

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Marko R. Jevrić

**ISPITIVANJE PREDIKTIVNE VREDNOSTI  
MOLEKULARNIH BIOMARKERA U PROCENI  
TOKA I ISHODA BOLESTI KOD  
PACIJENTKINJA SA HER2 NEGATIVNIM I  
NODUS NEGATIVNIM KARCINOMOM DOJKE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Marko R. Jevrić

**TESTING THE PREDICTIVE VALUE OF  
MOLECULAR BIOMARKERS IN THE  
ASSESSMENT OF THE COURSE AND  
OUTCOME OF THE DISEASE IN PATIENTS  
WITH HER2 NEGATIVE AND NODUS  
NEGATIVE BREAST CANCER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

**Mentor:** Prof. dr Darija Kisić Tepavčević, vanredni profesor Katedre za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu,

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

**Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:**

1. Prof. dr Tatjana Pekmezović, redovni profesor Katedre za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Ivan Marković, docent Katedre za hirurgiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Ljiljana Mijatović Teodorović, redovni profesor Katedre za nuklearnu medicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu

# ISPITIVANJE PREDIKTIVNE VREDNOSTI MOLEKULARNIH BIOMARKERA U PROCENI TOKA I ISHODA BOLESTI KOD PACIJENTKINJA SA HER2 NEGATIVNIM I NODUS NEGATIVNIM KARCINOMOM DOJKE

## SAŽETAK

**Uvod:** Kliničke studije i praksa su pokazali da hormon receptor (HR) pozitivni / receptor za humani epidermalni faktor rasta tip 2 (HER2) negativni karcinomi dojke imaju različitu prognozu i da postoji potreba da se na osnovu dodatnih molekularnih biomarkera ova grupa tumora dodatno reklasifikuje.

**Pacijenti i metode:** Procenjujvana je prognostička vrednost urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA), inhibitora aktivatora plazminogena tip 1 (PAI-1) i 4G/5G varijante *PAI-1* gena u grupi pacijentkinja radikalno operisanih zbog karcinoma dojke, kod kojih tumori pokazuju pozitivan steroidni receptorski status (estrogen receptor (ER)/progesteron receptor (PR)), a kod kojih je primenjivana adjuvantna hormonska terapija. Studija je uključila 81 pacijentkinju sa nodus negativnim, ER i/ili PR pozitivnim receptorima i HER2 negativnim operabilnim karcinomima dojke, koji su primale adjuvantnu hormonsku terapiju. Vrednosti uPA i PAI-1 koncentracije u tumorskom tkivu određene su FEMTELLE® uPA/PAI-1 ELISA testom. Inserciono/delecioni 4G/5G polimorfizam na poziciji -675 gena *PAI-1* detektovan je PCR-RFLP metodom (engl. *Polimerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism*).

**Rezultati:** Istraživanje je pokazalo da pacijentkinje sa vrednošću uPA u tumorskom tkivu iznad 3 ng/mg proteina imaju značajno smanjeno vreme bez pojave bolesti (engl. *disease-free survival, DFS*) i ukupno preživljavanje (engl. *overall survival, OS*) u poređenju sa pacijentkinjama kod kojih su vrednosti uPA manje ili jednake 3 ng/mg proteina. Pacijentkinje sa vrednostima PAI-1 proteina u tumorskom tkivu iznad 14 ng/mg imaju značajno smanjeno ukupno preživljavanje u poređenju sa pacijentkinjama sa vrednošću PAI-1 proteina ispod ili jednako 14 ng/mg. Pacijentkinje sa dominantnim alelom u *PAI-1* genotipu (heterozigