frakciji u kojoj se određuje nespecifično vezivanje. Radioaktivnost se određuje u scintilacionoj tečnosti (0.4 % PPO i 0.005% POPOP u toluolu) u količini od 6ml po uzorku, u beta scintilacionom brojaču (*Beckman LS 700*). Dobijene vrednosti izražene su u cpm (broj detektovanih otkucaja u minuti) a prevode se u dpm (broj dezintegracija u minuti), deljenjem vrednosti sa efikasnošću brojača.

Sadržaj ER i PR se nakon računskih analiza izražava kao broj fmol po mg proteina citosola ćelija malignog tkiva.

3.2. Određivanje koncentracije HER-2

Imunohistohemijski je određivan HER 2 receptorski status korišćenjem anti HER 2 antitela na osnovu rezultata testiranja dodeljivan je sledeći skor: 0, 1+, 2+, 3+. Rezultat testa je negativan pri skor 0 i 1, a pozitivan pri skor 3. Pacijentkinje sa HER 2 skorom 2+ retestiraće se CISH (chromogenic in situ hybridization) metodom prema revidiranim ASCO/CAP (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists) preporukama iz 2013.godine [358].

3.3. Određivanje koncentracije uPA i PAI-1: ELISA test

Za kvantitativno određivanje humanog urokinaznog plazminogen aktivatora i njegovog inhibitora u ekstraktima tkiva, plazme i ćelijskih kultura koristi se IMUBIND® uPA-PAI-1 ELISA (American Diagnostica, USA) . U ovom testu se koristi murinsko antitelo na humani uPA. Uzoci se inkubiraju 16-20 h na temperaturi 4°C u mikrobunarima koji su obloženi sa monoklonskim anti-humanim uPA i detektuju se putem anti-humanog uPA antitela. Dodavanjem streptavidin konjugovane peroxidaze (HRP) formira se antitelo-enzim detekcioni kompleks. Dodavanjem TMB (perborat /3,3',5,5' – tetramethylbenzidin)

substrata dolazi do reakcije sa HRP, stvarajući plavo obojenu soluciju. Senzitivnost se povećava dodavanjem sulfatne kiseline za zaustavljanje reakcije čime se solucija boji u plavo. Nivoi uPA se kvantifikuju mereći absorbancu obe solucije na 340nm u roku od 10 minuta, koja se upoređuje sa standardnom krivom.

3.4. Određivanje koncentracije katepsina D – imunoradiometrijski esej (IRMA)

Koncentracija katepsina D određivana je iz istog citosolnog ekstrakta iz kojeg je određivana koncentracija steroidnih receptora koristeći IRMA metodu, tj. njenu modifikacijou - sendvič“ imunoradiometrijski esej na čvrstoj fazi pomoću komercijalnog kompleta za kvantitativno određivanje katepsina D (ELSA-CATH-D, CIS Biointernational, Gif-Sur-Yvet, France). Korišćenjem ovog kita omogućavalo je detekciju sve tri izoforme katepsina D (34 kDa, 48 kDa i 52 kDa). Najmanja koncentracija koju je bilo moguće detektovati sa verovatnoćom 0,95, je bila 20 fmol/ml. „Sendvič“ imunoradiometrijski esej na čvrstoj fazi se bazira na na upotrebi dva monoklonska antitela koja se specifično vezuju za prostorno udaljene regione (epitope) na ispitivanom. antigenu (katepsina D). Antitelo za vezivanje predstavlja primarno antitelo, koje je već vezano za dno epruvete (čvrsta faza), i služi da se ispitivani antigen, prisutan u citosolnom ekstraktu, veže za antitelo i, samim tim, za čvrstu fazu. Sekundarno antitelo, tj. antitelo za obeležavanje, je obeleženo radioaktivnim jodom 125 (125J) i specifično se vezuje za ispitivani antigen, koji je već vezan za čvrstu fazu. Na taj način se antigen nalazi u „sendviču“ između primarnog i sekundarnog antitela Nakon ispiranja viška nevezanog sekundarnog antitela, radioaktivnost, koja potiče od 125J vezanog za antigen, se meri pomoću λ -scintilacionog brojača i proporcionalna je koncentraciji antigena vezanog između dva antitela u epruveti. Test se izvodi na sobnoj temperaturi a u svaku epruvetu je potrebno dodati po 300 μ l monoklonskog antitela obeleženog sa J125. Potom je potrebno dodati po 50 μ l rablaženog kontrolnog ili razblaženog ispitivanog uzorka i sačekati inkubacioni period od 3 časa. Nakon toga neophodno je ukloniti višak nevezanog sekundarnog antitela putem nekoliko uzastopnih

ispiranja. Na osnovu izmerenih radioaktivnosti kreira se standardna kriva sa kome se mogu odrediti nepoznate koncentracije antigena koje odgovaraju izmerenim aktivnostima uzoraka. Količnik nepoznate koncentracije antigena, izražen u pmol/ml, koji je korigovan za odgovarajuća razblaženja, i ukupne koncentracije proteina u uzorku, izražen u mg/ml ukupnih proteina, predstavlja koncentraciju antigena izraženu u pmol/mg.

3.5. Statističke metode za obradu rezultata

Imajući u vidu podatke iz literature, može se pretpostaviti da će koncentracije katepsina D, uPA i PAI-1, u citosolnim ekstraktim uzoraka tumorskog tkiva bolesnica sa primarnim karcinomom dojke, imati širok opseg vrednosti. Stoga bi, prvo, bile analizirane raspodele vrednosti koncentracija svakog od navedenih molekularnih biomarkera pomoću Kolmogorov-Smirnov testa da bi se utvrdilo da li one statistički značajno odstupaju, ili ne, od normalne raspodele. Opravdano je pretpostaviti da će raspodele vrednosti koncentracija svakog od navedenih molekularnih biomarkera odstupati od normalne raspodele, te bi za dalju obradu rezultata bili korišćeni neparametrijski statistički testovi, i to:

- Mann-Whitney-ev test ili Kruskal-Wallis-ov test , da bi se utvrdilo da li postoji statistički značajna razlika u raspodeli vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera između pojedinih podgrupa bolesnica;
- Spearman-ov test sume rangova, za određivanje ranga korelacije kao približne indikacije povezanosti između koncentracija ispitivanih molekularnih biomarkera;
- metoda Kaplan-a i Meier-a, za određivanje verovatnoća za interval bez ponovne pojave bolesti u podgrupama bolesnica. Ove verovatnoće bi bile određivane na osnovu broja pacijentkinja kod kojih je potvrđeno prisustvo udaljenih metastaza, broja meseci nakon hirurške intervencije, za svaku od tih pacijentkinja, posle kojih je došlo do pojave udaljene metastaze, kao i broja pacijentkinja koje nisu imale metastaze u periodima (ranog, kasnog i dugotrajnog) praćenja toka bolesti;
- tzv. „log-rank“, tj. Mantel-Cox-ov test, da bi se utvrdilo da li postoji statistički značajna razlika u verovatnoćama za interval bez ponovne pojave bolesti između podgrupa bolesnica.

4. REZULTATI

4.1. Karakteristike tumora i domaćina tumora

Od ukupno 102 postmenopauzne pacijentkinje sa primarnim operabilnim karcinomom dojke, koje su imale negativan status limfnih čvorova, samo 10 % pacijentkinja je imalo tumore histološkog gradusa I ili III. Zbog malog broja ovih pacijentkinja, u svrhu statističke analize je uzeto u obzir 89 pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa II, za koje su postojali podaci o praćenju toka bolesti.

Zbog toga što su samo dve pacijentkinje imale tumore veće od 5 cm (pT3), pacijentkinje su, u toku kasnije statističke analize, bile svrstane u grupu pacijentkinja sa tumorima koji su jednaki ili veći od 2 cm (pT2,3). Na osnovu histološkog tipa tumora, pacijentkinje su analizirane u okviru grupe sa: a) invazivnim duktalnim (IDC), b) invazivnim lobularnim (ILC) i c) drugim tipovima karcinoma dojke. Amplifikacija HER-2 je, u zavisnosti od imunohistohemijskog (IHC) skora, bila definisana kao negativna (IHC = 0) ili pozitivna (IHC \geq 1).

4.1.1. Karakteristike tumora i domaćina tumora u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije

Tokom prvih 5 godina (od 1. do 60. meseca) praćenja toka bolesti nakon operacije, podaci o praćenju toka bolesti su bili dostupni za 73 pacijentkinje. Karakteristike tumora i domaćina tumora su prikazane u Tabeli 1.

Pacijentkinje su bile starosti između 47 i 80 godina, sa medijanom od 62 godine. Među pacijentkinjama, 40 je imalo tumore manje od ili jednake 2 cm (pT1), 31 je imala tumore veće od 2 cm, a manje od ili jednake 5 cm (pT2), dok su samo 2 pacijentkinje imale tumore veće od 5 cm (pT3). Histološki tip tumora je bio nepoznat za 2 pacijentkinje. Njih 34 je imalo duktalne (IDC), 24 luminalne (ILC), a 13 druge tipove tumora. Za analizu amplifikacije HER-2 gena je bilo dostupno 63 uzoraka, od kojih je 50 imalo negativan, a 13 pozitivan skor.

Koncentracija ER je bila u opsegu od 2 do 869 fmol/mg (medijana = 44 fmol/mg), dok je koncentracija PR bila između 2 i 95 fmol/mg (medijana = 6 fmol/mg). Koncentracije

katepsina D su bile između 5 i 269,2 pmol/mg, koncentracije uPA između 0,1 i 1,1 pg/mg, a koncentracije PAI-1 između 0,79 i 26,66 pg/mg, sa medijanama od 44,7 pmol/mg, 0,36 pg/mg i 4,55 pg/mg, respektivno. Za određivanje vrednosti koncentracija uPA i PAI-1 je bilo dostupno po 48 uzoraka.

Tabela.1. Karakteristike podgrupa pacijentkinja definisanih parametrima domaćina tumora (starost) i tumora (veličina tumora, histološki tip tumora, koncentracija ER, koncentracija PR, amplifikacija HER-2), u okviru grupe pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije. Navedeni su podaci o broju pacijenata, procentualnoj zastupljenost, opsegu i mediani vrednosti.

Karakteristike pacijenata i tumora	Broj pacijenata	%	Opseg	Mediana
Ukupno	73	100		
Starost (godine)	73	100	47-80	62
Veličina tumora	73			
pT1	40	54,8		
pT2	31	42,5		
pT3	2	2,7		
Histološki tip	73			
IDC	34	46,6		
ILC	24	32,9		
Drugi	13	17,8		
Nepoznato	2	2,8		
ER (fmol/mg)	73	100	2-869	44
PR (fmol/mg)	73	100	2-95	6
Amplifikacija HER-2	63			
Negativno	50	79,4		
Pozitivno	13	20,6		
Katepsin D (pmol/mg)	73	100	5-269,2	44,7
uPA (pg/mg)	48	100	0,1-1,1	0,36
PAI-1 (pg/mg)	48	100	0,79-26,66	4,55

4.1.2. Karakteristike tumora i domaćina tumora u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina nakon operacije

Tokom drugih 5 godina (od 61. do 120. meseca) praćenja toka bolesti nakon operacije, podaci o praćenu toka bolesti su bili dostupni za 52 pacijentkinje. Karakteristike tumora i domaćina tumora su prikazane u Tabeli 2.

Pacijentkinje su bile starosti između 57 i 79 godina, sa medijanom od 62 godine. U celoj grupi, 32 pacijentkinje su imale tumore manje od ili jednake 2 cm (pT1), dok je njih 20 imalo tumore veće od 2 cm (pT2). Duktalne tumore je imalo 26 pacijentkinja, luminalne 14, a druge tipove tumora njih 10, dok je histološki tip bio nepoznat za 2 pacijentkinje. Za analizu amplifikacije HER-2 gena je bilo dostupno 45 uzoraka, pri čemu je za 35 detektovan negativan, a za 10 pozitivan skor.

Koncentracije ER su imale vrednosti od 2 do 869 fmol/mg, sa medijanom od 36 fmol/mg, a koncentracije PR su imale vrednosti između 2 i 69 fmol/mg, sa medijanom od 6 fmol/mg. Koncentracije katepsina D su bile u rasponu od 5,6 do 269,2 pmol/mg, koncentracije uPA u rasponu od 0,11 i 1,01 pg/mg, a koncentracije PAI-1 u rasponu od 0,79 i 26,66 pg/mg (medijane su bile 41,3 pmol/mg, 0,34 pg/mg i 4,25 pg/mg, respektivno). Za određivanje vrednosti koncentracija uPA i PAI-1 je bilo dostupno po 36 uzoraka.

Tabela 2. Karakteristike podgrupa pacijentkinja definisanih parametrima domaćina tumora i tumora, u okviru grupe pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen u drugih 5 godina nakon operacije. Navedeni su podaci o broju pacijenata, procentualnoj zastupljenosti, opsegu i medijani vrednosti.

Karakteristike pacijenata i tumora	Broj pacijenata	%	Opseg	Mediana
Ukupno	52	100		
Starost (godine)	52	100	52-79	62
Veličina tumora	52			
pT1	32	61,5		
pT2	20	38,5		
Histološki tip	52			
IDC	26	50		
ILC	14	26,9		
Drugi	10	19,2		
Nepoznato	2	3,9		
ER (fmol/mg)	52	100	2-869	36
PR (fmol/mg)	52	100	2-69	6
Amplifikacija HER-2	45			
Negativno	35	77,8		
Pozitivno	10	22,2		
Katepsin D (pmol/mg)	52	100	5,6-269,2	41,3
uPA (pg/mg)	36	100	0,11-1,01	0,34
PAI-1 (pg/mg)	36	100	0,79-26,66	4,25

4.1.3. Karakteristike tumora i domaćina tumora u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije

Tokom prvih 10 godina (od 1. do 120. meseca) praćenja toka bolesti nakon operacije, podaci o praćenu toka bolesti su bili dostupni za 67 pacijentkinja. Karakteristike tumora i domaćina tumora su prikazane u Tabeli 3.

Pacijentkinje su imale između 47 i 80 godina, a medijana za starost pacijentkinja je bila 62 godine. Sa tumorima manjim od ili jednakim 2 cm (pT1) je bilo 36 pacijentkinja, a sa

tumorima većim od 2 cm (pT2) je bila 31 pacijentkinja. U ovoj grupi su bili zastupljeni duktalni (30 pacijentkinja), lobularni (22 pacijentkinje) i drugi (13 pacijentkinja) tipovi tumora, dok je histološki tip tumora bio nepoznat za 2 pacijentkinje. Za analizu amplifikacije HER-2 gena je bilo dostupno 59 uzoraka. U slučaju 46 pacijentkinja je detektovan negativan, a u slučaju 13 pacijentkinja pozitivan imunohistochemijski skor.

Što se tiče koncentracija ER i PR, one su bile u opsezima od 2-869 i 2-95 fmol/mg, respektivno, a odgovarajuće medijane su bile 43 i 6 fmol/mg. Koncentracije ostalih biomarkera su, imale vrednosti u opsezima od 5-269,2 pmol/mg (katepsin D), 0,1-1,1 pg/mg (uPA) i 0,79-26,66 pg/mg (PAI-1), sa medijanama od 45,6 pmol/mg, 0,37 pg/mg i 4,47 pg/mg, respektivno. Za određivanje vrednosti koncentracija uPA i PAI-1 je bilo dostupno po 45 uzoraka.

Tabela 3. Karakteristike podgrupa pacijentkinja definisanih parametrima domaćina tumora i tumora, u okviru grupe pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije. Navedeni su podaci o broju pacijenata, procentualnoj zastupljenost, opsegu i mediani vrednosti.

Karakteristike pacijenata i tumora	Broj pacijenata	%	Opseg	Mediana
Ukupno	67	100		
Starost (godine)	67	0,0	47-80	62
Veličina tumora	67			
pT1	36	53,7		
pT2	31	46,3		
Histološki tip	67			
IDC	30	44,8		
ILC	22	32,8		
Drugi	13	19,4		
Nepoznato	2	3		
ER (fmol/mg)	67	100	2-869	43
PR (fmol/mg)	67	100	2-95	6
Amplifikacija HER-2	59			
Negativno	46	78,0		
Pozitivno	13	22,0		
Katepsin D (pmol/mg)	67	100	5-269,2	45,6
uPA (pg/mg)	45	100	0,1-1,1	0,37
PAI-1 (pg/mg)	45	100	0,79-26,66	4,47

4.2. Raspodela vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija u podgrupama bolesnica definisanih na osnovu klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti tumora

Korišćenjem Kolmogorov-Smirnov testa, analizirane su raspodele učestalosti koncentracija kontinualnih molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija (ER, PR, katepsin D, uPA PAI-1) i utvrđeno je da one statistički značajno odstupaju od normalne raspodele ($p < 0,001$). Stoga su, u toku dalje analize, korišćeni neparametrijski testovi statističke analize.

Na osnovu godina domaćina tumora, pacijentkinje su podeljene u dve grupe: a) pacijentkinje starosti između 45 i 59 godina i c) pacijentkinje starije od 59 godina. Pacijentkinje su, na osnovu koncentracije ER, bile svrstane u grupu sa koncentracijom: a) manjom od 10 fmol/mg i b) jednakom ili većom od 10 fmol/mg, dok su, na osnovu koncentracije PR, bile svrstane u grupu sa koncentracijom: a) manjom od 20 fmol/mg i b) jednakom ili većom od 10 fmol/mg.

4.2.1. Raspodela vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije

Raspodele vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija (katepsina D, uPA i PAI-1), u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije, su prikazane u Tabeli 4.

4.2.1.1. Raspodela vrednosti koncentracija katepsina D

U grupi pacijentkinja starosti između 45 i 59 godina ($n=25$), medijana koncentracije katepsina D je bila 47,6 pmol/mg, a u grupi pacijentkinja starijih od 59 godina ($n=48$), medijana je bila 42,6 pmol/mg. Kod pacijentkinja sa pT1 tumorima ($n=40$), medijana je

bila 38,1 pmol/mg, a kod onih sa pT2 tumorima(33), medijana je bila 51,5 pmol/mg. Pacijentkinje sa duktalnim tumorima (n=34) su imale medijanu koncentracije katepsina D - 50,3 pmol/mg, one sa lobularnim tumorima (n=24) - 37,7 pmol/mg, a one sa drugim (n=13) histološkim tipovima tumora - 41,4 pmol/mg. Negativan skor (n=50) za amplifikaciju HER-2 je bio okarakterisan sa medijanom koncentracije katepsina D od 46,3 pmol/mg, a pozitivan skor (n=13) sa medijanom od 47,5 pmol/mg, sa obzirom na to da su bila dostupna 63 uzorka.

Tabela 4. Raspodela vrednosti koncentracija katepsina D, uPA i PAI-1 u podgrupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora i tumora, za pacijentkinje čiji je tok bolesti praćen u prvih 5 godina (1-60 meseci) nakon operacije. Prikazani su broj i procentualna zastupljenost pacijentkinja u svakoj od analiziranih podgrupa, mediane vrednosti koncentracija, kao i p vrednosti koje se odnose na Mann-Whitney ili Kruskal-Wallis-ov test.

Karakteristike pacijenata i tumora	Katepsin D (pmol/mg)				uPA (pg/mg)				PAI-1 (pg/mg)			
	Broj pacijenata	%	Mediana	P*	Broj pacijenata	%	Mediana	P*	Broj pacijenata	%	Mediana	P*
Starost (godine)	73				48				48			
45-59	25	34,2	47,6	0,9	15	31,3	0,38	0,1	16	33,3	4,2	1
>59	48	65,8	42,6		33	68,8	0,31		32	66,7	4,8	
Veličina tumora	73				48					48		
pT1	40	54,8	38,1	0,08	26	54,2	0,37	0,9	26	54,2	4,8	0,8
pT2	33	45,2	51,5		22	45,8	0,35		22	45,8	4,3	
Histološki tip	71				48				48			
IDC	34	47,9	50,3	0,4	22	45,8	0,39	0,5	24	50,0	4	0,3
ILC	24	33,8	37,3		18	37,5	0,31		16	33,3	5,7	
Drugi	13	18,3	41,4		8	16,7	0,23		8	16,7	3,8	
ER (fmol/mg)	73				48				48			
ER<10	15	20,5	40	0,2	36	75,0	0,34	0,8	12	25,0	4	0,5
ER≥10	58	79,5	47,5		12	25,0	0,36		36	75,0	4,9	
PR (fmol/mg)	73				48				48			
PR<20	57	78,1	44	0,9	34	70,8	0,39	0,1	35	72,9	4,5	0,7
PR≥20	16	21,9	47,7		14	29,2	0,28		13	27,1	4,7	
Amplifikacija HER-2	63				41				41			
Negativno	50	79,4	46,3	0,5	32	78,0	0,34	0,7	33	80,5	4	0,1
Pozitivno	13	20,6	38,9		9	22,0	0,31		8	19,5	6,4	

* Mann-Whitney/Kruskal-Wallis test

U tumorima pacijentkinja sa koncentracijom ER manjom od 10 fmol/mg (n=15), medijana koncentracija katepsina D je bila 40, a u tumorima pacijentkinja sa koncentracijom ER jednakom ili većom od 10 fmol/mg (n=58), 47,5 pmol/mg. Medijana koncentracije

katapsina D od 44 pmol/mg je bila povezana sa tumorima u kojima je koncentracija PR bila manja od 20 fmol/mg (n=57), a medijana od 47,7 pmol/mg je bila povezana sa tumorima u kojima je koncentracija PR bila jednaka ili veća od 20 fmol/mg (n= 16).

4.2.1.2. Raspodela vrednosti koncentracija uPA

Vrednosti medijane koncentracije uPA su bile: 0,38 i 0,31 pg/mg za pacijentkinje stare 45-59 godina i one starije od 59 godina (n=15 i n=33, respektivno), 0,37 i 0,35 pg/mg za pacijentkinje sa pT1 i pT2 tumorima (n=26 i n=22, respektivno), 0,39, 0,31 i 0,23 pg/mg za pacijentkinje sa IDC, ILC i drugim histološkim tipovima tumora (n=22, n=18 i n=8, respektivno), kao i 0,34 i 0,31 za pacijentkinje sa negativnim, odn. pozitivnim imuhistohemijskim skorom za amplifikaciju HER-2 (n=32 i n=9, respektivno).

Tumori sa koncentracijom ER manjom od 10 fmol/mg (n=36) su bili okarakterisani medijanom vrednosti koncentracije uPA od 0,34 pg/mg, a oni sa koncentracijom ER jednakom ili većom od 10 fmol/mg (n=12) su bili okarakterisani medijanom od 0,36 pg/mg. U slučaju tumora sa koncentracijom PR manjom od 20 fmol/mg (n=34), medijana vrednosti koncentracije uPA je bila 0,39 pg/mg, a u slučaju tumora sa koncentracijom PR jednakom ili većom od 20 fmol/mg (n=14), medijana je bila 0,28 pg/mg.

4.2.1.3. Raspodela vrednosti koncentracija PAI-1

U grupama pacijentkinja koje su: a) bile starosti između 45 i 59 godina (n=16) ili starije od 59 godina (n=32), b) imale pT1 (n=26) ili pT2 tumore (n=22), c) imale IDC (n=24), ILC (n=16) ili tumore drugih histoloških tipova (n=8) i d) imale tumore sa negativnim (n=33) ili pozitivnim (n=8) imunohistološkim skorom za amplifikaciju HER-2, vrednosti medijane koncentracije PAI-11 su bile: a) 4,2 i 4,8 pg/mg, b) 4,8 i 4,3 pg/mg, c) 4, 5,7 i 3,8 pg/mg i 4 i 6,4 pg/mg, respektivno.

Grupe pacijentkinja sa nižim (n=12) ili višim (n=36) vrednostima ER su bile okarakterisane sa medijanama vrednosti koncentracije PAI-1 od 4 i 4,9 pg/mg, a grupe pacijentkinja sa

nižim (n=35) ili višim (n=13) vrednostima PR su bile okarakterisane sa medijanama vrednosti koncentracije PAI-1 od 4,5 i 4,7 pg/mg.

Statistički značajna razlika u raspodeli koncentracija biomarkera nije nađena ni u jednoj od grupa definisanih parametrima tumora ili domaćina tumora, ni za jedan od 3 molekularna biomarkera invazivnosti malignih ćelija.

4.2.2. Raspodela vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina nakon operacije

Raspodela vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija (katepsina D, uPA i PAI-1), u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina nakon operacije, su prikazane u Tabeli 5.

4.2.2.1. Raspodela vrednosti koncentracija katepsina D

Vrednosti medijane koncentracije katepsina D su bile: 47,6 i 41,1 pmol/mg za pacijentkinje starosti između 45-59 godina (n=21) i starije od 59 godina (n=31), 40,6 i 51,9 pmol/mg za pacijentkinje sa pT1 (n=32) i pT2 (n=20) tumorima, zatim 52,8, 33,3 i 32,7 pmol/mg za pacijentkinje sa IDC (n=18), ILC (n=14) i drugim (n=10) histološkim tipovima tumora, odn. 44,7 i 32,8 pmol/mg za pacijentkinje bez (n=35) i sa (n=10) amplifikacijom HER-2, respektivno.

Vrednosti medijane koncentracije katepsina D su bile: 24,5 i 46,4 pmol/mg za pacijentkinje sa nižim (n=12) i višim (n=40) vrednostima koncentracije ER, te 41,2 i 47,7 pmol/mg za pacijentkinje sa nižim (n=12) i višim (n=40) vrednostima koncentracije PR, respektivno.

Tabela 5. Karakteristike raspodele koncentracija katepsina D, uPA i PAI-1 u podgrupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora i tumora, za pacijentkinje čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina (61-120 meseci) nakon operacije.. Prikazani su broj i procentualna zastupljenost pacijentkinja u svakoj od analiziranih podgrupa, mediane vrednosti koncentracija, kao i p vrednosti koje se odnose na Mann-Whitney ili Kruskal-Wallis-ov test.

Karakteristike pacijenata i tumora	Broj pacijenata		Katepsin D (pmol/mg)		p*	Broj pacijenata		uPA (pg/mg)		p*	Broj pacijenata		PAI-1 (pg/mg)		p*	
	%	Mediana	%	Mediana		%	Mediana	%	Mediana		%	Mediana				
Starost (godine)	52					36					36					
45-59	21	40,4	47,6	0,9	14	38,9	0,39	0,04	15	41,7	4,07	21	58,3	4,72	0,9	
>59	31	59,6	41,1		22	61,1	0,27		21	58,3	4,72					
Veličina tumora	52				36				36							
pT1	32	61,5	40,6	0,4	21	58,3	0,37	0,7	21	58,3	4,55	15	41,7	4,02	0,9	
pT2	20	38,5	51,9		15	41,7	0,32		15	41,7	4,02					
Histološki tip	50				34				36							
IDC	26	50,0	52,8	0,3	18	52,9	0,42	0,03	20	55,6	4,07	9	25,0	4,55	0,6	
ILC	14	26,9	33,3		9	26,5	0,28		7	20,6	0,21		7	19,4		5,22
Drugi	10	19,2	32,7		7	20,6	0,21		7	19,4	5,22					
ER (fmol/mg)	52				36				36							
ER<10	12	23,1	24,5	0,1	11	30,6	0,39	0,6	11	30,6	4,07	25	69,4	4,55	0,9	
ER≥10	40	76,9	46,4		25	69,4	0,32		25	69,4	4,55					
PR (fmol/mg)	52				36				36							
PR<20	39	75,0	41,2	0,6	24	66,7	0,39	0,2	25	69,4	4,34	11	30,6	3,83	0,4	
PR≥20	13	25,0	47,7		12	33,3	0,28		11	30,6	3,83					
Amplifikacija HER-2	45				29				29							
Negativno	35	77,8	44,7	0,2	22	75,9	0,31	1	23	79,3	3,90	6	20,7	5,22	0,2	
Pozitivno	10	22,2	32,8		7	24,1	0,29		6	20,7	5,22					

* Mann-Whitney/Kruskal-Wallis test

4.2.2.2. Raspodela vrednosti koncentracija uPA

Vrednosti medijane koncentracije uPA su bile: 0,39 i 0,27 pg/mg za pacijentkinje stare 45-59 godina i one starije od 59 godina (n=14 i n=22, respektivno), 0,37 i 0,32 pg/mg za pacijentkinje sa tumorima manjim od 2cm i sa tumorim jednakim ili većim od 2 cm (n=26 i n=22, respektivno), 0,42, 0,28 i 0,21 pg/mg za pacijentkinje sa IDC, ILC i drugim histološkim tipovima tumora (n=18, n=9 i n=7, respektivno), te 0,31 i 0,29 za pacijentkinje sa negativnim, odn. pozitivnim imuhistohemijskim skorom za amplifikaciju HER-2 (n=22 i n=7, respektivno).

Za pacijentkinje čiji su tumori imali koncentraciju ER manju od 10 fmol/mg (n=11), medijana vrednosti koncentracije uPA je bila 0,39 pg/mg, a za one čiji su tumori imali koncentraciju ER jednaku ili veću od 10 fmol/mg (n=25), medijana vrednosti koncentracije uPA je bila 0,32 pg/mg. U slučaju tumora sa koncentracijom PR manjom od 20 fmol/mg (n=24) i jednakom ili većom od 20 fmol/mg (n=12), medijane vrednosti koncentracije uPA su bile 0,39 i 0,28 pg/mg, respektivno.

4.2.2.3. Raspodela vrednosti koncentracija PAI-1

U grupi od 15 pacijentkinja starosne dobi 45-59 godina i u grupi od 21 pacijentkinje starije od 59 godina, vrednosti medijane koncentracije PAI-1 su bile 4,07 i 4,72 pg/mg, dok su za 21 pacijentkinju sa pT1 tumorima i za 15 pacijentkinja sa pT2 tumorima, vrednosti medijane koncentracije PAI-1 su bile 4,55 i 4,02 pg/mg, respektivno. U grupama od 20 pacijentkinja sa IDC tumorima, 9 pacijentkinja sa ILC tumorima i 7 pacijentkinja sa drugim histološkim tipovima tumora, vrednosti medijane koncentracije PAI-1 su bile 4,07, 4,55 i 5,22 pg/mg, dok su u grupama od 23 pacijentkinje sa negativnim i 6 pacijentkinja sa pozitivnim skorom za amplifikaciju HER-2, vrednosti medijana bile 3,9 i 5,22 pg/mg, respektivno.

U grupama od 11 pacijentkinja sa nižim vrednostima koncentracije ER (25 za PR) i 25 pacijentkinja sa višim vrednostima koncentracije ER (11 za PR), vrednosti medijane koncentracije PAI-1 su bile 4,07 pg/mg (4,34 pg/mg za PR) i 4,55 pg/mg (3,83 pg/mg za PR), respektivno.

Statistički značajna razlika u raspodeli koncentracija bilo katepsina D bilo PAI-1 nije nađena ni u jednoj od grupa definisanih parametrima tumora ili domaćina tumora. Statistički značajna razlika u raspodeli koncentracija uPA je nađena samo za pacijentkinje različitih starosnih dobi (45-59 godina vs. starije od 59 godina, $p=0,04$), kao i za pacijentkinja sa različitim histološkim tipovima tumora (IDC vs. ILC, $p=0,03$). Pri tome su više vrednosti uPA imale pacijentkinje između 45 i 59 godina, odn. one sa IDC tumorima.

4.2.3. Raspodela vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije

Raspodele vrednosti koncentracija molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija (katepsina D, uPA i PAI-1), u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije, su prikazane u Tabeli 6.

4.2.3.1. Raspodela vrednosti koncentracija katepsina D

U okviru cele grupe, 22 pacijentkinje starosti između 45 i 59 godina i 45 pacijentkinja starijih od 59 godina su imale medijane vrednosti koncentracije katepsina D od 47,9 i 42,6 pmol/mg, dok je 36 pacijentkinja sa pT1 i 31 pacijentkinja sa pT2 tumorima imalo odgovarajuće medijane od 39,6 i 51,5 pmol/mg, respektivno. Medijane vrednosti koncentracije katepsina D su bile 50,3, 37,3 i 41,4 pmol/mg za pacijentkinje sa IDC (n=34), ILC (n=24) i drugim (n=13) histološkim tipovima tumora, dok su odgovarajuće vrednosti medijane bile 46,3 i 38,9 pmol/mg za pacijentkinje sa negativnim (n=50) i pozitivnim (n=13) imunohistohemijskim skorom za amplifikaciju HER-2, respektivno.

Što se tiče raspodele u grupama definisanim statusom steroidnih receptora, 15 pacijentkinja sa nižim i 52 pacijentkinje sa višim koncentracijama ER, odn. 52 pacijentkinja sa nižim i 15 pacijentkinja sa višim koncentracijama PR su imale medijane vrednosti koncentracije katepsina D od 30,7 i 47,6 pmol/mg, odn. 45,4 i 47,7 pmol/mg, respektivno.

4.2.3.2. Raspodela vrednosti koncentracija uPA i PAI-1

U grupi pacijentkinja starih 45-59 godina, po 15 njih je imalo medijanu vrednosti koncentracije uPA od 0,38 pg/mg i medijanu vrednosti koncentracije PAI-1 od 4,11 pg/mg, dok je kod pacijentkinja starijih od 59 godina, po 30 njih imalo medijanu za uPA od 0,3 pg/mg i medijanu za PAI-1 od 4,82 pg/mg. Tumori manji od 2 cm su bili okarakterisani medijanom vrednosti koncentracije uPA od 0,34 pg/mg i medijanom vrednosti koncentracije PAI-1 od 4,47 pg (po 24 pacijentkinje za oba biomarkera) dok su tumori jednaki ili veći od 2 cm bili karaltristični po odgovarajućim medijanama od 0,37 pg/mg i 4,53 pg/mg (po 21 pacijentkinja za oba biomarkera), respektivno. U odnosu na IDC, ILC i druge histološke tipove tumora, pacijentkinje su imale medijane vrednosti koncentracije

uPA od 0,4 (n=20), 0,31 (n=15) i 0,23 (n=8) pg/mg, kao i medijane vrednosti koncentracije PAI-1 od 4,04 (n=21), 5 (n=14) i 5,37 (n=8) pg/mg, respektivno.

Tabela 6. Karakteristike raspodele koncentracija katepsina D, uPA i PAI-1 u podgrupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora i tumora, za pacijentkinje čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina (1-120 meseci) nakon operacije. Prikazani subroj i procentualna zastupljenost pacijentkinja u svakoj od analiziranih podgrupa, mediane vrednosti koncentracija, kao i p vrednosti koje se odnose na Mann-Whitney ili Kruskal-Wallis-ov test.

Karakteristike pacijenata i tumora	Broj pacijenata		Katepsin D (pmol/mg)		p*	Broj pacijenata		uPA (pg/mg)		p*	Broj pacijenata		PAI-1 (pg/mg)		p*
		%	Mediana				%	Mediana			%	Mediana		%	
Starost (godine)	67					45					45				
45-59	22	32,8	47,9	0,9	15	33,3	0,38	0,1	15	33,3	4,11	0,9	30	66,7	4,82
>59	45	67,2	42,6		30	66,7	0,30		30	66,7	4,82				
Veličina tumora	67					45					45				
pT1	36	53,7	39,6	0,09	24	53,3	0,34	0,5	24	53,3	4,47	0,5	21	46,7	4,53
pT2	31	46,3	51,5		21	46,7	0,37		21	46,7	4,53				
Histološki tip	65					43					43				
IDC	30	44,8	50,3	0,5	20	46,5	0,40	0,4	21	48,8	4,04	0,3	14	32,6	5,00
ILC	22	32,8	39,1		15	34,9	0,31		14	32,6	5,00				
Drugi	13	19,4	41,1		8	18,6	0,23		8	18,6	5,37				
ER (fmol/mg)	67				45				45						
ER<10	15	22,4	30,7	0,2	12	26,7	0,34	0,8	12	26,7	3,99	0,4	33	73,3	4,93
ER≥10	52	77,6	47,6		33	73,3	0,37		33	73,3	4,93				
PR (fmol/mg)	67					45					45				
PR<20	52	77,6	45,4	0,9	31	68,9	0,39	0,09	33	73,3	4,39	0,7	12	26,7	4,72
PR≥20	15	22,4	47,7		14	31,1	0,28		12	26,7	4,72				
Amplifikacija HER-2	59					38					38				
Negativno	46	78,0	46,3	0,5	29	76,3	0,32	0,7	30	78,9	4,02	0,1	8	21,1	6,45
Pozitivno	13	22,0	38,9		9	23,7	0,31		8	21,1	6,45				

* Mann-Whitney/Kruskal-Wallis test

Negativan skor za amplifikaciju HER-2 je zabeležen u grupi od 29 pacijentkinja sa medijanom vrednosti koncentracije uPA od 0,32 pg/mg, kao i u grupi od 30 pacijentkinja sa medijanom vrednosti koncentracije PAI-1 od 4,02 pg/mg, dok je pozitivan skor detektovan u grupi od 9 pacijentkinja sa medijanom za uPA od 0,31 pg/mg, kao i u grupi od 8 pacijentkinja sa medijanom za PAI-1 od 6,45 pg/mg.

Tumori sa koncentracijama ER, odn. PR, manjim od 10, odn. 20 fmol/mg su bili okarakterisani sa medijanama vrednosti koncentracije uPA od 0,34 (n=36), odn. 0,39 (n=34) pg/mg, kao i sa medijanama vrednosti koncentracije PAI-1 od 4 pg/mg (n=12) i 4,5

(n=35) pg/mg, respektivno. Za tumore sa koncentracijama ER jednakim ili većim od 10 fmol/mg, medijane vrednosti koncentracija uPA i PAI-1 su bile 0,36 pg/mg (n=12) i 4,9 pg/mg (n=36), dok su, za tumore sa koncentracijama PR jednakim ili većim od 20 fmol/mg, medijane vrednosti koncentracija uPA i PAI-1 bile 0,28 pg/mg (n=14) i 4,7 pg/mg (n=13). Kao i u slučaju grupe pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije, i u slučaju pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije nije nađena statistički značajna razlika u raspodeli koncentracija biomarkera ni u jednoj od grupa definisanih parametrima tumora ili domaćina tumora, ni za jedan od 3 molekularna biomarkera invazivnosti malignih ćelija.

4.3. Korelacija vrednosti molekularnih biomarkera invazivnosti malignih ćelija sa vrednostima kontinualnih klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti tumora

4.3.1. Korelacija vrednosti molekularnih biomarkera u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije

Korelacija vrednosti koncentracija katepsina D, uPA i PAI-1, sa vrednostima kontinualnih klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti tumora, su prikazane u Tabeli 7.

Analiza je pokazala da, u grupi od 73 pacijentkinje, vrednosti koncentracije katepsina D nisu bile značajno povezane sa starošću pacijentkinja ($p=0,8$), koncentracijom ER ($p=0,2$) i koncentracijom PR ($p=0,3$). Za 48 pacijentkinja, za koje su bili dostupni uzorci za određivanje uPA i PAI-1, utvrđeno je da vrednosti koncentracije PAI-1 nisu bile značajno povezane sa starošću pacijentkinja ($p=0,4$), koncentracijom ER ($p\sim 1$) i koncentracijom PR ($p=0,3$). Vrednosti koncentracije uPA nisu bile značajno povezane sa koncentracijama ER ($p=0,5$) i PR ($p=0,3$), dok su statistički značajno, negativno korelisale sa godinama starosti pacijentkinja ($p=0,04$, $r=-0,31$).

Tabela 7. Korelacija vrednosti koncentracije: a) katepsina D, b) uPA i c) PAI-1 sa godinama bolesnica, u grupi bolesnica čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina (1-60 meseci) nakon operacije. Prikazani su: p vrednost za Spearmann-ov test (p), koeficijent korelacije za Spearmann-ov test (r) i broj bolesnica u ispitivanoj grupi (N);

Karakteristike pacijenata i tumora	Katepsin D (pmol/mg)			uPA (pg/mg)			PAI-1 (pg/mg)		
	Broj pacijenata	r	p*	Broj pacijenata	r	p*	Broj pacijenata	r	p*
Starost (godine)	73	-0,04	0,8	48	-0,31	0,04	48	-0,12	0,4
ER (fmol/mg)	73	0,18	0,2	48	-0,11	0,5	48	0,008	0,96
PR (fmol/mg)	73	0,14	0,3	48	-0,17	0,3	48	0,18	0,3

* Spearmann test

4.3.2. Korelacija vrednosti molekularnih biomarkera u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina nakon operacije

Korelacija vrednosti koncentracija katepsina D, uPA i PAI-1, sa vrednostima kontinualnih klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti tumora, su prikazane u Tabeli 8.

U grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti bio praćen tokom drugih 5 godina nakon operacije, korelacija vrednosti koncentracija biomarkera, sa vrednostima kontinualnih klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti tumora, je bila analizirana za 52 pacijentkinje u slučaju katepsina D, a za po 36 pacijentkinja u slučaju uPA i PAI-1. Za Katepsin D nije nađena korelacija njegovih vrednosti koncentracije sa starošću pacijentkinja ($p=0,9$), koncentracijom ER ($p=0,08$) ili koncentracijom PR ($p=0,1$), kao što nije ni u slučaju PAI-1 ($p=0,5$ za sva 3 parametra tumora i domaćina tumora). Što se tiče uPA, nije nađena korelacija njegovih vrednosti koncentracije sa koncentracijama ER ($p=0,2$) i PR ($p=0,4$), dok je nađena statistički značajna, negativna korelacija sa godinama pacijentkinja ($p<0,05$, $r=-0,33$).

Tabela 8. Korelacija vrednosti koncentracije: a) katepsina D, b) uPA i c) PAI-1 sa godinama bolesnica, u grupi bolesnica čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina (61-120 meseci) nakon operacije. Prikazani su: p vrednost za Spearmann-ov test (p), koeficijent korelacije za Spearmann-ov test (r) i broj bolesnica u ispitivanoj grupi (N);

Karakteristike pacijenata i tumora	1-60 meseci								
	Katepsin D (pmol/mg)			uPA (pg/mg)			PAI-1 (pg/mg)		
	Broj pacijenata	r	p*	Broj pacijenata	r	p*	Broj pacijenata	r	p*
Starost (godine)	52	-0,02	0,9	36	-0,33	<0,05	36	-0,13	0,5
ER (fmol/mg)	52	0,25	0,08	36	-0,22	0,2	36	-0,13	0,5
PR (fmol/mg)	52	0,22	0,1	36	-0,15	0,4	36	-0,13	0,5

* Spearmann test

4.3.3. Korelacija vrednosti molekularnih biomarkera u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije

Korelacija vrednosti koncentracija katepsina D, uPA i PAI-1, sa vrednostima kontinualnih klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti tumora, su prikazane u Tabeli 9.

Tabela 9. Korelacija vrednosti koncentracije: a) katepsina D, b) uPA i c) PAI-1 sa godinama bolesnica, u grupi bolesnica čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina (1-120 meseci) nakon operacije. Prikazani su: p vrednost za Spearmann-ov test (p), koeficijent korelacije za Spearmann-ov test (r) i broj bolesnica u ispitivanoj grupi (N);

Karakteristike pacijenata i tumora	1-60 meseci								
	Katepsin D (pmol/mg)			uPA (pg/mg)			PAI-1 (pg/mg)		
	Broj pacijenata	r	p*	Broj pacijenata	r	p*	Broj pacijenata	r	p*
Starost (godine)	67	-0,07	0,6	45	-0,29	0,056	45	0,3	<0,05
ER (fmol/mg)	67	0,19	0,1	45	-0,09	0,6	45	0,05	0,8
PR (fmol/mg)	67	0,16	0,2	45	-0,15	0,4	45	0,03	0,8

* Spearmann test

Vrednosti koncentracije katepsina D nisu bile značajno povezane sa godinama pacijentkinja ($p=0,6$), koncentracijom ER ($p=0,1$) i koncentracijom PR ($p=0,2$), u analiziranoj grupi od 67 pacijentkinja. Korelacije vrednosti koncentracije uPA i PAI-1 su bile analizirane za po 45 pacijentkinja. Pokazalo se da ne postoji značajna povezanost koncentracije uPA sa koncentracijama ER ili PR, jer su odgovarajuće p vrednosti *Spearman*-ovog test bile 0,6 i 0,4, respektivno, kao i da postoji tendencija ka statistički značajnoj, negativnoj korelaciji sa starošću pacijentkinja ($p=0,056$, $r=-0,29$). Slično tome, ustanovljeno je da ne postoji značajna korelacija između vrednosti koncentracije PAI-1 i koncentracije ER ili PR ($p=0,8$ u slučaju oba steroidna receptora), dok je nađena statistički značajna, pozitivna korelacija vrednosti koncentracije PAI-1 sa godinama pacijentkinja ($p<0,05$, $r=0,3$).

4.4. Određivanje granične vrednosti za kontinualne klasične i biomarkere estrogene zavisnosti tumora korišćenjem tzv. „pristupa minimalne p vrednosti“

4.4.1. Određivanje granične vrednosti za biomarkere u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije

Kao što se može videti na Grafikonu 1, u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije, granična vrednost za kontinualni biomarker je, korišćenjem tzv. „pristupa minimalne p vrednosti“, nađena samo u slučaju PAI-1. Za graničnu vrednost koncentracije PAI-1 od 6,35 pg/mg, pacijentkinje sa koncentracijama PAI-1 manjim od granične vrednosti imale su statistički značajno različite verovatnoće za interval bez ponovnog javljanja bolesti (DFI, skr. od *eng. Disease-Free Interval*) od pacijentkinja sa koncentracijama PAI-1 većim od granične vrednosti. Za navedenu graničnu vrednost koncentracije PAI-1 je dobijena minimalna p vrednost za *log-rank* test od 0,04.

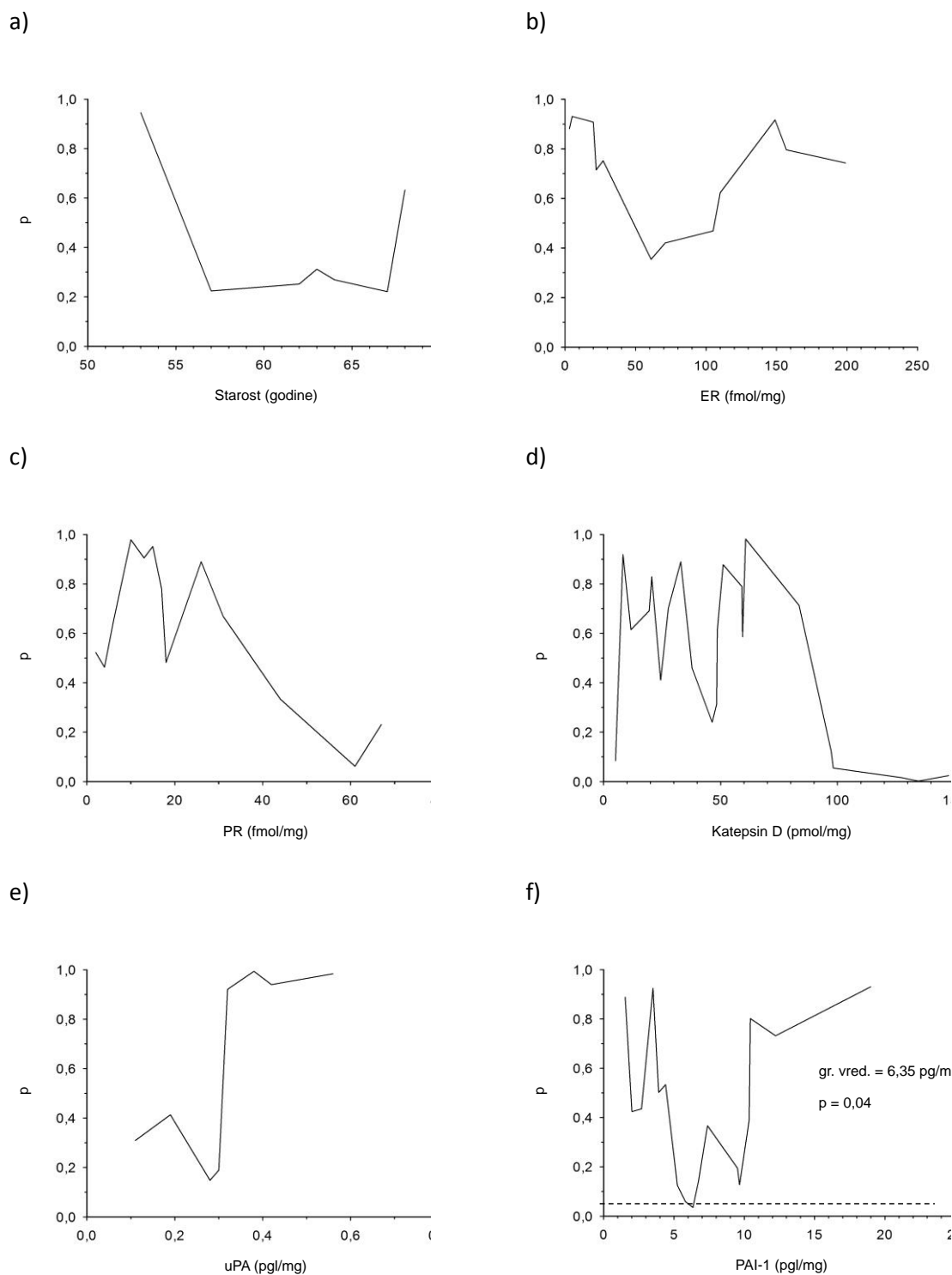
U svakoj od analiziranih grupa pacijentkinja, na osnovu poznatog broja pacijentkinja sa potvrđenim prisustvom udaljenih metastaza i poznatog vremenskog intervala, proteklog od hirurške terapije do pojave udaljenih metastaza za svaku od tih pacijentkinja, kao i na osnovu broja pacijentkinja kod kojih nisu detektovane metastaze u periodu ukupnog praćenja toka bolesti, moguće je izračunati verovatnoće za DFI korišćenjem metode

Kaplan-a i Meier-a. Upotrebom *log-rank* testa je bilo moguće ispitati da li postoje značajne razlike u verovatnoćama za DFI između analiziranih grupa pacijentkinja.

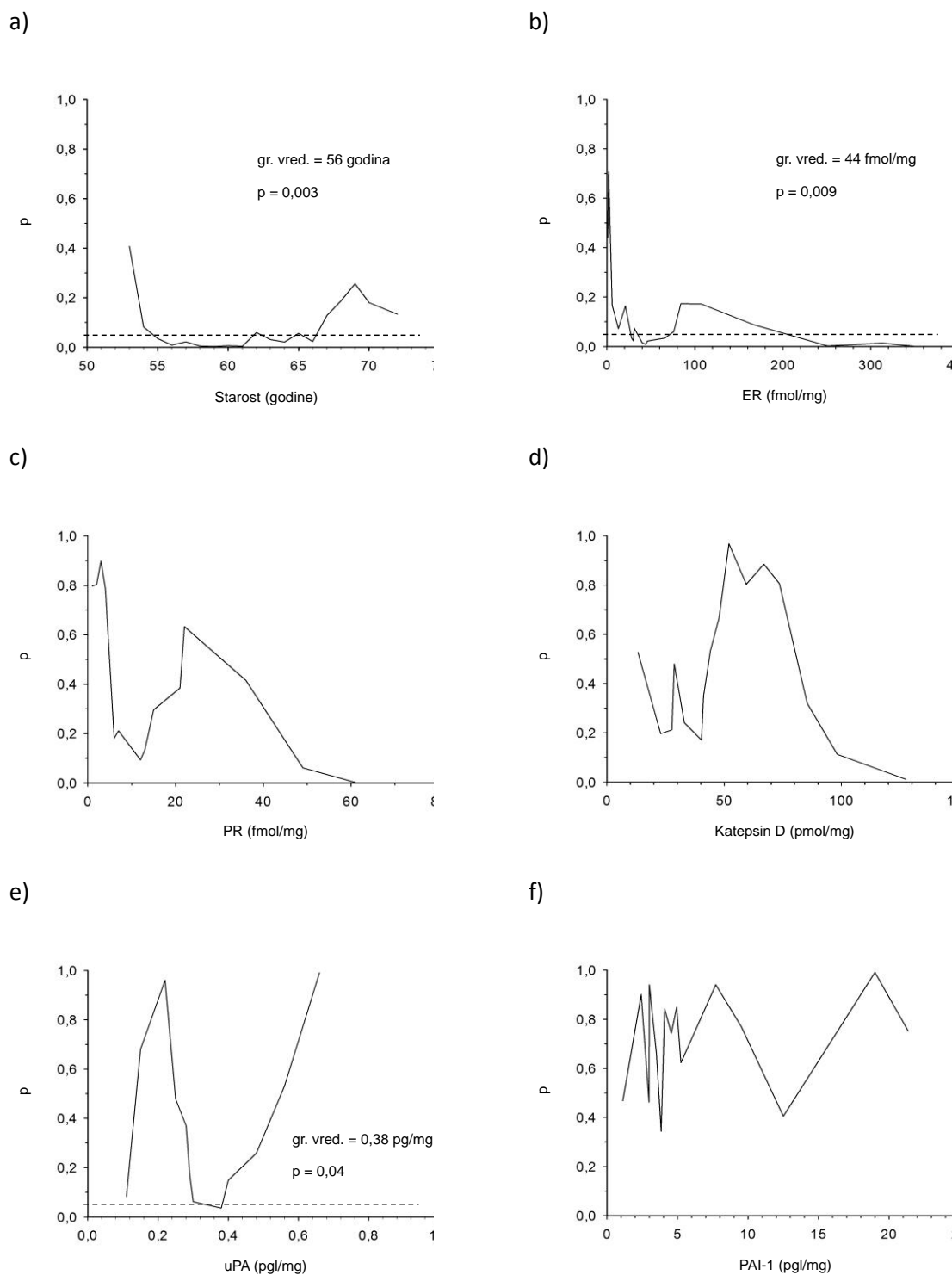
4.4.2. Određivanje granične vrednosti za biomarkere u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina nakon operacije

Na Grafikonu 2 su prikazani dijagrami koji se odnose na određivanje graničnih vrednosti kontinualnih biomarkera, u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina nakon operacije. Granične vrednosti su nađene u slučaju godina starosti pacijentkinja, koncentracije ER i koncentracije uPA.

Za starost pacijentkinja, pri graničnoj vrednosti od 56 godina, verovatnoće za DFI za pacijentkinje mlađe od 56 godina i za pacijentkinje koji imaju 56 ili više godina se statistički značajno razlikuju, pri čemu se dobija minimalna p vrednost za *log-rank* test ($p=0,003$). Kada su bile upoređene pacijentkinje koje su imale koncentracije ER manje od 44 fmol/mg i one koje su imale koncentracije ER jednake ili veće od 44 fmol/mg, nađeno je da se njihove verovatnoće za DFI statistički značajno razlikuju i da je, pri tome, dobijena p vrednost ($p=0,009$) za *log-rank* test minimalna. Slično tome, poređenjem verovatnoća za DFI u grupama pacijentkinja sa koncentracijama uPA manjim od 0,38 pg/mg i sa koncentracijama uPA jednakim ili većim od 0,38 pg/mg, ustanovljeno je da se one statistički značajno razlikuju. Za navedenu graničnu vrednost koncentracije uPA se dobija minimalna p vrednosti *log-rank* testa ($p=0,04$).



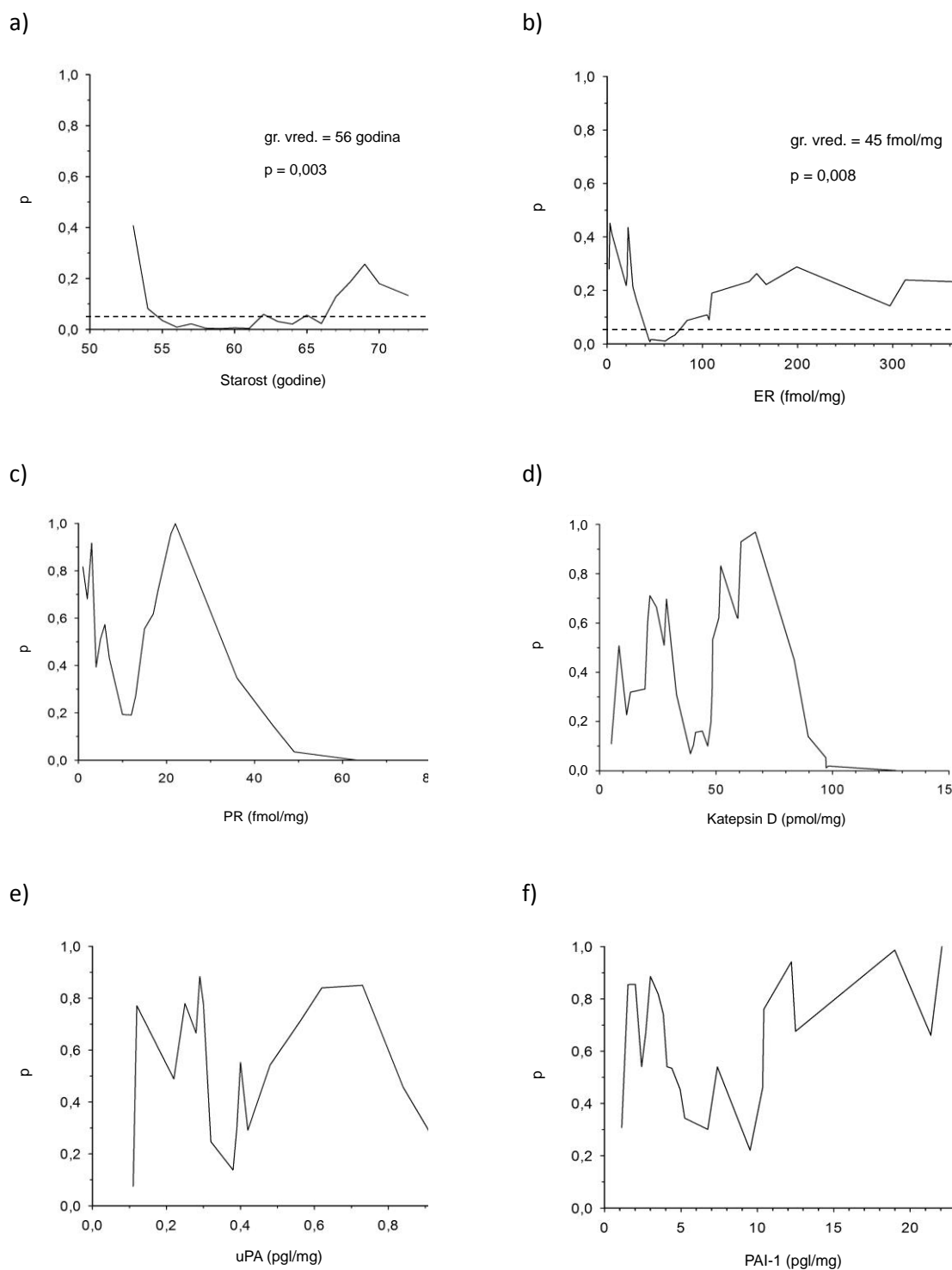
Grafikon 1. Određivanje graničnih vrednosti za kontinualne biomarkere: a) godine, b) ER, c) PR, d) katepsin D, e) uPA i f) PAI-1, u grupi bolesnika čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina (1-60 meseci) nakon operacije. Naznačene su granične vrednosti biomarkera za koje su, upotrebom „log-rank“ testa, izračunate minimalne p vrednostikoje imaju statističku značajnost.



Grafikon 2. Određivanje graničnih vrednosti za kontinualne biomarkere: a) godine, b) ER, c) PR, d) katepsin D, e) uPA i f) PAI-1, u grupi bolesnika čiji je tok bolesti praćen tokom drugih 5 godina (61-120 meseci) nakon operacije. Naznačene su granične vrednosti biomarkera za koje su, upotrebom „log-rank“ testa, izračunate minimalne p vrednostikoje imaju statističku značajnost.

4.4.3. Određivanje granične vrednosti za biomarkere u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije

Dijagrami koji se odnose na određivanje graničnih vrednosti kontinualnih biomarkera, u grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina nakon operacije su predstavljeni na Grafikonu 3. Granične vrednosti su nađene u slučaju godina starosti pacijentkinja (56 godina) i koncentracije ER (45 fmol/mg). Verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale za pacijentkinje mlađe od 56 i one stare 56 i više godina, kao i za pacijentkinje sa koncentracijama ER manjim od 45 i koncentracijama jednakim ili većim od 45 fmol/mg, a dobijene p vrednost *log-rank* testa od 0,003 i 0,008, respektivno, su bile minimalne za prethodno navedene granične vrednosti.



Grafikon 3. Određivanje graničnih vrednosti za kontinualne biomarkere: a) godine, b) ER, c) PR, d) katepsin D, e) uPA i f) PAI-1, u grupi bolesnika čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 10 godina (1-120 meseci) nakon operacije. Naznačene su granične vrednosti biomarkera za koje su, upotrebom „log-rank“ testa, izračunate minimalne p vrednosti koje imaju statističku značajnost.

4.5. Ispitivanje prognostičkog značaja fenotipova karcinoma dojke definisanih kombinovanjem klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti

4.5.1. Prognostički značaj fenotipova karcinoma dojke, definisanih kombinovanjem klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti, tokom prvih 5 godina nakon operacije

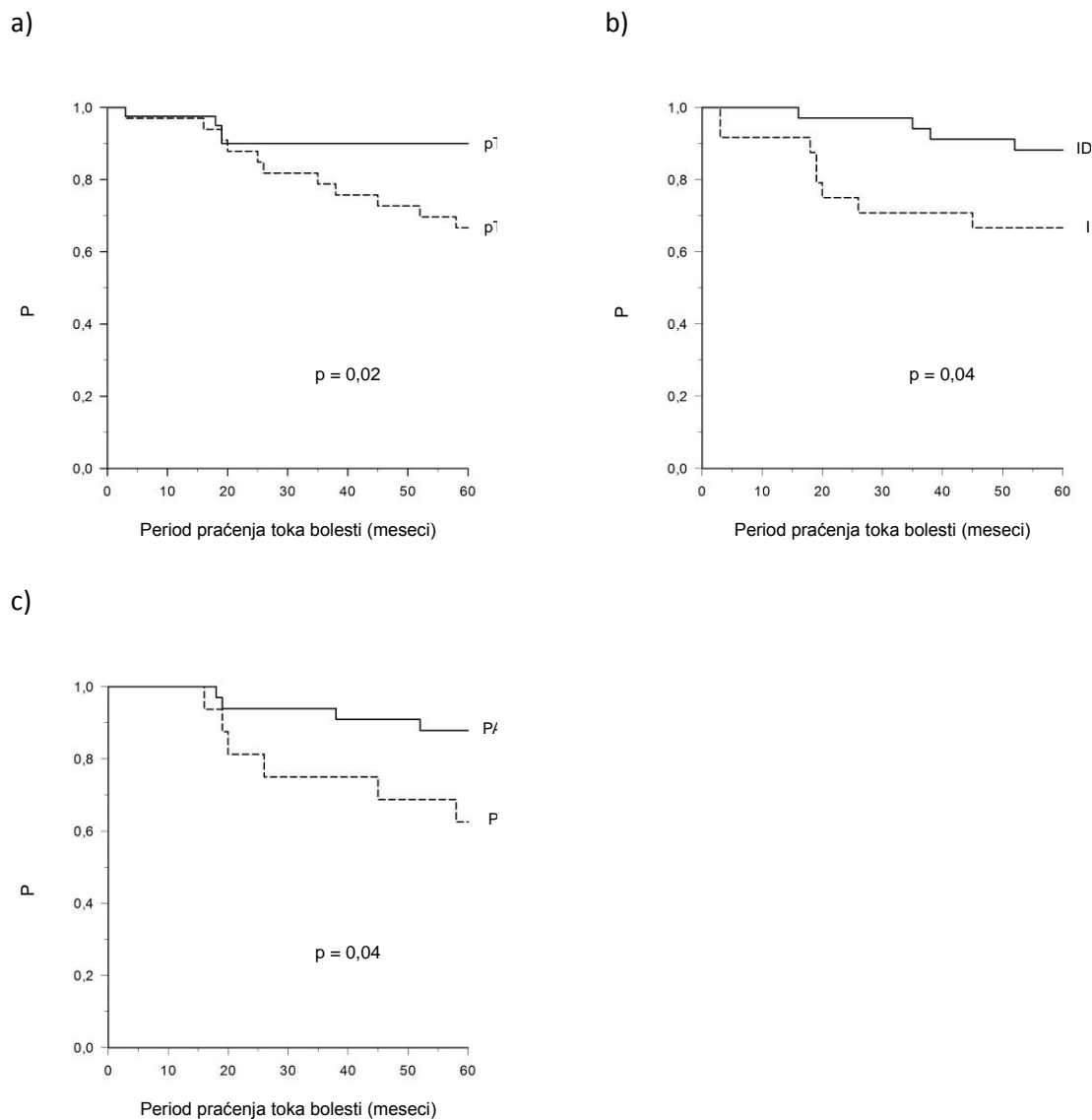
Sa obzirom na to da su za kontinualne biomarkere nađene granične vrednosti za njihove koncentracije, definisani su negativni, odn. pozitivni statusi biomarkera kao oni kod kojih su vrednosti koncentracije datog biomarkera manje od, odn. jednake ili veće od granične vrednosti.

U grupi pacijentkinja čiji je tok bolesti praćen tokom prvih 5 godina nakon operacije, 15 pacijentkinja je doživelo ponovno javljanje (relaps) bolesti, dok kod 58 pacijentkinja nisu bile detektovane udaljene metastaze u periodu praćenja toka bolesti. Verovatnoća za DFI na kraju perioda praćenja toka bolesti je bila 0,79 (podaci nisu prikazani). Verovatnoće za DFI su analizirane u okviru grupa pacijentkinja definisanih parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima biomarkera. Statistička analiza je pokazala da se verovatnoće za DFI statistički značajno razlikuju između grupa pacijentkinja definisanih veličinom tumora, histološkim tipom tumora ili statusom PAI-1 (Grafikon 4).

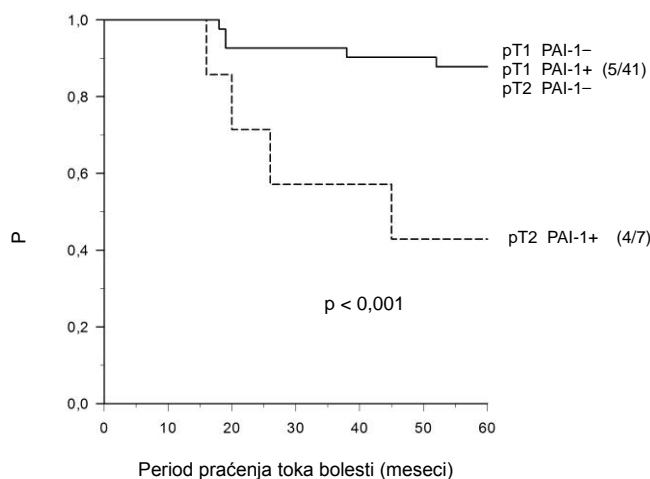
Statističkom analizom je ustanovljeno da su kod 4 pacijentkinje, od 40 njih sa tumorima manjim od 2 cm, odn. kod 11 pacijentkinja, od 33 njih sa tumorima jednakim ili većim od 2 cm, bile potvrđene udaljene metastaze što je uslovalo da se verovatnoće za DFI između ove 2 grupe pacijentkinja statistički značajnu razlikuju ($p=0,02$, Grafikon 4a). Među 34 pacijentkinje koje su imale tumore (invazivnog) dukalnog tipa, te među 24 pacijentkinje koje su imale tumore (invazivnog) lobularnog tipa, udaljene metastaze su se razvile kod 4, odn. kod 8 pacijentkinja, respektivno, a odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ($p=0,04$, Grafikon 4b). Kao što je već napomenuto, verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale između grupa pacijentkinja sa različitim statusom PAI-1 ($p=0,04$) jer su udaljene metastaze bile detektovane kod 4 od 33 pacijentkinja sa negativnim, odn. kod 6 od 16 pacijentkinja sa pozitivnim statusom PAI-1 (Grafikon 4c). Pri tome su pacijentkinje sa pT1 tumorima, sa IDC tumorima ili sa negativnim statusom PAI-1

imale povoljniji tok bolesti. Rezultati koji su predstavljeni na Grafikonu 4 su usmerili dalji tok analize.

Da bi se ispitaio značaj statusa PAI-1 u prognozi toka bolesti pacijentkinja sa karcinomom dojke, ispitivan je prognostički značaj fenotipova karcinoma dojke definisanih kombinovanjem biomarkera za koje su nađene statistički značajne razlike za verovatnoće za DFI između grupa pacijentkinja. Statističkom analizom je utvrđeno da fenotip karcinoma dojke, definisan veličinom tumora i statusom PAI-1, ima prognostički značaj. Ustanovljeno je da se verovatnoće za DFI statistički značajno razlikuju ($p < 0.001$, grafikon 5) između grupe pacijentkinja sa tumorima manjim od 2 cm, nezavisno od statusa PAI-1, ili sa tumorima jednakim ili većim od 2 cm i negativnim statusom PAI-1 (5 pacijentkinja sa i 36 bez relapsa), sa jedne strane, i grupe pacijentkinja sa tumorima jednakim ili većim od 2 cm i pozitivnim statusom PAI-1 (4 pacijentkinje sa i 3 bez relapsa), sa druge strane. Potonje pacijentkinje su imale nepovoljniji tok bolesti, sa obzirom na verovatnoću za DFI od $P=0,43$, u odnosu na prvospomenute koje su imale verovatnoću za DFI od $P=0,88$.



Grafikon 4. Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa: a) pT1 i pT2 tumorima, b) IDC i ILC tumorima, c) tumorima sa negativnim (PAI-1-), odn. pozitivnim (PAI-1+) statusom PAI-1. U zagradama je prikazan broj pacijentkinja sa udaljenim metastazama i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Naznačene p vrednosti se odnose na log-rank test.

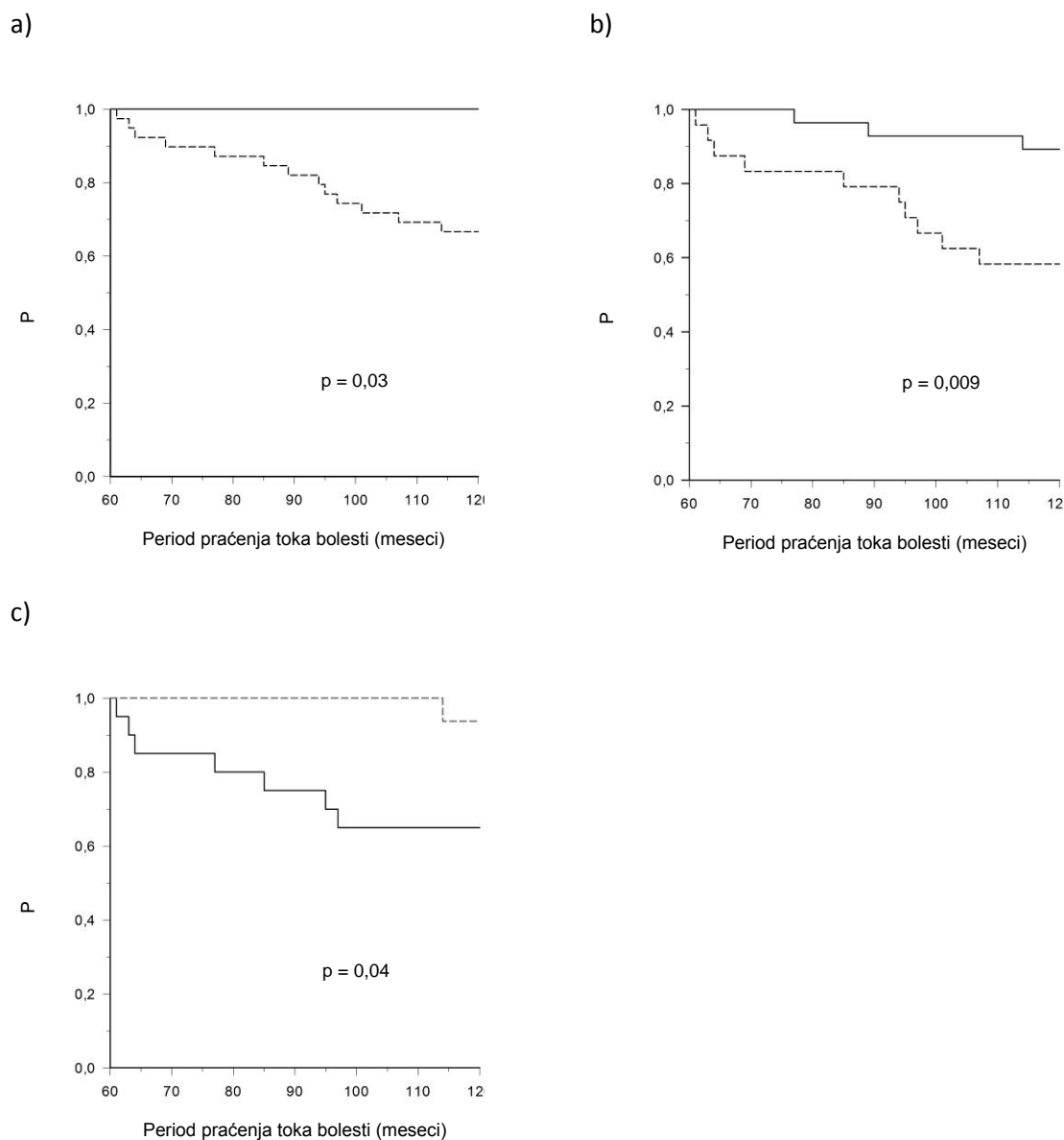


Grafikon.5 - Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa pT1 tumorima (nezavisno od statusa PAI-1) ili pT2 tumorima i negativnim statusom PAI-1 (puna linija), kao i za pacijentkinje sa pT2 tumorima i pozitivnim statusom PAI-1 (isprekidana linija). U zagradama je prikazan broj pacijentkinja kod kojih su detektovane udaljene metastaze i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Naznačena p vrednosti se odnosi na log-rank test.

4.5.2. Prognostički značaj fenotipova karcinoma dojke, definisanih kombinovanjem klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti, tokom drugih 5 godina nakon operacije

Verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale između grupa pacijentkinja definisanih godinama pacijentkinja, statusom ER ili statusom uPA (Grafikon 6), u okviru perioda praćenja toka bolesti od 61. do 120. meseca.

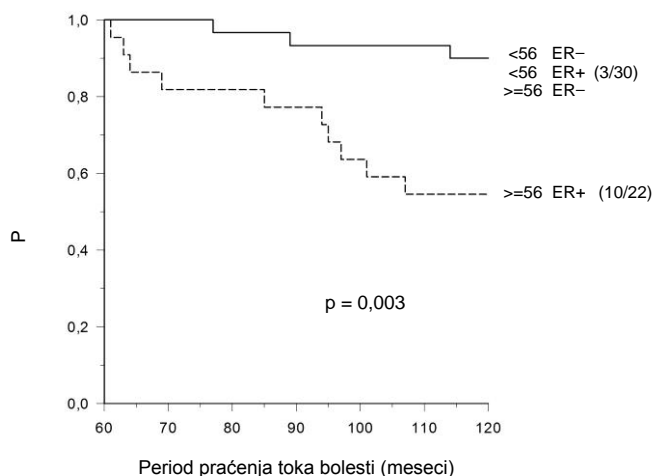
Od 13 pacijentkinja mlađih od 56 godina, nijedna pacijentkinja nije imala relaps bolesti u toku perioda praćenja toka bolesti dok je 13 pacijentkinja od 39, starih 56 ili više godina, imalo relaps bolesti. Nađena je statistički značajna razlika u verovatnoćama za DFI između dve navedene grupe pacijentkinja ($p=0,03$, Grafikon 6a). Sledstveno, mlađe pacijentkinje su imale povoljniji tok bolesti. Među 28 pacijentkinja sa negativnim statusom ER, 3 pacijentkinje su imale udaljene metastaze, a među 24 pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER, njih 10 je imalo udaljene metastaze.



Grafikon 6. Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje: a) mlađe (<56) i starije (>=56) od 56 godina, b) sa negativnim (ER -), odn. pozitivnim (ER+) statusom ER i c) sa negativnim (uPA -), odn. pozitivnim (uPA+) statusom uPA. U zagradama je prikazan broj pacijentkinja kod kojih su detektovane udaljene metastaze i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Naznačene p vrednosti se odnose na log-rank test

i one su imale nepovoljniji tok bolesti. Verovatnoće za DFI između ove dve grupe pacijentkinja su se statistički značajno razlikovale ($p=0,009$, Grafikon 6b). Pozitivan status uPA je uslovio povoljniji tok bolesti grupe od 16 pacijentkinja, u kojoj je 1 pacijentkinja imala relaps bolesti, u odnosu na grupu od 20 pacijentkinja sa negativnim statusom uPA, u kojoj je 7 pacijentkinja doživelo relaps bolesti. Nađena je statistički značajna razlika u verovatnoćama za DFI između 2 grupe pacijentkinja ($p=0,04$, Grafikon 6c).

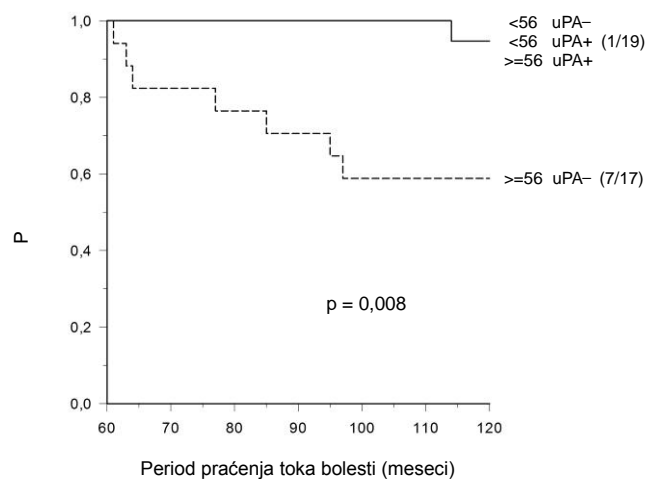
Značaj statusa uPA u prognozi toka bolesti pacijentkinja sa karcinomom dojke je ispitivan u okviru analize fenotipova karcinoma dojke definisanih kombinovanjem biomarkera za koje su nađene statistički značajne razlike za verovatnoće za DFI između grupa pacijentkinja. Pacijentkinje mlađe od 56 godina, bez obzira na status ER, ili one stare 56 ili više godina, a sa negativnim statusom ER (3 pacijentkinje sa relapsom, od ukupno 30 pacijentkinja), su imale povoljniji tok bolesti u odnosu na pacijentkinje stare 56 ili više godina, a sa pozitivnim statusom ER (10 pacijentkinja sa relapsom, od ukupno 22 pacijentkinje), sa obzirom na to da su odgovarajuće verovatnoće za DFI bile $P=0,9$ i $P=0,55$, respektivno, i da su se statistički značajno razlikovale ($p=0,003$, Grafikon 7).



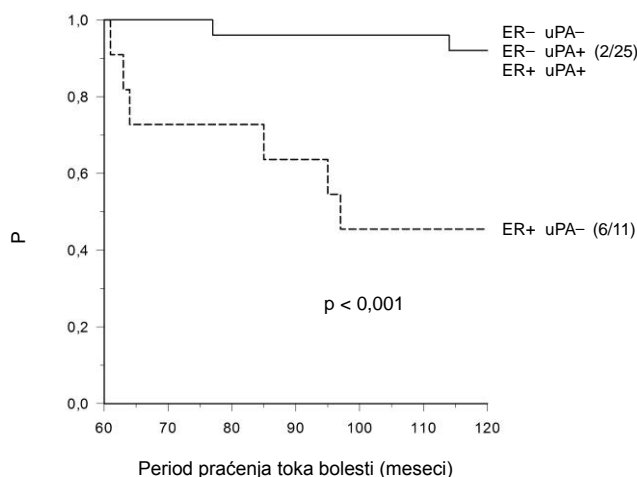
Grafikon 7. Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje mlađe od 56 godina, nezavisno od statusa ER, ili stare od 56 ili više godina sa negativnim statusom ER (puna linija), kao i za pacijentkinje stare 56 i više godina sa pozitivnim statusom ER (isprekidana linija). U zagradama je prikazan broj pacijentkinja kod kojih su detektovane udaljene metastaze i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Naznačena p vrednosti se odnosi na log-rank test.

Slično tome, pacijentkinje mlađe od 56 godina, bez obzira na status uPA, ili one stare 56 ili više godina, a sa pozitivnim statusom uPA (1 pacijentkinje sa relapsom, od ukupno 19 pacijentkinja), su imale povoljniji tok bolesti u odnosu na pacijentkinje stare 56 ili više godina, a sa negativnim statusom uPA (7 pacijentkinja sa relapsom, od ukupno 17), pri čemu su odgovarajuće verovatnoće za DFI bile $P=0,95$ i $P=0,59$, respektivno, i statistički su se značajno razlikovale ($p=0,008$, Grafikon 8).

Kada su analizirane pacijentkinja sa kombinovanim statusima ER i uPA, utvrđeno je da pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER i negativnim statusom uPA imaju statistički značajno manju verovatnoću za DFI ($P=0,45$) i, shodno tome, nepovoljniji tok bolesti u odnosu na pacijentkinje sa negativnim statusom ER i različitim statusima uPA ili sa pozitivnim statusima oba biomarkera ($P=0,45$). Ovakav nalaz je posledica činjenice da je u prvospomenutoj grupi bilo 25 pacijentkinja, od kojih 2 sa relapsom bolesti, dok je u drugoj grupi bilo 11 pacijentkinja, od kojih je 6 imalo relaps bolesti.



Grafikon 8. Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje mlađe od 56 godina, nezavisno od statusa uPA, ili stare 56 ili više godina sa pozitivnim statusom uPA (puna linija), kao i za pacijentkinje stare 56 ili više godina sa negativnim statusom uPA (isprekidana linija). U zagradama je prikazan broj pacijentkinja kod kojih su detektovane udaljene metastaze i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Naznačena p vrednosti se odnosi na log-rank test.



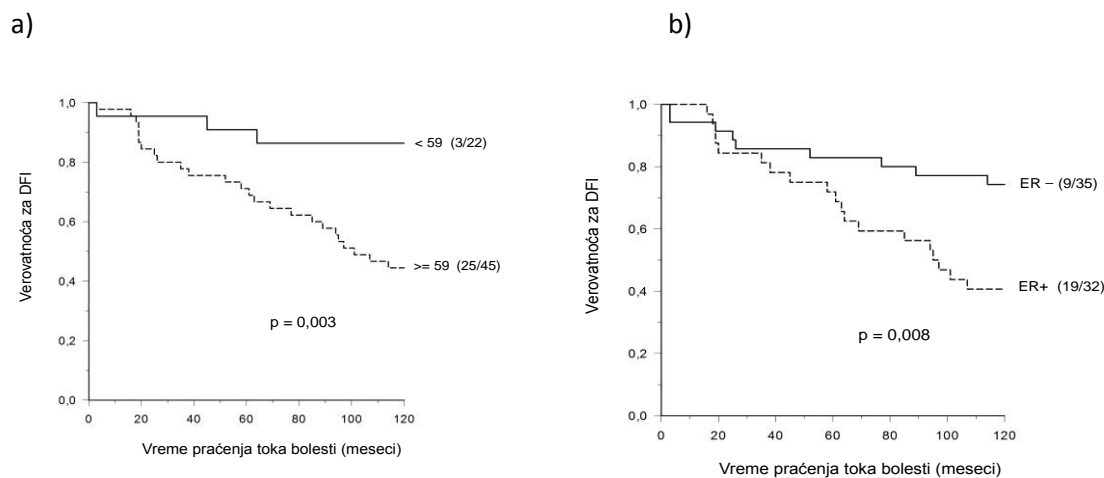
Grafikon 9. Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa negativnim statusom ER, nezavisno od statusa uPA, ili sa pozitivnim statusima ER i uPA (puna linija), kao i za pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER i negativnim statusom uPA (isprekidana linija). U zagradama je prikazan broj pacijentkinja kod kojih su detektovane udaljene metastaze i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Naznačena p vrednosti se odnosi na log-rank test.

Treba napomenuti da su pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER i negativnim statusom uPA imale najnepovoljniji tok bolesti kada se posmatraju analizirani fenotipovi definisani starošću pacijentkinja i statusima ER i uPA (Grafikon 9).

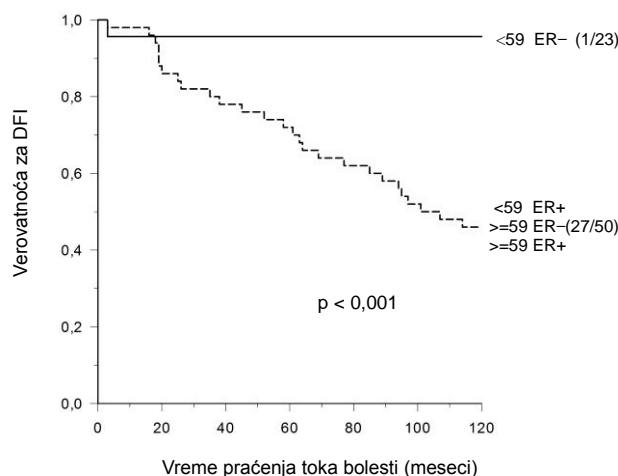
4.5.3. Prognošički značaj fenotipova karcinoma dojke, definisanih kombinovanjem klasičnih i biomarkera estrogene zavisnosti, tokom prvih 10 godina nakon operacije

Kao što je u poglavlju 4.4.3 navedeno, prilikom analiziranja perioda praćenja toka bolesti u trajanju od 10 godina nakon operacije, nisu nađene granične vrednosti za koncentracije biomarkera invazivnosti malignih ćelija (katepsin D, uPA i PAI-1), dok su nađene granične vrednosti za godine starosti pacijentkinja (59 godina) i za koncentraciju ER (45 fmol/mg). Na grafikonu 10a su prikazane verovatnoće za DFI za 22 pacijentkinje mlađe od 59 godina i za 45 pacijentkinja starih 59 ili više godina. U datim grupama, 3 odn. 25 pacijentkinja, respektivno, je imalo udaljene metastaze. Odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ($p=0,003$), mlađe pacijentkinje su imale povoljniji tok bolesti. Na

Grafikonu 10b su prikazane verovatnoće za DFI za 35 pacijentkinja sa negativnim i za 32 pacijentkinja sa pozitivnim statusom ER, među kojima je bilo 9, odn. 19 pacijentkinja sa relapsom bolesti, respektivno. Pacijentkinje sa negativnim statusom ER su imale statistički značajno veće verovatnoće za DFI ($p=0,008$).



Grafikon 10. Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje: a) mlađe (<59) i starije (>=59) od 59 godina, b) sa negativnim (ER -), odn. pozitivnim (ER+) statusom ER. U zagradama je prikazan broj pacijentkinja kod kojih su detektovane udaljene metastaze i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Naznačene p vrednosti se odnose na log-rank test



Grafikon 11. Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje mlađe od 59 godina sa negativnim statusom ER (puna linija), kao i za pacijentkinje starije od 59 godina, nezavisno od statusa ER, ili mlađe od 59 godina sa pozitivnim statusom ER (isprekidana linija). U zagradama je prikazan broj pacijentkinja sa udaljenim metastazama i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Naznačena p vrednosti se odnose na log-rank test

Analizom fenotipa definisanog godinama pacijentkinja i statusom ER ustanovljeno je da su pacijentkinje mlađe od 59 godina i sa pozitivnim statusom ER, kao i pacijentkinje stare 59 ili više godina, sa različitim statusima ER, imale uporedive verovatnoće za DFI. Stoga su navedene pacijentkinje analizirane kao jedan fenotip. Verovatnoće za DFI za navedene pacijentkinje su se statistički značajno razlikovale od odgovarajućih verovatnoća pacijentkinja mlađih od 59 godina i sa negativnim statusom ER ($p < 0,001$, Grafikon 11).

5. DISKUSIJA

Širenje malignih ćelija iz primarnog tumora može biti vrlo rani događaj, čak i u premalignoj fazi [359]. Klinička manifestacija metastaza može biti različita. U nekim slučajevima, metastaze se javljaju relativno rano, sinhrono sa dijagnozom primarnog tumora a nasuprot tome one se mogu javiti asinhrono, nakon aktivacije iz stanja uspavanosti tumora. U tom periodu, pojedinačne ćelije raka ili nove ali klinički i dijagnostički nedetektibilne mikrometastaze se održavaju. Klasični faktori prognoze i predikcije toka bolesti (parametri domaćina tumora i parametri tumora) se rutinski i svakodnevno koriste u kliničkoj praksi za procenu rizika pojave udaljenih metastaza pacijenata koji su lečeni od raka dojke. Na osnovu klasičnih prognostičkih faktora još uvek nije moguće pouzdano selektovati pacijente sa visokim rizikom za relaps koji će imati korist od adjuvantne terapije i one sa niskim rizikom koji mogu biti eventualno pošteđeni od terapije. Primećeno je da se pojava udaljenih metastaza karcinoma dojke dešava najčešće u dva vremenska perioda. Prvi, rani relaps bolest je opisan između 2. i 3.godine nakon hirurškog lečenja a drugi, kasni relaps oko 5.godine, nakon čega sledi postepen ali stabilan pad krive učestalosti relapsa [360]. Ovi podaci ukazuju na to da postoje različiti biološki mehanizmi tokom prvih 5 godina od inicijalnog hirurškog lečenja karcinoma dojke, tj.tokom ranog praćenja (early follow-up) u odnosu na period nakon navršenih pet godina, tj.tokom kasnog kraćenja (late follow up). Sa kliničkog aspekta, identifikacija biomarkera ranog relapsa karcinoma dojke ne samo da bi mogla da poboljša prognozu modeliranjem individualne terapije već bi potencijalno mogla da usmeri istraživanja u novom pravcu. Danas je dobro poznato da tokom kancerogeneze dolazi do konstantnih genetskih i epigenetskih alteracija koje rezultiraju u povećanju heterogenosti primarnog tumora [361,362].

Treba razlikovati termin prognostički faktor, onaj koji je povezan sa tokom bolesti pacijenata nezavisno od primenjene terapije od termina prediktivni faktor, onaj koji predviđa verovatnoću odgovora na određenu sistemsku terapiju. Idealno bi bilo ispitivati prognostičke faktore u grupi pacijenata koja neće primati adjuvantu sistemsku terapiju kako bi se eliminisao efekat te terapije na rezultate i tumačenje rezultata. Većina studija u

današnje vreme koje analiziraju prognostičke faktore karcinoma dojke imaju ograničenu vrednost zbog činjenice da praktično svi pacijenti primaju neku vrstu adjuvantne terapije.

Prema najnovijim NCCN preporukama za lečenje karcinoma dojke iz 2016.godine praktično svi pacijenti nezavisno od veličine tumora i bez zahvaćenih limfnih nodusa su kandidati za adjuvantnu terapiju, sa izuzetkom trostruko negativnih pacijenata (triple negativne) koji imaju promer tumora ispod 5mm. Kod pacijenata koji imaju karcinom dojke 5mm ili manje u promeru, bez zahvaćenih limfnih nodusa i sa pozitivnim steroidnim receptorima (HER 2-) predlaže se razmatranje primene adjuvantne hormonske terapije a kod pacijenata sa prečnikom tumora većim od 5 mm predlaže se osim adjuvantne hormonske terapije i hemioterapija [363]. Kao pomoć pri odlučivanju o vrsti terapiji kod pacijenata sa karcinomima preko 5 mm može se koristiti 2-genski RT PCR esej. Cilj ove adjuvantne terapije je smanjivanje rizika od pojavu relapsa delovanjem na nedetektibilne mikrometastaze, koje mogu biti prisutne na udaljenim lokalizacijama.

Prema najnovijim ASCO preporukama iz marta 2016.godine kod ove grupe pacijenata se može koristiti evaluacija uPA/PAI-1 u odlučivanju o adjuvantnom lečenju [364]. Moguća korist od upotrebe ovih biomarkera sadržaja je i u preporukama EGTM (European Group on Tumor Markers) [365], NACB (National Academy of Clinical Biochemistry (US) [366], ESMO (European Society of Clinical Oncology) [367] i AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie) [368]. Prema ASCO preporukama iz 2007.godine navedeno je da nema dovoljno dokaza za rutinsku primenu katepsina D kao prognostičkog faktora karcinoma dojke [369].

Prognostički i prediktivni značaj biomarkera raka dojke se menja kroz vreme tokom procesa kancerogeneze, tumorske invazije i metastaziranja, a u zavisnosti od njihovih signalnih puteva.

Često se zanemaruje značaj vremenske zavisnosti značaja biomarkera i činjenica da jedan biomarker može biti dobar prognostički marker tokom ranog perioda praćenja a loš u kasnom praćenju, i obrnuto [370]. Pregledom literature može se primetiti značajna razlika u intervalima praćenja pacijenata usled različito definisanih kriterijuma za završetak studija. U ovoj doktorskoj disertaciji korišćen je interval bez bolesti (DFI) kao interval praćenja pacijenata obzirom na klinički značaj pojave metastaza.

Idealan biomarker bi morao da zadovolji sve ili barem većinu sledećih kriterijuma:

- a) Da se lako dokazuje i meri pomoću razvijenih analitičkih eseja.
- b) Da ima kliničku validaciju
- c) Da ima kliničku korist izraženu kroz predikciju preživljavanja, poboljšanja života pacijenata ili smanjivanja troškova lečenja.
- d) Da testiranje nije skupo
- e) Da može biti meta ciljane terapije.

Dva biomarkera karcinoma dojke koji najbolje zadovoljavaju navedene kriterijume su ER i HER 2. uPA i PAI-1 takodje zadovoljavaju većinu ovih kriterijuma što je prikazano kroz dve nezavisne prospektivne i multicentrične LOE-1 (level of evidence) studije. [371,372]

Razvijeno je nekoliko različitih metoda za određivanje nivoa uPA I PAI (ELISA, imunohistohemijska metoda, RT-PCR mRNA) od kojih je ELISA test IMUBIND® uPA-PAI-1 ELISA (American Diagnostica, USA) prošao kontrolu kvaliteta u Evropskoj multicentričnoj studiji [373].

Određivanje nivoa katepsina D je standardizovano IRMA metodom, tj. njenom modifikacijom - sendvič“ imunoradiometrijskim esejem na čvrstoj fazi pomoću komercijalnog kompleta za kvantitativno određivanje katepsina D (ELSA-CATH-D, CIS Biointernational, Gif-Sur-Yvet, France). Korišćenjem ovog kita moguća detekciju sve tri izoforme katepsina D (34 kDa, 48 kDa i 52 kDa).

Još 1988.godine su Daffy i saradnici pokazali svoje preliminarne rezultate da pacijenti sa većim vrednosti uPA imaju kraći DFI [374]. Nedugo zatim su rezultati ovih perliminarnih studija potvrđeni od strane Janicke-a i saradnika publikacijama 1989.godine u časopisu Lancet [375] a potom .i 1990.godine [376]. Nakon toga usledila je serija publikacija o značaju ovih novih molekularnih biomarkera karcinoma dojke, uključujući i katepsin D.

Ossowski je 1983.godine [377] pokazao da uPA ima ulogu u ranim procesima kancerogeneze i metastaziranja aktivirajući plazmim i dovodeći do razlaganja ekstraćelijskom matriksa. Utvrđeno je da su glavne uloge PAI-1 progresija kancera kroz stimulaciju angiogeneze [378] i inhibiciju apoptoze [379].

U prvoj od dve završene multicentrične prospektivne LOE 1 studije, Chemo N0 trial (n=556) pokazano je da nakon 32 meseca praćenja pacijenti (pN0) sa niskim vrednostima uPA i PAI imaju značajno nižu incidencu relapsa bolesti (6.7%) u odnosu na grupu pacijenata sa visokim vrednostima (14.7%) ovih biomarkera (p=0.006). Nakon desetogodišnjeg praćenja pokazano je pacijenti (pN0) sa niskim vrednostima uPA i PAI, koji nisu imali nikakvu adjuvantu terapiju, hormonski ni hemio, imaju procenat udaljenih metastaza od 12.9%, što je skoro duplo manje u odnosu na grupu pacijenata sa visokim vrednostima uPA i PAI od 23% (p=0.011). Ova studija je prva ukazala na činjenicu da u grupi pacijenata lečenih od raka dojke ali bez zahvaćenih metastaza postoji podgrupa pacijenata niskog rizika koja može biti identifikovana korišćenjem ovih novih molekularnih biomarkera [371].

Druga LOE 1 studija sprovedena je od strane EORTC-a (European Organization for Research and Treatment of Cancer) a na osnovu rezultata dobijenih iz 18 evropskih centara (n=8377) zaključeno je da su visoke vrednosti uPA i PAI udružene sa lošom prognozom [372].

Prvi zadatak u ovoj doktorskoj disertaciji bio je procena značaja klasičnih prognostičkih faktora u odnosu na DFI, tokom različitog perioda praćenja bolesnica.

Tokom prvih 5 godina nakon operacije rezultati ukazuju samo na značaj veličine primarnog tumora u prognozi pacijenata sa karcinomom dojke. Pacijenti koji su imali tumor veći od 20 mm imaju 3 puta veći rizik za pojavu relapsa od pacijentkinja sa pT1 (p=0,02.) Ovo je moguće objasniti na dva načina: (a) kod većih tumora su šanse za mutacije veće usled većeg broja ćelijskih deoba i (b) usled većeg kontakta tumora i strome dolazi do snažnije aktivacije angiogenih signalnih puteva.

Tokom drugih pet godina nakon operacije uočeno je da su mlađe pacijentkinje od 56 godina imale povoljniji tok bolesti (p=0,03) kao i da su se kod pacijentkinja sa pozitivnim ER statusom i do 4 puta češće javljale udaljene metastaze u odnosu na pacijentkinje sa ER negativnim statusom,(p=0,009). Treba imati na umu da ova grupa pacijentkinja nije primala adjuvantnu hormonsku terapiju koja je danas standard.

Tokom perioda praćenja od deset godina jedini klasični prognostički faktor koji je sadržao svoju vrednost je bio uzrast pacijenata i pokazano je da su mlađe pacijentkinje od 56 godina su imale povoljniji tok bolesti ($p=0,003$),

Drugi zadatak je procena značaja molekularnih biomarkera, posebno uPA i PAI-1 u odnosu na ranu pojavu metastaza. Interesantno je da je samo PAI-1 pokazao prognostički značaj tokom ranog perioda praćenja. Visoki nivoi PAI-1 su predviđali lošu prognozu pacijenta ali do danas nisu otkriveni biološki i molekularni mehanizmi koji su odgovorni za visoke vrednosti ovog molekularnog biomarkera. Bajou i saradnici su pokazali da PAI-1 podstiče tumorski rast i angiogenezu [380]. Isti istraživački tim je otkrio ulogu plazmina u neoangiogenezi koja potiče od endotelnih ćelija domaćina ali i ulogu PAI-1 u kontroli proteolize [381]. Rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji su u skladu sa već poznatom dvostrukom aktivnošću PAI-1, dakle sa sprečavanjem uPA/plazmin proteolize i stimulacijom signalnih puteva koji se odnose na tumorski rast i angiogenezu. Važno je naglasiti da ovakva uloga PAI-1 može objasniti ranu pojavu udaljenih metastaza.

Tokom drugih pet godina nakon hirurške intervencije PAI-1 je izgubio svoj značaj i na osnovu rezultata uPA se izdvojio kao odličan biomarker prognoze pacijenata. Nađena je statistički značajna razlika u verovatnoćama za DFI između grupe pacijentkinja koje su uPA pozitivne u odnosu na uPA negativne ($p=0.04$). Kod uPA- negativnih pacijentkinja uočena je 5.6 puta češća pojava udaljenih metastazi u odnosu na grupu uPA pozitivnih pacijentkinja. U većini studija uPA negativnost je bila povezana sa odličnom prognozom [382] ali treba naglasiti da ni u jednoj studiji nije posebno posmatran period tokom drugih pet godina nakon operativnog lečenja.

Treći zadatak ove disertacije bio je integrisanje predhodno opisanih fenotipova koji se tiču veličine tumora (pT1 i pT2,3) i vrednosti PAI-1 (niske i visoke vrednosti).

Tokom ranog perioda praćenja fenotipovi pT1 PAI-1-niske vrednosti, pT1 PAI-1-visoke vrednosti, i pT2 PAI-1-niske vrednosti su bili povezani sa dobrom prognozom dok je fenotip pT2 PAI-1-visoke vrednosti bio povezan sa nepovoljnom prognozom bolesti. Karakteristika nisko rizične podgrupe bila je prisustvo jednog ili oba povoljna prognostička faktora (pT1 i PAI-1-niske vrednosti). Visoko rizičnu podgrupu karakterisalo je prisustvo oba nepovoljna prognostička faktora (pT2,3 i PAI-1-visoke vrednosti). Klasični

prognostički faktor pT1 je snažniji i dominantniji u odnosu na niske ili visoke vrednosti PAI-1, ukazujući da nije potrebno određivati PAI-1 kod pT1 tumora.

Niske, odnosno visoke vrednosti PAI-1 pri veličinama tumora pT2,3 su određivale prognozu pacijenata, ukazujući na to da je PAI-1 snažniji prognostički faktor uz koga veličina tumora gubi svoj značaj.

U toku perioda praćenja od pete do desete godine nakon hirurškog lečenja treba napomenuti da su pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER i negativnim statusom uPA imale najnepovoljniji tok bolesti kada se posmatraju analizirani fenotipovi definisani starošću pacijentkinja i statusima ER i uPA ($p < 0.001$)

Na osnovu genske ekspresije [382] i svog molekularnog portreta [383] postalo je jasno da je histološki gradus II heterogena bolest dok su gradusi I i III dva posebna entiteta. Na osnovu rezultata vidimo da pacijenti histološkog gradusa I imaju povoljniju prognozu i njihov DFI je sličan sa nisko-rizičnom podgrupom (0.90, 0.88 i 0.88; grafikoni 4a, 4b i 5).

Imajući u vidu nove protokole za lečenje raka dojke postavlja se pitanje da li je adjuvantna hemioterapija nepotreba za ovu grupu pacijenata. U koliko pacijenti ne prime adjuvantnu hemioterapiju čak 12 % pacijenata će biti oštećeno.

Sa druge strane, podgrupe pacijenata koje smatramo u grupi visokog rizika imaju šanse za DFI kao i pacijenti histološkog gradusa III (0.67, 0.67, 0.43; grafikoni 6a, 6b i 7).

Utvrđeno je da će 57 % pacijenata imati korist od primene adjuvantne hemioterapije i to oni pacijenti koji su identifikovani kao visoko-rizični, sa lošom prognozom, sa pT2,3 PAI-1-visokim vrednostima (Grafikon 8).

Rezultati ukazuju na činjenicu da je PAI-1 koristan u identifikovanju visoko-rizične podgrupe, posebno u okviru grupe pacijenata svrstanih na osnovu pT u dobru prognostičku grupu.

Rezultati studije Chemo-N0 trial su publikovani 2013.godine a to je ujedno bila prva prospektivna multicentrična randomizovana studija koja je proučavala značaj molekularnih biomarkera uPA i PAI-1 kod pacijenata bez zahvaćenih limfnih čvorova sa periodom praćenja od 10 godina. (pN0) [371].

U podgrupi pacijenata koji nisu primali nikakvu sistemsku adjuvantnu terapiju a koji su imali visoke vrednosti uPA/PAI-1 (cut off: uPA, 3 ng/mg; PAI-1, 14 ng/mg) primećena je

veća stopa relapsa u odnosu na pacijente sa niskim vrednostima ovih biomarkera. Udruženi status uPA i PAI-1 kod pacijenata sa histološkim gradusom tumora II je takodje bio značajan pokazatelj rizika u smislu ukupnog preživljavanja.

Postoje ipak neke razlike između kohorte pacijenata kod kojih nije primenjena adjuvantna sistemska terapija u ovoj doktorskoj disertaciji i odnosu na Chemo-N0 studiju. Najpre, u trajal Chemo-N0 su bili uključeni pacijenti sa veličinom tumora između 1 i 5 cm bez obzira na status steroidnih receptora i menopauzni status. Period praćenja pacijenata se takodje razlikovao: u trajalu Chemo-N0 je iznosio od 5-167 meseci sa medijanom 113 meseci dok svi pacijenti uključeni u našu studiju, a koji nemaju relaps bolesti, imaju isti period praćenja. Rezultati trajala Chemo-N0 su pružili važne podatke i dokaze o značaju prognostičkih faktora uPA and PAI-1 kod pacijenata bez zahvaćenih limfnih čvorova (pN0) obzirom da je studija bila prospektivna, odlično dizajnirana i sa dugim periodom praćenja. Značaj molekularnih biomarkera u Chemo-N0 trajalu smatraćeno samo u grupi pacijenata koji imaju HER 2- negativni receptorski status imajući u vidu snažan uticaj anti-HER2 terapije kod HER2- pozitivnih pacijenata. Zbog toga u novije vreme studije standardno obuhvataju četiri molekularna tipa koji se razlikuju po svojoj biologiji tumora i prognozi: HER 2 pozitivne, basal like, luminal A i luminal B karcinome dojke.

Witzel i sar. su ispitivali značaj uPA/PAI-1 (protein i mRNA) ekspresije kod pacijenata sa karcinomom dojke. Uključeno je 200 pacijenata bez zahvaćenih limfnih čvorova koji nisu primili adjuvantnu sistemska terapiju ali je analiza obuhvatila i odnose uPA/PAI-1 sa molekularnim podtipovima karcinoma dojke [384]. Autori nisu pronašli značajnu korelaciju između uPA/PAI-1 mRNA ekspresije i DFI analizirajući celu grupu ali i uzimajući u obzir molekularne podtipove karcinoma dojke. Pretpostavlja se da je odsustvo te korelacije bilo usled malog broja HER-2-positivnih pacijenata. Analizom koncentracija proteina uPA/PAI-1 utvrđeno je da su visoke vrednosti PAI-1 bile udružene sa kraćim DFI u okviru cele grupe i u podgrupi HER2-positivnih pacijenata, pri medijalni praćenja od 92 meseca.

U našoj kohorti većina pacijenata je imalo HER-2-negativni receptorski status (~80 %) i nisu nađene značajne razlike između nivoa uPA/PAI-1 među grupama HER 2-positivnih i HER 2-negativnih pacijenata. S tim u vezi, analiza i upoređivanje uPA/PAI-1 i HER-2

nema statističku značajnost a odnos ovih biomarkera ne utiče na ishod pacijenata u našoj grupi.

U revijalnom radu Duffy i sar. iz 2014. godine se prvi put pominje značaj vremenske zavisnosti biomarkera i mogućnosti da su pojedini molekularni biomarkeri značajni u jednom periodu praćenja toka bolesti a da gube svoj značaj u drugom periodu [385].

Značaj ove doktorske disertacije je taj što su rezultati studije jedinstveni obzirom da istraživana populacija obuhvata, za današnje pojmove, retku grupu pacijenata sa karcinomima dojke koji nisu primali adjuvantu terapiju, kao i da takva kohorta praktično više ne postoji obzirom na moderne terapijske protokole.

6. ZAKLJUČCI

U ranom praćenju, tokom prvih 5 godina nakon operacije:

1. Udaljene metastaze karcinoma dojke su se javljale oko tri puta češće u grupi pacijentkinja sa pT2,3 u odnosu na grupu pacijenata pT1 (10% vs. 33%) a odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ($p=0,02$).
2. Udaljene metastaze lobularnog invazivnog karcinoma dojke su 2.82 puta bile češće u odnosu na lobularni (33.3% CLI vs 11.8% CDI, a odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ($p=0,04$)).
3. Udaljene metastaze karcinoma dojke su 3.1 puta bile češće kod tumora sa PAI-1 pozitivnim statusom u odnosu na PAI-1 negativan status (37.5% PAI-1 pozitivni vs 12.1% PAI-1 negativni). a odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ($p=0,04$).
4. Povoljniji tok bolesti primećen je kod pacijentkinje sa pT1 tumorima ($p=0,02$) , sa IDC tumorima ($p=0,04$) ili sa negativnim statusom PAI-1 ($p=0,02$).
5. Identifikovana je visoko rizična podgrupa pacijentkinja sa tumorima jednakim ili većim od 2 cm i pozitivnim statusom PAI-1 (pT2,3 PAI-1 pozitivne) u odnosu na grupu pacijentkinja sa tumorima manjim od 2 cm, nezavisno od statusa PAI-1, ili sa tumorima jednakim ili većim od 2 cm i negativnim statusom PAI-1 (pT1 PAI-1 negativne; pT1 PAI-1 pozitivne; pT2,3 PAI-1 negativne). Prva grupa navedenih pacijentkinja je imala nepovoljniji tok bolesti, sa obzirom na verovatnoću za DFI od $P=0,88$, u odnosu na prvoispomenute koje su imale verovatnoću za DFI od $P=0,43$. Ustanovljeno je da se verovatnoće za DFI statistički značajno razlikuju ($p<0.001$) između ove dve grupe.

Tokom drugih 5 godina nakon operacije:

1. Povoljniji tok bolesti primećen je kod mlađih pacijentkinje od 56 godine od kojih ni jedna pacijentkinja nije imala relaps bolesti u odnosu na pacijentkinje 56 ili više

godina od kojih su 33.3% imale relaps bolesti a odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ($p=0,03$).

2. Udaljene metastaze karcinoma dojke bile su 3.9 puta češće kod pacijentkinja sa pozitivnim statusom ER u odnosu na grupu pacijentkinja sa negativnim statusom ER, a verovatnoće za DFI između ove dve grupe pacijentkinja su se statistički značajno razlikovale ($p=0,009$).
3. Udaljene metastaze karcinoma dojke bile su čak 5.6 puta češće u grupi pacijentkinja sa negativnim statusom uPA, a verovatnoće za DFI između ove dve grupe pacijentkinja su se statistički značajno razlikovale ($p=0,003$).
4. Udaljene metastaze karcinoma dojke bile su češće u grupi pacijentkinja starijih od 56 godina i pozitivnim ER statusom u odnosu na mlađe od 56 godina, bez obzira na status ER, ili one stare 56 ili više godina, a sa negativnim statusom ER, sa obzirom na to da su odgovarajuće verovatnoće za DFI bile $P=0,55$ i $P=0,9$, respektivno, i da su se statistički značajno razlikovale $p=0,003$.
5. Povoljniji tok bolesti su imale pacijentkinje mlađe od 56 godina, bez obzira na status uPA, ili one stare 56 ili više godina, a sa pozitivnim statusom uPA u odnosu na pacijentkinje stare 56 ili više godina, a sa negativnim statusom uPA pri čemu su odgovarajuće verovatnoće za DFI bile $P=0,95$ i $P=0,59$, respektivno, i statistički su se značajno razlikovale ($p=0,008$).
6. Najnepovoljniji tok bolesti su imale pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER i negativnim statusom uPA imale kada se posmatraju analizirani fenotipovi definisani starošću pacijentkinja i statusima ER i uPA.

Tokom prvih 10 godina nakon operacije:

1. Udaljene metastaze karcinoma dojke bile su češće u grupi pacijentkinja starijih od 56 godina u odnosu na mlađe od 56 godina a odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ($p=0,003$).
2. Povoljnija prognoza pacijentkinja sa rakom dojke je primećena u grupi mlađih od 59 godina sa negativnim statusom ER u odnosu na za pacijentkinje stare 59 ili više

godina, nezavisno od statusa ER, ili mlađe od 59 godina sa pozitivnim statusom ER, a odgovarajuće verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale ($p < 0,001$).

Glavni doprinos ove doktorske disertacije u pogledu prognoze karcinoma dojke je taj da je pokazano da PAI-1 može da doprinese prognostičkoj vrednosti pT tokom ranog praćenja bolesti kod postmenopausalnih pacijentkinja sa karcinomom dojke koje imaju histološki gradus tumora II i pozitivnu ER/PR ekspresiju, tokom ranog praćenja bolesti. Na osnovu rezultata se može zaključiti da određivanje PAI-1 (uz pT) može biti korisno za identifikaciju visoko-rizične podgrupe pacijenata u okviru dobre prognostičke grupe pN0, koje će imati korist od primene agresivnijeg lečenja i identifikaciju nisko-rizične podgrupe kod koje ovakva terapija možda neće biti neophodna.

7. LITERATURA

1. Dong G, Wang D, Liang X, Gao H, Wang L, Yu X, Liu J. Factors related to survival rates for breast cancer patients. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Oct 15;7(10):3719-3724.
2. Registar za rak centralne Srbije. Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 1999-2009. Institut za zaštitu zdravlja Srbije, Beograd, 1999-2009.
3. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJL, Naghavi M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2011;378:1461–1484.
4. Demicheli R, Abbattista A, Miceli R, Valagussa P, Bonadonna G. Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: further support about the concept of tumor dormancy. *Breast Cancer Res Treat* 1996;41(2):177-85.
5. Hess KR, Pusztai L, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse. *Breast Cancer Res Treat* 2003;78(1):105-18.
6. Gao F, Tan SB, Machin D, Wong NS. Confirmation of double-peaked time distribution of mortality among Asian breast cancer patients in a population-based study. *Breast Cancer Res* 2007;9(2):R21.
7. Demicheli R, Retsky MW, Swartzendruber DE, Bonadonna G. Proposal for a new model of breast cancer metastatic development. *Ann Oncol* 1997;8(11):1075-80.
8. Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer. Report of a workshop on September 29, 1972, at the Antoni van Leeuwenhoek-Huis, Amsterdam. *Eur J Cancer* 1973;9(5):379-81.
9. Retsky MW, Demicheli R, Swartzendruber DE, Bame PD, Wardwell RH, Bonadonna G, Speer JF, Valagussa P. Computer simulation of a breast cancer metastasis model. *Breast Cancer Res Treat* 1997;45(2):193-202.
10. Schmidt M, Victor A, Bratzel D et al. Long-term outcome prediction by clinicopathological risk classification algorithms in node-negative breast cancer--comparison between Adjuvant!, St Gallen, and a novel risk algorithm used in the prospective randomized Node-Negative-Breast Cancer-3 (NNBC-3) trial. *Ann Oncol* 2009;20(2):258-264.
11. Fisher B. Laboratory and clinical research in breast cancer--a personal adventure: the David A. Karnofsky memorial lecture. *Cancer Res* 1980;40(11):3863-3874.
12. McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992;326(26):1756-1761.
13. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (Breast Cancer Version 1.2012) Goldrith A i sar. 2007.
14. Janicke F, Schmitt M, Hafter A. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis* 1990;4:6978.
15. Reilly D, Christensen L, Duch M, et al. Type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 1992;50:208–214.
16. Duggan C, Maguire T, McDermott E, et al. Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer. *Int J Cancer* 1995;61: 597–600.
17. Ohri SS, Vashishta A, Proctor M, Fusek M, Vetvicka V. The propeptide of cathepsin D increases proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells. *Int J Oncol* 2008;32(2):491-8.
18. De Vita, Hellman, Rosenber. *Cancer principles and practice of oncology*, 9th ed 2011 Lipincott Williams and Wilkins.
19. Bruce Wr, Van Der Gaag H A Quantitative Assay For The Number Of Murine Lymphoma Cells Capable Of Proliferation In Vivo. *Nature*. 1963 Jul 6;199:79-80.

20. A.F. Chambers, A.C. Groom and I.C. MacDonald, Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites, *Nat Rev Cancer* 2 (2002), 563–572., K.J.
21. Luzzi, I.C. MacDonald, E.E. Schmidt, N. Kerkvliet, V.L. Morris, A.F. Chambers and A.C. Groom, Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases, *Am J Pathol* 153 (1998), 865–873.
22. D.R. Welch, Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo, *Clin Exp Metastasis* 15 (1997), 272–306.
23. T. Reya, S.J. Morrison, M.F. Clarke and I.L. Weissman, Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature* 414 (2001), 105–111/
24. M. Al-Hajj, M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison and M.F. Clarke, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003), 3983–3988.
25. J.E. Dick, Breast cancer stem cells revealed, *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003), 3547–3549.
26. J. Marx, Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer, *Science* 301 (2003), 1308–1310.
27. R. Pardal, M.F. Clarke and S.J. Morrison, Applying the principles of stem-cell biology to cancer, *Nat Rev Cancer* 3 (2003), 895–902.
28. S.K. Singh, C. Hawkins, I.D. Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano and P.B. Dirks, Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature* 432 (2004), 396–401.
29. Wicha MS, Liu S, Dontu G. *Cancer Res.* Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):1883-90; discussion 1895-6.
30. M. Al-Hajj and M.F. Clarke, Self-renewal and solid tumor stem cells, *Oncogene* 23 (2004), 7274–7282.
31. R. Bjerkvig, B.B. Tysnes, K.S. Aboody, J. Najbauer and A.J. Terzis, Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights, *Nat Rev Cancer* 5 (2005), 899–904.
32. Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature.* 2006 Jan 5;439(7072):84-8.
33. M. Dean, CANCER STEM CELLS: Redefining the Paradigm of Cancer Treatment Strategies, *Mol Interv* 6 (2006), 140–148.
34. M. Dean, T. Fojo and S. Bates, Tumour stem cells and drug resistance, *Nat Rev Cancer* 5 (2005), 275–284.
35. L. Li and T. Xie, Stem cell niche: structure and function, *Annu Rev Cell Dev Biol* 21 (2005), 605–631.
36. H. Lin, The stem-cell niche theory: lessons from flies, *Nat Rev Genet* 3 (2002), 931–940
37. A. Spradling, D. Drummond-Barbosa and T. Kai, Stem cells find their niche, *Nature* 414 (2001), 98–104.
38. T. Yin and L. Li, The stem cell niches in bone, *J Clin Invest* 116 (2006), 1195–1201.
39. F. Arai, A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G.Y. Koh and T. Suda, Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche, *Cell* 118 (2004), 149–161.
40. G. Cotsarelis, T.T. Sun and R.M. Lavker, Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis, *Cell* 61 (1990), 1329–1337.

41. T. Tumber, G. Guasch, V. Greco, C. Blanpain, W.E. Lowry, M. Rendl and E. Fuchs, Defining the epithelial stem cell niche in skin, *Science* 303 (2004), 359–363.
42. J. Zhang, C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J.Q. Feng, S. Harris, L.M. Wiedemann, Y. Mishina and L. Li, Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size, *Nature* 425 (2003), 836–841.
43. Thiery, J.P.; Lim, C.T. Tumor dissemination: An EMT affair. *Cancer Cell* 2013, 23.
44. Christofori, G.; Bill, R. The relevance of EMT in breast cancer metastasis. Correlation or causality. *FEBS* 2015, 589, 1577–1587.
45. Fidler, I.J.; Kripke, M.L. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977, 197, 893–895.
46. Daleba, P.; Cho, R.W.; Clarke, M.F. Cancer stem cells: Models and concepts. *Annu. Rev. Med.* 2007, 58, 267–284.
47. Mani, S.A.; Guo, W.; Liao, M.J.; Eaton, E.N.; Ayyanan, A.; Zhou, A.Y.; Brooks, M.; Reinhard, F.; Zhang, C.C.; Shipitsin, M.; et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008, 133, 704–715.
48. Blick, T.; Hugo, H.; Widodo, E.; Waltham, M.; Pinto, C.; Mani, S.A.; Weinberg, R.A.; Neve, R.M.; Lenburg, M.E.; Thompson, E.W. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines parallel the CD44^{hi}/CD24^{lo} stem cell phenotype in human breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2010, 15, 235–252.
49. Hazan, R.B.; Qiao, R.; Keren, R.; Badano, I.; Suyama, K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004, 1014, 155–163.
50. Maeda, M.; Johnson, K.R.; Wheelock, M.J. Cadherin switching: Essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J. Cell Sci.* 2005, 118, 873–887.
51. Sarrió, D.; Rodriguez-Pinilla, S.M.; Hardisson, D.; Cano, A.; Moreno-Bueno, G.; Palacios, J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 2008, 68, 989–997.
52. Liu, T.; Zhang, X.; Shang, M.; Zhang, Y.; Xia, B.; Niu, M.; Liu, Y.; Pang, D. Dysregulated expression of Slug, Vimentin, and E-cadherin correlates with poor clinical outcome in patients with basal-like breast cancer. *J. Surg. Oncol.* 2013, 107, 188–194.
53. Aleskandarany, M.A.; Negm, O.H.; Green, A.R.; Ahmed, M.A.H.; Nolan, C.C.; Tighe, P.J.; Ellis, I.; Rakha, E.A. Epithelial mesenchymal transition in early invasive breast cancer: An immunohistochemical and reverse phase protein array study. *Breast Cancer Res. Treat.* 2014, 145, 339–348.
54. Choi, Y.; Lee, H.J.; Jang, M.H.; Gwak, J.M.; Lee, K.S.; Kim, E.J.; Kim, H.J.; Lee, H.E.; Park, S.Y. Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. *Hum. Pathol.* 2013, 44, 2581–2589.
55. Foroni, C.; Broggin, M.; Generali, D.; Damia, G. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat. Rev.* 2012, 38, 689–697.
56. Radisky, D.C.; LaBarge, M.A. Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype. *Cell Stem Cell* 2008, 2, 511–512.
57. AL-Hajj, M.; Wicha, M.S.; Benito-Hernandez, A.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS* 2003, 100, 3983–3988.
58. Liu, S.; Cong, Y.; Wang, D.; Sun, Y.; Deng, L.; Liu, Y.; Martin-Trevino, R.; Shang, L.; McDermott, S.P.; Landis, M.D.; et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Rep.* 2013, 2, 78–91.

59. A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, C. Smigal and M.J. Thun, Cancer statistics, *CA Cancer J Clin* 56 (2006), 106–130.
60. A.F. Chambers, A.C. Groom and I.C. MacDonald, Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites, *Nat Rev Cancer* 2 (2002), 563–572.
61. K. Pantel and R.H. Brakenhoff, Dissecting the metastatic cascade, *Nat Rev Cancer* 4 (2004), 448–456.
62. Meltzer, Dormancy and breast cancer, *J Surg Oncol* 43 (1990), 181–188.
63. J.W. Uhr, R.H. Scheuermann, N.E. Street and E.S. Vitetta, Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches, *Nat Med* 3 (1997), 505–509.
64. W.C. Black and H.G. Welch, Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy, *N Engl J Med* 328 (1993), 1237–1243.
65. J. Folkman and R. Kalluri, Cancer without disease, *Nature* 427 (2004), 787.
66. I.J. Fidler, 7th Jan Waldenstrom Lecture. The biology of human cancer metastasis, *Acta Oncol* 30 (1991), 668–675.
67. I.C. MacDonald, A.C. Groom and A.F. Chambers, Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models, *Bioessays* 24 (2002), 885–893.
68. M.A. Swartz and M. Skobe, Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis, *Microsc Res Tech* 55 (2001), 92–99.
69. E.C. Woodhouse, R.F. Chuaqui and L.A. Liotta, General mechanisms of metastasis, *Cancer* 80 (1997), 1529–1537.
70. M.D. Cameron, E.E. Schmidt, N. Kerkvliet, K.V. Nadkarni, V.L. Morris, A.C. Groom, A.F. Chambers and I.C. MacDonald, Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency, *Cancer Res* 60 (2000), 2541–2546.
71. A.F. Chambers, I.C. MacDonald, E.E. Schmidt, V.L. Morris and A.C. Groom, Clinical targets for anti-metastasis therapy, *Adv Cancer Res* 79 (2000), 91–121.
72. A.F. Chambers, G.N. Naumov, H.J. Varghese, K.V. Nadkarni, I.C. MacDonald and A.C. Groom, Critical steps in hematogenous metastasis: an overview, *Surg Oncol Clin N Am* 10 (2001), 243–255, vii.
73. K.J. Luzzi, I.C. MacDonald, E.E. Schmidt, N. Kerkvliet, V.L. Morris, A.F. Chambers and A.C. Groom, Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases, *Am J Pathol* 153 (1998), 865–873.
74. L. Weiss, Metastatic inefficiency, *Adv Cancer Res* 54 (1990), 159–211.
75. M. Guba, G. Cernaianu, G. Koehl, E.K. Geissler, K.W. Jauch, M. Anthuber, W. Falk and M. Steinbauer, A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis, *Cancer Res* 61 (2001), 5575–5579.
76. L. Holmgren, M.S. O'Reilly and J. Folkman, Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression, *Nat Med* 1 (1995), 149–153.
77. C. Murray, Tumour dormancy: not so sleepy after all, *Nat Med* 1 (1995), 117–118.
78. G.N. Naumov, I.C. MacDonald, A.F. Chambers and A.C. Groom, Solitary cancer cells as a possible source of tumour dormancy? *Semin Cancer Biol* 11 (2001), 271–276.
79. G.N. Naumov, I.C. MacDonald, P.M. Weinmeister, N. Kerkvliet, K.V. Nadkarni, S.M. Wilson, V.L. Morris, A.C. Groom and A.F. Chambers, Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy, *Cancer Res* 62 (2002), 2162–2168.

80. D. Tarin, J.E. Price, M.G. Kettlewell, R.G. Souter, A.C. Vass and B. Crossley, Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts, *Cancer Res* 44 (1984), 3584–3592.
81. L. Weiss, Metastatic inefficiency, *Adv Cancer Res* 54 (1990), 159–211.
82. L. Weiss, Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy, *Clin Exp Metastasis* 10 (1992), 191–199.
83. J. Ewing, *Neoplastic Diseases, A Treatise on Tumors*, London: W.B. Saunders Co. 1928, 77–89.
84. S. Paget, The distribution of secondary growths in cancer of the breast, *The Lancet* 1 (1889), 99–101.
85. S. Paget, The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889, *Cancer Metastasis Rev* 8 (1989), 98–101.
86. P. Bugalho, M. Choro and P. Fontoura, Miliary brain metastases from primary gastric small cell carcinoma: illustrating the seed and soil hypothesis, *J Neurooncol* 73 (2005), 53–56.
87. I.J. Fidler, Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis, *Surg Oncol Clin N Am* 10 (2001), 257–69, vii–viii.
88. I.J. Fidler, S. Yano, R.D. Zhang, T. Fujimaki and C.D. Bucana, The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases, *Lancet Oncol* 3 (2002), 53–57.
89. I.R. Hart, ‘Seed and soil’ revisited: mechanisms of sitespecific metastasis, *Cancer Metastasis Rev* 1 (1982), 5–16.
90. P.A. Phadke, R.R. Mercer, J.F. Harms, Y. Jia, A.R. Frost, J.L. Jewell, K.M. Bussard, S. Nelson, C. Moore, J.C. Kappes, C.V. Gay, A.M. Mastro and D.R. Welch, Kinetics of metastatic breast cancer cell trafficking in bone, *Clin Cancer Res* 12 (2006), 1431–1440.
91. L. Weiss, Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy, *Clin Exp Metastasis* 10 (1992), 191–199.
92. J.A. Aguirre Ghiso, Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo, *Oncogene* 21 (2002), 2513–2524.
93. J.A. Aguirre-Ghiso, Y. Estrada, D. Liu and L. Ossowski, ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK), *Cancer Res* 63 (2003), 1684–1695.
94. J.A. Aguirre-Ghiso, D. Liu, A. Mignatti, K. Kovalski and L. Ossowski, Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo, *Mol Biol Cell* 12 (2001), 863–879.
95. J.A. Aguirre-Ghiso, L. Ossowski and S.K. Rosenbaum, Green fluorescent protein tagging of extracellular signalregulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth, *Cancer Res* 64 (2004), 7336–7345.
96. S.A. Eccles and P. Alexander, Immunologically-mediated restraint of latent tumour metastases, *Nature* 257 (1975), 52–53.
97. N.S. El Saghier, Elhajj, II, F.B. Geara and M.H. Hourani, Trauma-associated growth of suspected dormant micrometastasis, *BMC Cancer* 5 (2005), 94.
98. J. Folkman, Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis, *Semin Oncol* 29 (2002), 15–18.
99. L. Holmgren, M.S. O’Reilly and J. Folkman, Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression, *Nat Med* 1 (1995), 149–153.
100. R. Korah, M. Boots and R. Wieder, Integrin alpha5beta1 promotes survival of growth-arrested breast cancer cells: an in vitro paradigm for breast cancer dormancy in bone marrow, *Cancer Res* 64 (2004), 4514–4522.

101. L. Ossowski, J. Aguirre Ghiso, D. Liu, W. Yu and K. Kovalski, The role of plasminogen activator receptor in cancer invasion and dormancy, *Medicina (B Aires)* 59 (1999), 547–552.
102. V. Schirmacher, T-cell immunity in the induction and maintenance of a tumour dormant state, *Semin Cancer Biol* 11 (2001), 285–295.
103. J.W. Uhr, R.H. Scheuermann, N.E. Street and E.S. Vitetta, Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches, *Nat Med* 3 (1997), 505–509.
104. E.F. Wheelock, K.J. Weinhold and J. Levich, The tumor dormant state, *Adv Cancer Res* 34 (1981), 107–140.
105. W. Yu, J. Kim and L. Ossowski, Reduction in surface urokinase receptor forces malignant cells into a protracted state of dormancy, *J Cell Biol* 137 (1997), 767–777.
106. G.N. Naumov, J.L. Townson, I.C. MacDonald, S.M. Wilson, V.H. Bramwell, A.C. Groom and A.F. Chambers, Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases, *Breast Cancer Res Treat* 82 (2003), 199–206.
107. Y. Cao, M.S. O'Reilly, B. Marshall, E. Flynn, R.W. Ji and J. Folkman, Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases, *J Clin Invest* 101 (1998), 1055–1063.
108. D. Hanahan and J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell* 86 (1996), 353–364.
109. C. Heyn, J.A. Ronald, S.S. Ramadan, J.A. Snir, A.M. Barry, L.T. MacKenzie, D.J. Mikulis, D. Palmieri, J.L. Bronder, P.S. Steeg, T. Yoneda, I.C. MacDonald, A.F. Chambers, B.K. Rutt and P.J. Foster, In vivo tracking of growth and dormancy of solitary cells in a mouse model of breast cancer metastasis to brain using MRI, *Magn Reson Med* 56 (2006), 1001–1010.
110. E.G. Achilles, A. Fernandez, E.N. Allred, O. Kisker, T. Udagawa, W.D. Beecken, E. Flynn and J. Folkman, Heterogeneity of angiogenic activity in a human liposarcoma: a proposed mechanism for “no take” of human tumors in mice, *J Natl Cancer Inst* 93 (2001), 1075–1081.
111. G.N. Naumov, E. Bender, D. Zurakowski, S.Y. Kang, D. Sampson, E. Flynn, R.S. Watnick, O. Straume, L.A. Akslen, J. Folkman and N. Almog, A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype, *J Natl Cancer Inst* 98 (2006), 316–325.
112. J.A. Aguirre-Ghiso, L. Ossowski and S.K. Rosenbaum, Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth, *Cancer Res* 64 (2004), 7336–7345.
113. S. Goodison, K. Kawai, J. Hihara, P. Jiang, M. Yang, V. Urquidi, R.M. Hoffman and D. Tarin, Prolonged dormancy and site-specific growth potential of cancer cells spontaneously disseminated from nonmetastatic breast tumors as revealed by labeling with green fluorescent protein, *Clin Cancer Res* 9 (2003), 3808–3814.
114. M. Suzuki, E.S. Mose, V. Montel and D. Tarin, Dormant cancer cells retrieved from metastasis-free organs regain tumorigenic and metastatic potency, *Am J Pathol* 169 (2006), 673–681.
115. N. Almog, V. Henke, L. Flores, L. Hlatky, A.L. Kung, R.D. Wright, R. Berger, L. Hutchinson, G.N. Naumov, E. Bender, L.A. Akslen, E.G. Achilles and J. Folkman, Prolonged dormancy of human liposarcoma is associated with impaired tumor angiogenesis, *Faseb J* 20 (2006), 947–949.
116. C. Heyn, J.A. Ronald, L.T. Mackenzie, I.C. MacDonald, A.F. Chambers, B.K. Rutt and P.J. Foster, In vivo magnetic resonance imaging of single cells in mouse brain with optical validation, *Magn Reson Med* 55 (2006), 23–29.
117. K.C. Graham, L.A. Wirtzfeld, L.T. MacKenzie, C.O. Postenka, A.C. Groom, I.C. MacDonald, A. Fenster, J.C. Lacefield and A.F. Chambers, Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of liver metastases in preclinical models, *Cancer Res* 65 (2005), 5231–5237.

118. T.A. Davis, D.G. Maloney, D.K. Czerwinski, T.M. Liles and R. Levy, Anti-idiotypic antibodies can induce long-term complete remissions in non-Hodgkin's lymphoma without eradicating the malignant clone, *Blood* 92 (1998), 1184–1190.
119. O.W. Press, J.P. Leonard, B. Coiffier, R. Levy and J. Timmerman, Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (2001), 221–240.
120. A.I. Sagalowsky and K. Molberg, Solitary metastasis of renal cell carcinoma to the contralateral adrenal gland 22 years after nephrectomy, *Urology* 54 (1999), 162.
121. M.P. Callaway and J.C. Briggs, The incidence of late recurrence (greater than 10 years); an analysis of 536 consecutive cases of cutaneous melanoma, *Br J Plast Surg* 42 (1989), 46–49.
122. A. Meltzer, Dormancy and breast cancer, *J Surg Oncol* 43 (1990), 181–188.
123. J.W. Uhr, R.H. Scheuermann, N.E. Street and E.S. Vitetta, Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches, *Nat Med* 3 (1997), 505–509.
124. M. Cristofanilli, The “microscopic” revolution in breast carcinoma, *Cancer* 103 (2005), 877–880.
125. T.G. Lugo, S. Braun, R.J. Cote, K. Pantel and V. Rusch, Detection and measurement of occult disease for the prognosis of solid tumors, *J Clin Oncol* 21 (2003), 2609–2615.
126. S. Meng, D. Tripathy, E.P. Frenkel, S. Shete, E.Z. Naftalis, J.F. Huth, P.D. Beitsch, M. Leitch, S. Hoover, D. Euhus, B. Haley, L. Morrison, T.P. Fleming, D. Herlyn, L.W. Terstappen, T. Fehm, T.F. Tucker, N. Lane, J. Wang and J.W. Uhr, Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy, *Clin Cancer Res* 10 (2004), 8152–8162.
127. K. Pantel, R.J. Cote and O. Fodstad, Detection and clinical importance of micrometastatic disease, *J Natl Cancer Inst* 91 (1999), 1113–1124.
128. E. Racila, D. Euhus, A.J. Weiss, C. Rao, J. McConnell, L.W. Terstappen and J.W. Uhr, Detection and characterization of carcinoma cells in the blood, *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998), 4589–4594.
129. G. Riethmuller and J.P. Johnson, Monoclonal antibodies in the detection and therapy of micrometastatic epithelial cancers, *Curr Opin Immunol* 4 (1992), 647–655.
130. A. Ring, I.E. Smith and M. Dowsett, Circulating tumour cells in breast cancer, *Lancet Oncol* 5 (2004), 79–88.
131. S. Braun, F.D. Vogl, B. Naume, W. Janni, M.P. Osborne, R.C. Coombes, G. Schlimok, I.J. Diel, B. Gerber, G. Gebauer, J.Y. Pierga, C. Marth, D. Oruzio, G. Wiedswang, E.F. Solomayer, G. Kundt, B. Strobl, T. Fehm, G.Y. Wong, J. Bliss, A. Vincent-Salomon and K. Pantel, A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer, *N Engl J Med* 353 (2005), 793–802.
132. I.J. Diel, M. Kaufmann, S.D. Costa, R. Holle, G. von Minckwitz, E.F. Solomayer, S. Kaul and G. Bastert, Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status, *J Natl Cancer Inst* 88 (1996), 1652–1658.
133. G. Gebauer, T. Fehm, E. Merkle, E.P. Beck, N. Lang and W. Jager, Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up, *J Clin Oncol* 19 (2001), 3669–3674.
134. B. Gerber, A. Krause, H. Muller, D. Richter, T. Reimer, J. Makovitzky, C. Herrnring, U. Jeschke, G. Kundt and K. Friese, Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors, *J Clin Oncol* 19 (2001), 960–971.
135. J.L. Mansi, U. Berger, D. Easton, T. McDonnell, W.H. Redding, J.C. Gazet, A. McKinna, T.J. Powles and R.C. Coombes, Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases, *Br Med J (Clin Res Ed)* 295 (1987), 1093–1096.

136. J.Y. Pierga, C. Bonneton, A. Vincent-Salomon, P. de Cremoux, C. Nos, N. Blin, P. Pouillart, J.P. Thiery and H. Magdelenat, Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients, *Clin Cancer Res* 10 (2004), 1392–140.
137. G. Wiedswang, E. Borgen, R. Karesen, G. Kvalheim, J.M. Nesland, H. Qvist, E. Schlichting, T. Sauer, J. Janbu, T. Harbitz and B. Naume, Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer, *J Clin Oncol* 21 (2003), 3469–3478.
138. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606–16.
139. Role of Patient and Disease Factors in Adjuvant Systemic Therapy Decision Making for Early-Stage, Operable Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Endorsement of Cancer Care Ontario Guideline Recommendations *JCO* Mar 21, 2016;JCO.2015.65.8609v1-JCO658609
140. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:2784-2795.
141. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American society of clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-145.
142. Look M, van Putten W, Duffy M, et al. Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in breast cancer patients. *Thromb Haemost*. 2003;90(3):538–48.
143. Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(8):793–802.
144. Masood S. Prognostic/predictive factors in breast cancer. *Clin Lab Med*.2005;25(4):809–25, VIII.
145. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989;63(1):181–7.
146. Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin* 1997;47(1):28-51.
147. Fisher ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the NationalSurgical Adjuvant Project for Breast Cancers: protocol no.4. *Cancer* 1984; 53:712-23.
148. Ries LAG and Eisner MP. Cancer of the female breast. In: Ries LAG, Young JL, Keel GE, Eisner MP, Lin YD, Horner M-J (editors). *SEER Survival Monograph: Cancer survival among adults: U.S. SEER Program, 1988-2001, patient and tumor characteristics*. National Cancer Institute, SEER Program, NIH Pub. No. 07-6215, Bethesda, MD, 2007.
149. Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer* 1993;71(8):2507-14.
150. Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. Pathological prognostic factors in stage I(T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 1989;7(9):1239-51.
151. Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, Baker HW, McGregor FH, Murphy GP. Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons. *Cancer* 1980; 45:2917-24.
152. McCreedy DR, Hortobagyi GN, Kau SW, Smith TL, Buzdar AU, Balch CM. The prognostic significance of lymph node metastases after preoperative chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Arch Surg* 1989; 124:21-5.

153. Fisher ER, Palekar A, Rockette H, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4): significance of axillary nodal micro- and macrometastases. *Cancer* 1978; 42:2032-8.
154. Rosen PP, Saigo PE, Braun DW. Prognosis in stage II (T1N1M0) breast cancer. *Ann Surg* 1981; 194:576-84.
155. Hayes DF, Isaacs C, Stearns V. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6(4):375-92.
156. Elledge RM, McGuire WL. Prognostic factors and therapeutic decisions in axillary node-negative breast cancer. *Annu Rev Med* 1993; 44:201-220.
157. Yang JH, Slack NH, Nemoto T. Effect of axillary nodal status on the long-term survival following mastectomy for breast carcinoma: nodal metastases may not always suggest systemic disease. *J Surg Oncol* 1987;36(4):243-8.
158. Gardner B, Feldman J. Are positive axillary nodes in breast cancer markers for incurable disease? *Ann Surg* 1993;218(3):270-5.
159. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg.* 2002;235(1):10-26.
160. Abner AL, Collins L, Peiro G, Recht A, Come S, Shulman LN, Silver B, Nixon A, Harris JR, Schnitt SJ, Connolly JL. Correlation of tumor size and axillary lymph node involvement with prognosis in patients with T1 breast carcinoma. *Cancer.* 1998;83(12):2502-8.
161. Donegan WL. Prognostic factors. Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer.* 1992;70(6 Suppl):1755-64.
162. Ferno M. Prognostic factors in breast cancer: a brief review. *Anticancer Res* 1998;18(3C):2167-71.
163. Stoll BA. Pointers in prognosis. In: Stoll BA, editor. *Breast cancer treatment and prognosis.* London: Blackwell Scientific Publications; 1986. p. 115-37.
164. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993;11:2090-2100.
165. Koscielny S, Tubiana M, Le MG et al. Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 1984;49:709-715.
166. Treatment of Early-Stage Breast Cancer. NIH Consensus Statement Online. 1990;8(6):1-19.
167. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004;9(6):606-16.
168. Histological typing of breast tumors. Second edition. World Health Organization. Geneva, 1981. *Ann Pathol* 1982;2(2):91-105.
169. Sainsbury JR, Anderson TJ, Morgan DA, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer. *BMJ* 1994;309(6962):1150-3.
170. Rosen PP. *Rosen's Breast Pathology (3rd Edition).* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins (Wolters Kluwer); 2009.
171. Tavassoli FA, Eusebi V. Tumors of the mammary gland. In: Silverber SG (editor). *AFIP Atlas of tumor pathology (4th Series).* Washington, D.C.: American Registry of Pathology in collaboration with the Armed Forces Institute of Pathology; 2009.
172. Pathology reporting of breast disease NHSBSP Publication No 58, 2005.
173. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis, 4th Edition, European Communities, 2006.
174. Rosen PP. Pathology of breast carcinoma. In: Harris JR, Hellman S, Henderson IC, Kinne DW (editors). *Breast Diseases.* Philadelphia: JB Lippincott; 1987. p. 147-209.

175. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):966-78.
176. Carter D, Orr SL, Merino MJ. Intracystic papillary carcinoma of the breast. After mastectomy, radiotherapy or excisional biopsy alone. *Cancer* 1983;52(1):14-9.
177. Carstens PH, Greenberg RA, Francis D, Lyon H. Tubular carcinoma of the breast. A long term followup. *Histopathology* 1985;9(3):271-80.
178. Komaki K, Sakamoto G, Sugano H, Morimoto T, Monden Y. Mucinous carcinoma of the breast in Japan. A prognostic analysis based on morphologic features. *Cancer* 1988;61(5):989-96.
179. Fisher ER, Kenny JP, Sass R, Dimitrov NV, Siderits RH, Fisher B. Medullary cancer of the breast revisited. *Breast Cancer Res Treat* 1990;16(3):215-29.
180. Berg JW, Hutter RV. Breast cancer. *Cancer* 1995;75(1 Suppl):257-69.
181. International Union Against Cancer. TNM supplement 1993. A commentary on uniform use. Berlin: Springer; 1993.
182. Stenkvist B, Bengtsson E, Eriksson O, Jarkrans T, Nordin B, Westman-Naeser S. Histopathological systems of breast cancer classification: reproducibility and clinical significance. *J Clin Pathol* 1983;36(4):392-8.
183. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* 1975;55(2):231-73.
184. Elston CW, Ellis IO. Pathologic prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grades in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19:403-410.
185. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957;11(3):359-77.
186. Contesso G, Mouriesse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol* 1987;5(9):1378-86.
187. Davis BW, Gelber RD, Goldhirsch A, Hartmann WH, Locher GW, Reed R, Golouh R, Save-Soderbergh J, Holloway L, Russell I, et al. Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1986;58(12):2662-70.
188. Shek LL, Godolphin W. Model for breast cancer survival: relative prognostic roles of axillary nodal status, TNM stage, estrogen receptor concentration, and tumor necrosis. *Cancer Res* 1988; 48(19):5565-9.
189. Elledge RM, McGuire WL, Osborne CK. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Oncol* 1992; 19(3):244-53.
190. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31(1):13-20.
191. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133(4):1710-1715.
192. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-322.

193. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:7212–7220.
194. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St. Gallen Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel)* 2011;6(2):136–141.
195. Untch M, Gerber B, Möbus V, Schneeweiss A, Thomssen C, von Minckwitz G, Beckmann MW, Blohmer JU, Costa SD, Diedrich K, et al. Zurich Consensus: Statement of German Experts on St. Gallen Conference 2011 on Primary Breast Cancer (Zurich 2011) *Breast Care*. 2011;6:144–152.
196. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, von Minckwitz G, Loibl S (2013) 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2013: Primary Therapy of Early Breast Cancer Evidence, Controversies, Consensus. *Breast Care* 03/2013: in press.
197. Wallgren A, Silfversward C, Hultborn A. Carcinoma of the breast in women under 30 years of age: a clinical and histopathological study of all cases reported as carcinoma to the Swedish Cancer Registry 1958-1968. *Cancer* 1977;40:916-923.
198. Mueller CB, Ames F, Anderson GD. Breast cancer in 3,558 women: age as a significant determinant in the rate of dying and causes of death. *Surgery* 1978;83:123-132.
199. Fowble BL, Schultz DJ, Overmoyer B et al. The influence of young age on outcome in early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;30:23-33.
200. Stoll BA. Age group and cancer prognosis. In: Stoll B A, editor. *Breast Cancer Treatment and Prognosis*. London: Blackwell Scientific Publications; 1986. p. 173-87.
201. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994(16):35-42.
202. Nixon AJ, Neuberger D, Hayes DF et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:888-894.
203. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994;16:35-42.
204. Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *Br J Cancer* 1996;74(11):1796-800.
205. Stewart JF, Rubens RD, Millis RR, King RJ, Hayward JL. Steroid receptors and prognosis in operable (stage I and II) breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983;19(10):1381-7.
206. Saez S, Cheix F, Asselain B. Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1983;3(4):345-53.
207. Pichon MF, Pallud C, Brunet M, Milgrom E. Relationship of presence of progesterone receptors to prognosis in early breast cancer. *Cancer Res* 1980;40(9):3357-60.
208. Jensen EV. Hormone dependency of breast cancer. *Cancer* 1981;47(10):2319-26.
209. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988;6(7):1076-87.
210. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):227-37.
211. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998;351(9114):1451-67.
212. McGuire WL, Horwitz KB, Pearson OH, Segaloff A. Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 1977;39(6 Suppl):2934-47.

213. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG, Somerfield MR. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1865-78.
214. American Cancer Society. Targeted therapy for breast cancer. <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-targeted-therapy>, 2014.
215. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
216. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res*. 1990;50(14):4332-7.
217. Bradley KT. Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer. CAP Cancer Committee
218. American Cancer Society. Tests to classify breast cancers. <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-classifyinMoffat> FL. Chapter 28: Clinical and pathologic prognostic and predictive factors, in Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the Breast*, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
219. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-792.
220. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606-16.
221. Barrett AJ. Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem J* 1970;117(3):601-7.
222. Wilstätter R, Bamann E. Über die proteasen der Magenschleimhaut. Erste abhandlung über die enzyme der leukocyten. *Hoppe-seyler's Zeitschrift fuer Physiologische Chemie* 1928;180:127-43.
223. Westley B, Rochefort H. A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines. *Cell* 1980;20(2):353-62.
224. Fusek M, Vetvicka V. Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005;149(1):43-50.
225. Westley BR, May FE. Cathepsin D and breast cancer. *Eur J Cancer* 1996;32A(1):15-24.
226. Levicar N, Strojnik T, Kos J, Dewey RA, Pilkington GJ, Lah TT. Lysosomal enzymes, cathepsins in brain tumour invasion. *J Neurooncol* 2002;58(1):21-32.
227. Press EM, Porter RR, Cebra J. The isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D, from bovine spleen. *Biochem J* 1960;74:501-14.
228. Minarowska A, Gacko M, Karwowska A, Minarowski L. Human cathepsin D. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(1):23-38.
229. Kornfeld S. Lysosomal enzyme targeting. *Biochem Soc Trans* 1990;18(3):367-74.
230. Rochefort H, Capony F, Garcia M. Cathepsin D: a protease involved in breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1990;9(4):321-31.
231. Conner GE, Richo G. Isolation and characterization of a stable activation intermediate of the lysosomal aspartyl protease cathepsin D. *Biochemistry* 1992;31(4):1142-7.
232. Richo G, Conner GE. Proteolytic activation of human procathepsin D. *Adv Exp Med Biol* 1991;306:289-96.
233. Warwas M, Taurowska E. [Cathepsin D in diagnosis of neoplastic diseases]. *Postepy Hig Med Dosw* 1993;47(4):277-88.

234. Schultz DC, Bazel S, Wright LM, Tucker S, Lange MK, Tachovsky T, Longo S, Niedbala S, Alhadeff JA. Western blotting and enzymatic activity analysis of cathepsin D in breast tissue and sera of patients with breast cancer and benign breast disease and of normal controls. *Cancer Res* 1994;54(1):48-54.
235. Capony F, Rougeot C, Montcourrier P, Cavailles V, Salazar G, Rochefort H. Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res* 1989;49(14):3904-9.
236. Rochefort H. Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur J Cancer* 1992;28A(11):1780-3.
237. Leto G, Gebbia N, Rausa L, Tumminello FM. Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic diseases (review). *Anticancer Res* 1992;12(1):235-40.
238. Diment S, Martin KJ, Stahl PD. Cleavage of parathyroid hormone in macrophage endosomes illustrates a novel pathway for intracellular processing of proteins. *J Biol Chem* 1989;264(23):13403-6.
239. Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;68(1):12-28.
240. Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Wickel M, Schneider-Brachert W, Trauzold A, Hethke A, Schutze S. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ* 2004;11(5):550-63.
241. Roberg K, Kagedal K, Ollinger K. Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am J Pathol* 2002;161(1):89-96.
242. Vetvicka V, Vetvickova J, Fusek M. Anti-human procathepsin D activation peptide antibodies inhibit breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat* 1999;57(3):261-9.
243. Vetvicka V, Vetvickova J, Hilgert I, Voburka Z, Fusek M. Analysis of the interaction of procathepsin D activation peptide with breast cancer cells. *Int J Cancer* 1997;73(3):403-9.
244. Glondu M, Coopman P, Laurent-Matha V, Garcia M, Rochefort H, Liaudet-Coopman E. A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene* 2001;20(47):6920-9.
245. Vetvicka V, Benes P, Fusek M. Procathepsin D in breast cancer: what do we know? Effects of ribozymes and other inhibitors. *Cancer Gene Ther* 2002;9(10):854-63
246. Tedone T, Correale M, Barbarossa G, Casavola V, Paradiso A, Reshkin SJ. Release of the aspartyl protease cathepsin D is associated with and facilitates human breast cancer cell invasion. *FASEB J* 1997;11(10):785-92.
247. Garcia M, Derocq D, Pujol P, Rochefort H. Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. *Oncogene* 1990;5(12):1809-14.
248. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;175(3):409-16.
249. Morikawa W, Yamamoto K, Ishikawa S, Takemoto S, Ono M, Fukushi J, Naito S, Nozaki C, Iwanaga S, Kuwano M. Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000;275(49):38912-20.
250. Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J* 1996;15(15):3861-70.
251. Rochefort H. Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur J Cancer* 1992;28A(11):1780-3.
252. Leto G, Gebbia N, Rausa L, Tumminello FM. Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic diseases (review). *Anticancer Res* 1992;12(1):235-40.

253. Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M, Freiss G, Christensen IJ, Khalaf S, Paolucci F, Pau B, Rasmussen BB, Rose C. Association between high concentrations of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res* 1989;49(21):6008-14.
254. Westley BR, May FE. Prognostic value of cathepsin D in breast cancer. *Br J Cancer* 1999;79(2):189-90. breast cancer. *Annu Rev Med* 1993;44:201-10.
255. Garcia M, Platet N, Liaudet E, Laurent V, Derocq D, Brouillet JP, Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells* 1996;14(6):642-50.
256. Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol* 1992;31(2):125-30.
257. Ravdin PM. Evaluation of cathepsin D as a prognostic factor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24(3):219-26.
258. Spyrtos F, Maudelonde T, Brouillet JP, Brunet M, Defrenne A, Andrieu C, Hacene K, Desplaces A, Rouesse J, Rochefort H. Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 1989;2(8672):1115-8.
259. Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999;79(2):300-7.
260. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990;322(5):297-302/
261. Isola J, Weitz S, Visakorpi T, Holli K, Shea R, Khabbaz N, Kallioniemi OP. Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1993;11(1):36-43.
262. Riley LB, Lange MK, Browne RJ, Cochrane PJ, Choi IJ, Davis B, Arcona S, Alhadeff JA. Analysis of cathepsin D in human breast cancer: usefulness of the processed 31 kDa active form of the enzyme as a prognostic indicator in node-negative and node-positive patients. *Breast Cancer Res Treat* 2000;60(2):173-9.
263. Romain S, Muracciole X, Varette I, Bressac C, Brandone H, Martin PM. [Cathepsin D: an independent prognostic factor in cancer of the breast]. *Bull Cancer* 1990;77(5):439-47.
264. Vignon F, Capony F, Chambon M, Freiss G, Garcia M, Rochefort H. Autocrine growth stimulation of the MCF 7 breast cancer cells by the estrogen-regulated 52 K protein. *Endocrinology* 1986;118(4):1537-45.
265. Tetu B, Brisson J, Lapointe H, Wang CS, Bernard P, Blanchette C. Cathepsin D expression by cancer and stromal cells in breast cancer: an immunohistochemical study of 1348 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1999;55(2):137-47.
266. Niu Y, Fu X, Lv A, Fan Y, Wang Y. Potential markers predicting distant metastasis in axillary nodenegative breast carcinoma. *Int J Cancer* 2002;98(5):754-60.
267. Ferrandina G, Scambia G, Bardelli F, Benedetti Panici P, Mancuso S, Messori A. Relationship between cathepsin-D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a metaanalysis. *Br J Cancer* 1997;76(5):661-6.
268. Duffy MJ, Reilly D, Brouillet JP, McDermott EW, Faul C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Maudelonde T, Rochefort H. Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with disease-free interval and overall survival. *Clin Chem* 1992;38(10):2114-6.
269. Harbeck N, Alt U, Berger U, Kates R, Kruger A, Thomssen C, Janicke F, Graeff H, Schmitt M. Longterm follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer. *Int J Biol Markers* 2000;15(1):79-83.
270. Billgren AM, Rutqvist LE, Johansson H, Hagerstrom T, Skoog L. The role of cathepsin D and PAI-1 in primary invasive breast cancer as prognosticators and predictors of treatment benefit with adjuvant tamoxifen. *Eur J Cancer* 2000;36(11):1374-80.

271. Bevilacqua P, Barbareschi M, Verderio P, Boracchi P, Caffo O, Dalla Palma P, Meli S, Weidner N, Gasparini G. Prognostic value of intratumoral microvessel density, a measure of tumor angiogenesis, in node-negative breast carcinoma--results of a multiparametric study. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36(2):205-17.
272. Aaltonen M, Lipponen P, Kosma VM, Aaltomaa S, Syrjanen K. Prognostic value of cathepsin-D expression in female breast cancer. *Anticancer Res* 1995;15(3):1033-7.
273. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg* 2002;235(1):10-26.
274. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563-572.
275. Helenius MA, Saramaki OR, Linja MJ, Tammela TLJ, Visakorpi T. Amplification of urokinase gene in prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61: 5340-5344.
276. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997;72:1-22.
277. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, et al. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinase during aneurysm formation. *Nat Genet* 1997;17: 439-444.
278. Rifkin DB. Cross-talk among proteases and matrix in the control of growth factor action. *Fibrinol Proteol* 1997;11:3-9.
279. Magdolen V, Rettenberger P, Koppitz M, Goretzki L, Kessler H, Weidle U. Systematic mutational analysis of the receptor binding region of the human urokinase-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* 1996;237:743-751.
280. Liang OD, Chavakis T, Kanse SM, Preissner KT. Ligand binding region in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 2001;276,28946- 28953.
281. Ossowski L, Aguirre JA. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signalling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Bio* 2000;12:613-620.
282. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:25-40.
283. Schroeck F, de Prada NA, Sperl S, et al. Interaction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) with vitronectin (Vn): mapping the binding sites on PAI-1 and Vn. *Biol Chem* 2002;383:1143-1149.
284. Loskutoff, DJ, Curriden SA, Hu G, Deng G. Regulation of cell adhesion by PAI-1, Review article. *APMIS* 1999;107:54-61.
285. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 1982;257:2912-2919.
286. Ehrlich HJ, Keijer J, Preissner KT, et al. Functional interaction of PAI-1 and heparin. *Biochemistry* 1991;30:1021-1028.
287. Kwaan HC, Wang J, Svoboda K, Declerck PJ. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumor growth through inhibition of apoptosis. *Br J Cancer* 2000;82:1702-1708.
288. Janicke F, Schmitt M, Hafter A. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis* 1990;4:6978.
289. Reilly D, Christensen L, Duch M, et al. Type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 1992;50:208-214.
290. Duggan C, Maguire T, McDermott E, et al. Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer. *Int J Cancer* 1995;61: 597-600.
291. Mangel WF, Toledo DL, Nardulli AM, et al. Plasminogen activator in human breast cancer cell lines: hormonal regulation and properties. *J Steroid Biochem* 1988;30:79-88.

292. Pourreau-Schneider N, Delori P, Boutiere B, et al. Modulation of plasminogen activator systems by matrix components in 2 breast cancer cell lines: MCF-7 and MDA-MB-231. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:259–266.
293. Korczak B, Kerbel RS, Dennis JW. Autocrine and paracrine regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases, transin and urokinase gene expression in metastatic and nonmetastatic mammary carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1991;2: 335–341.
294. Long BJ, Rose DP. Invasive capacity and regulation of urokinase-type plasminogen activator in estrogen receptor (ER)-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells and a transfection (S30) stably expressing ER. *Cancer Lett* 1996;99:209–215.
295. Levenson AS, Kwaan HC, Svoboda KM, et al. Oestradiol regulation of the components of the plasminogen-plasmin system in MDA-MB-231 human breast cancer cells stably expressing the oestrogen receptor. *Br J Cancer* 1998;78:88–95.
296. Sieuwerts AM, Klijn JG, Henzen-Logmans SC, et al. Cytokine-regulated urokinase-type-plasminogen activator (uPA) production by human breast fibroblasts in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 1999;55:9–20.
297. Dunn SE, Torres JV, Nihei N, Barrett JC. The insulin-like growth factor-1 elevates urokinase-type plasminogen activator in human breast cancer cells: a new avenue for breast cancer therapy. *Mol Carcinogen* 2000;27:10–17.
298. Lin VC, Eng AS, Hen NE, et al. Effect of progesterone on the invasive properties and tumor growth of progesterone receptor-transfected breast cancer cells MDAMB- 231. *Clin Cancer Res* 2001;7:2880–2886.
299. Silvy M, Giusti C, Martin PM, Berthois Y. Differential regulation of cell proliferation by epidermal growth and amphiregulin in tumoral versus normal breast epithelial cells. *Br J Cancer* 2001;84:936–945.
300. Puricelli L, Proietti CJ, Labriola L, et al. Heregulin inhibits proliferation via ERKs and phosphatidylinositol 3-kinase activation but regulates urokinase plasminogen activator independently of these pathways in metastatic mammary tumor cells. *Int J Cancer* 2002;100:642–653.
301. Guo Y, Pakneshan P, Gladu J, et al. Regulation of DNA methylation in human breast cancer: effect on the urokinase-type plasminogen activator gene production and tumor invasion. *J Biol Chem* 2002;277:41571–41579.
302. Watabe T, Yoshida K, Shindoh M, et al. The ets-1 and ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int J Cancer* 1998;77:128–137.
303. Look M P, van Putten WLJ, Duffy MJ, et al. Pooled analysis of prognostic impact of tumor biological factors uPA and PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:116–128.
304. Del Vecchio S, Stoppelli MP, Carriero MV, et al. Human urokinase receptor concentration in malignant and benign breast tumors by in vitro quantitative autoradiography: comparison with urokinase levels. *Cancer Res* 1993;53:3198–3206.
305. Jankum J, Merrick HW, Goldblatt PJ. Expression and localisation of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and breast cancer. *J Cell Biochem* 1993;53:135–144.
306. Christensen L, Simonsen ACW, Heegaard CW, et al. Immunohistochemical localisation of urokinase-type plasminogen activator, type-1 plasminogen activator inhibitor, urokinase receptor and alpha-2-macroglobulin receptor in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 1996;66:441–452.
307. Kennedy S, Duffy MJ, Duggan C, et al. Semi-quantitation of plasminogen activator and its receptor in breast carcinomas by immunocytochemistry. *Br J Cancer* 1998;77:1638–1641.

308. Nielsen BS, Sehested M, Duun S, et al. Urokinase plasminogen activator is localized in stromal cells in ductal breast cancer. *Lab Invest* 2001;81:1485–1501.
309. Nielsen BS, Sehested M, Timshel S, et al. Messenger mRNA for urokinase plasminogen activator (uPA) is expressed in myofibroblasts adjacent to cancer cells in human breast cancer. *Lab Invest* 1996;74:168–177.
310. Duffy MJ. The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin Exp Med* 1992;10:145–155.
311. Duffy MJ. Urokinase-type plasminogen activator: a potent marker of metastatic potential in human cancer. *Biochem Soc Trans* 2002;30:207–210
312. Duffy MJ: Do proteases play a role in cancer invasion and metastasis? *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23:583–589.
313. Duffy MJ, O’Grady P, Devaney D, O’Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen RJ. Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast cancer. Preliminary report. *Cancer* 1988;62:531–533.
314. Duffy MJ, Reilly D, O’Sullivan C, O’Higgins N, Fennelly JJ. Urokinase plasminogen activator and prognosis in breast cancer. *Lancet* 1990;335:109.
315. Janicke F, Schmitt M, Ulm K, Gossner W, Graeff H. Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer. *Lancet* 1989;ii:1049.
316. Spyrtos F, Martin P-M, Hacene K, et al. Multiparametric prognostic evaluation of biological factors in primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1266–1272.
317. Cook D, Mahmoud-Alexandroni N, Gaffney PJ, et al. Plasminogen activators are powerful indicators of prognosis in breast cancer. *Br J Surg* 1991;78:1495.
318. Foekens J, Schmitt M, Pache L, et al. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res* 1992;52:6101–6105.
319. Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, et al. High levels of urokinasetype plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinoma are associated with poor prognosis. *Cancer Res* 1993;53:2513–2521.
320. Bouchet C, Spyrtos F, Martin P-M, et al. Prognostic role of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinomas. *Br J Cancer* 1994;69:398–405.
321. Sumiyoshi K, Urano T, Takada Y, Takada A. PAI-1 and PAI-2 levels as predictors in staging malignancy in breast cancer. In: Glas-Greenwalt P, ed. *Fibrinolysis in Disease*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995:26–30.
322. Ferno M, Bendahl PO, Borg A, et al. Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer: analysed in steroid receptor cytosols with a luminometric immunoassay. *Eur J Cancer* 1996;32A:793–801.
323. Shiba E, Kim SJ, Taguchi T, et al. A prospective study on the prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator levels in breast cancer tissue. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997;123:555–559.
324. Umeda T, Eguchi Y, Okino K, et al. Cellular localisation of urokinase-type plasminogen activator, its inhibitors and their mRNA in breast cancer tissue. *J Pathol* 1997; 183:388–397.
325. Knoop A, Andreasen PA, Anderson JA, et al. Prognostic significance of urokinase- type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1998;77:932–940.
326. Peyrat J-P, Vanlemmens L, Fournier J, et al. Prognostic value of p53 and urokinase- type plasminogen activator in node-negative human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:189–196.

327. Kim SJ, Shiba E, Kobayashi T, et al. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator (uPA), PA inhibitor type-1 and tissue-type PA antigen levels in node-negative breast cancer: a prospective study on multicenter basis. *Clin Cancer Res* 1998;4:177–182.
328. Tetu B, Brisson J, Lapointe H. Prognostic significance of stromelysin 3, gelatinase A and urokinase expression in breast cancer. *Hum Pathol* 1998;29:979–985.
329. Eppenberger U, Kueng W, Schlaepfli J-M, et al. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998;16:3129–3136.
330. Kute TE, Grondahl-Hansen J, Shao S-M, et al. Low cathepsin D and low plasminogen activator type 1 inhibitor in tumor cytosols define a group of node-negative breast cancer patients with low risk of recurrence. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47:9–16.
331. Broet P, Spyrtos F, Romain S, et al. Prognostic value of uPA and p53 accumulation measured by quantitative biochemical assays in 1245 primary breast cancer patients: a multicenter study. *Br J Cancer* 1999;80:536–545.
332. Konecny G, Untch M, Arboleda J, et al. HER-2 and urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:2448–2457.
333. Malmstrom P, Bendahl P-O, Boiesen P, et al. S-phase fraction and urokinase plasminogen activator are better markers for distant recurrences than Nottingham Prognostic Index and histological grade in a prospective study of premenopausal lymph node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:2010–2019.
334. Meo S, Dittadi R, Sweep CGJ, et al. Prognostic value of VEGF, uPA, PAI-1 in 196 node negative breast cancers. *Int J Biol Markers* 2002;17:S44.
335. Harbeck N, Dettmar C, Thomssen C, et al. Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up. *Br J Cancer* 1999;80:419–426.
336. Le Goff JM, Lavayssiere L, Rouesse J, Spyrtos F. Nonlinear discriminant analysis and prognostic factor classification in node-negative primary breast cancer using probabilistic neural networks. *Anticancer Res* 2000;20:2213–2218.
337. Duffy MJ, Duggan C, Maguire T, et al. Urokinase plasminogen activator as a predictor of aggressive disease in breast cancer. *Enzyme Protein* 1996;49:85–93.
338. Harbeck N, Kates RE, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol* 2002;20:1000–1007.
339. Duffy MJ, Reilly D, McDermott E, et al. Urokinase plasminogen activator as a prognostic marker in different subgroups of patients with breast cancer. *Cancer* 1994;74:2276–2280.
340. Janicke F, Schmitt M, Graeff H. Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and their type 1 inhibitor in breast cancer. *Semin Thromb Hemostas* 1991;17:303–312.
341. Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:1648–1658.
342. Duggan C, Kennedy S, Kramer MD, et al. Plasminogen activator inhibitor type 2 in breast cancer. *Br J Cancer* 1997;76:622–627.
343. Billgren AM, Ritqvist LE, Johansson H, Hagerstrom T, Skoog L. The role of cathepsin D and PAI-1 in primary invasive breast cancer as prognosticators and predictors of treatment with adjuvant tamoxifen. *Eur J Cancer* 2000;36:1374–1380.
344. Janicke F, Schmitt M, Pache L, et al. Urokinase plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24:195–208.

345. Bajou K, Noel A, Gerard RD, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 1998;4:923–928.
346. Bajou K, Masson V, Gerard RD, et al. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo vascularization by interaction with proteases, not vitronectin: implications for antioangiogenic strategies. *J Cell Biol* 2001;152:777–784.
347. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002;108:153–164.
348. Clark GM. Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 1994;30:117–126.
349. Foekens J, Look MP, Peters HA, et al. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:751–756.
350. Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, et al. For the German Chemo No Study Group. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:913–920
351. Harbeck N, Kates RE, Look MP, et al. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (N = 3424). *Cancer Res* 2002;62:4617–4622.
352. Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer; report of the second E.O.R.T.C. Workshop, held on 16-17 March, 1979, in the Netherlands Cancer Institute. *Eur J Cancer* 1980;16(11):1513-5.
353. Hahnel R. Estimation of estrogen receptors in the clinical laboratory. *Pathol Immunopathol Res* 1986;5(1):54-72.
354. Brown PW, Witorsch RJ, Banks LW, Jr., Lawrence W, Jr. Freezing and storage of breast cancer tissue for estrogen receptor protein assay: a convenient method. *Arch Surg* 1977;112(2):183-5.
355. Thorpe SM, Rose C. Oestrogen and progesterone receptor determinations in breast cancer: technology and biology. *Cancer Surv* 1986;5(3):505-25.
356. Hahnel R, Twaddle E. Estimation of the association constant of the estrogen-receptor complex in human breast cancer. *Cancer Res* 1973;33(3):559-66. Ralet PG, Brombacher PJ. The use of coated charcoal in the determination of oestrogen receptor activity. *Eur J Nucl Med* 1981;6(4):159-62.
357. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
358. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013.
359. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):302–12
360. Retsky MW, Demicheli R, Hrshesky WJ, Baum M, Gukas ID. Dormancy and surgery-driven escape from dormancy help explain some clinical features of breast cancer. *APMIS*. 2008;116(7–8): 730–41.

361. Almendro V, Marusyk A, Polyak K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2013;8:277–302.
362. Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer.* 2013;108(3):479–85.
363. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 1.2016. www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf NCCN Clinical Practice.
364. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Hayes DF. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Summary. *J Oncol Pract.* 2016 Mar 8.
365. Molina R, Barak V, van DA, Duffy MJ, Einarsson R, Gion M, Goike H, Lamerz R, Nap M, Sölétormos G, Stieber P: Tumor markers in breast cancer – European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biol* 2005, 26:281–293.
366. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UK, Lilja H, Brünner N, Chan DW, Babaian R, Bast RC Jr, Dowell B, Esteva FJ, Haglund C, Harbeck N, Hayes DF, Holten-Andersen M, Klee GG, Lamerz R, Looijenga LH, Molina R, Nielsen HJ, Rittenhouse H, Semjonow A, Shih IM, Sibley P, Sölétormos G, Stephan C, Sokoll L, Hoffman BR, Diamandis EP: National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast and ovarian cancers. *Clin Chem* 2008, 54:e11–79.
367. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, Cardoso F, on behalf of the ESMO Guidelines Working Group: Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013, 24:vi7–vi23.
368. 90. TRANSIT-Informationseite. [http://www.agoonline.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/march2012/06_2012E_Prognostic_and_Predictive_Factors.pdf]
369. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(33):5287–312.
370. Meier-Hirmer C, Schumacher M. Multi-state model for studying an intermediate event using time-dependent covariates: application to breast cancer. *BMC Med Res Methodol.* 2013;13:80.
371. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M, For the German Chemo No Study Group: Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93:913–992.
372. Look MP, van Putten WLJ, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brünner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broët P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, et al: Pooled analysis of prognostic impact of tumor biological factors uPA and PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94:116–128.
373. Sweep CGJ, Geurts-Moespot J, Grebenshikov N, de Witte JH, Heuvel JJ, Schmitt M, Duffy MJ, Jänicke F, Kramer MD, Foekens JA, Brünner N, Brugal G, Pedersen AN, Benraad TJ: External quality assessment of trans-European multicenter antigen determination (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase plasminogen activator (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer extracts. *Br J Cancer* 1998, 78:1434–1441.

374. Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ: Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast cancer. Preliminary report *Cancer* 1988, 62:531–533.
375. Jänicke F, Schmitt M, Ulm K, Gössner W, Graeff H: Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer. *Lancet* 1989, 2:1049.
376. Jänicke F, Schmitt M, Hafter R, Hollrieder A, Babic R, Ulm K, Gössner W, Graeff H: The urokinase-type plasminogen activator (u-PA) is a potent predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis* 1990, 4:69–78).
377. Ossowski L: Antibodies to plasminogen activator inhibits human tumor metastasis. *Cell* 1983, 35:611–619.
378. Masuda T, Hattori N, Senoo T, Akita S, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Kohno N: SK-216, an inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1, limits tumor progression and angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2013, 12:2378–2388.
379. Kwaan HC, Wang J, Svoboda K, Declerck PJ: Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. *Br J Cancer* 2000, 82:1702–1708.
380. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med*. 1998;4(8):923–8.
381. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, et al. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol*. 2001;152(4): 777–84.
382. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(4):262–72.
383. Olsson N, Carlsson P, James P, Hansson K, Waldemarson S, Malmstrom P, et al. Grading breast cancer tissues using molecular portraits. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(12):3612–23.
384. Witzel I, Milde-Langosch K, Schmidt M, Karn T, Becker S, Wirtz R, et al. Role of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor mRNA expression as prognostic factors in molecular subtypes of breast cancer. *Onco Targets Ther*. 2014;7:2205–13.
385. Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res*. 2014;16(4): 428.

SPISAK SKRAĆENICA

NPI- Notingem prognostički indeks

ER-estrogen

PR-progesteron

ECM-ekstraćelijski matriks

uPA-urokinazni plazminogen aktivator

PAI- plazminogen aktivator inhibitor

CSC-kancerska stem ćelija

DNK- Dezoksiribonukleinska kiselina

EMT-epitelno-mezenhimalna tranzicija

IHC-imunohistohemija

DFI-preživljavanje bez bolesti

ITC-izolovane tumorske ćelije

LVI-limfovaskularna invazija

MMP- matriks metaloproteinaza

FGF-2- fibroblastni faktor rasta-2

VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta

TGF β - transformišući faktor rasta β

uPAR - urokinazni plazminogen aktivator receptor

MAPK- mitogen aktivirana protein kinaza

OS- ukupno preživljavanje

DCC – ugalj obložen dekstranom

EORTC- Evropska organizacija za istraživanje i lečenje raka

IRMA- imunoradiometrijski esej

IDC - invazivni duktalni karcinom

ILC - invazivni lobularni karcinom

EGTM (European Group on Tumor Markers)- Evropska grupa za tumor markere

NACB (National Academy of Clinical Biochemistry)- Nacionalna akademija za biohemiju

ESMO (European Society of Clinical Oncology)- Evropsko udruženje kliničkih onkologa

AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie)-Udruženje ginekoloških onkologa

BIOGRAFIJA

Dr Marko Buta je rođen 16.08.1974. godine u Beogradu gde je završio osnovnu školu i prva dva razreda IX beogradske gimnazije. Srednju školu završio je u Sjedinjenim Američkim Državama, država Džordžija a potom diplomirao biologiju na Univerzitetu Džordžija 1995.godine. Stekao je zvanje doktor medicine na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2002.godine. Zaposlen je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS) od 2004.godine gde obavlja funkciju šefa odseka za endokrinu hirurgiju i hirurgiju glave i vrata a bio je i šef odseka za hirurgiju melanoma, sarkoma i tumora mekih tkiva IORS-a. Promovisan je u zvanje kliničkog asistenta na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, katedra za opštu hirurgiju-onkologiju u julu 2015.godine. Sekretar je Etičkog odbora Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije i sekretar Udruženja onkoloških hirurga Srbije (UOHS). U junu 2014.godine je odbranio magistarsku tezu pod nazivom: Prognostički faktori i kliničko-patološke karakteristike diferentovanih tireoidnih karcinoma kod dece i adolescenata na Medicinskom Fakultetu u Beogradu pod mentorstvom Prof.Džodića. Izabran je u istraživačko zvanje istraživač-saradnik u martu 2015.godine od strane Naučnog veća Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije a u skladu sa odredbama Zakona o naučnoistraživačkoj delatnosti.

Stručno usavršavanje obavio je u Univerzitetskoj klinici u Essen-u, Nemačka, u toku 2013.godine kod Prof Martin-a Walz-a u Centru za minimalno invazivnu hirurgiju sa posebnim osvrtom na hirurgiju štitaste i nadbubrežne žlezde. U toku 2015.godine boravio je u Centru za minimalno invazivnu i onkološku hirurgiju u Ulmu, Nemačka.

Učestvovao je na projektu Ministarstva za nauku i tehnologiju Srbije br. 145018, od 2006. do 2010. godine "Molekularni biomarkeri rasta, invazivnosti i metastatičnosti kancera dojke: biološki i klinički aspekti".

Bio je član radne grupe za izradu Nacionalnih vodiča dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke u toku 2012.godine. Učestvovao je kao koautor u izradi Priručnika za prevenciju, dijagnostiku i lečenje melanoma kože u okviru Intersekcijiskijskog odbora za melanom Srpskog lekarskog društva koji je izdat

2014.godine. Učestovao je kao koautor u izradi monografije “Rak dojke” profesora dr Radana Džodića koja je uvrštena u nastavno sredstvo za studente medicine, specijalizante opšte hirurgije i subspecijalizante iz oblasti onkologije medicinskog fakulteta u Beogradu. Autor je ili koautor većeg broja radova objavljenih u celini u domaćim i internacionalnim časopisima. Do sada ima 16 publikovanih radova na SCI listi. Član je ESSO (Evropsko udruženje onkoloških hirurga).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Marko Buta

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Prognostički značaj klasičnih i molekularnih biomarkera ranog karcinoma dojke u praćenju toka bolesti

- 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, 25.05.2016.

M. Buta

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Marko Buta

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada: **Prognostički značaj klasičnih i molekularnih biomarkera ranog karcinoma dojke u praćenju toka bolesti**

Mentor Prof dr Radan Džodić

Potpisani Marko Buta

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, 25.05.2016.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

Prognostički značaj klasičnih i molekularnih biomarkera ranog karcinoma dojke u praćenju toka bolesti

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao 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).

Potpis doktoranta

U Beogradu, 25.05.2016.

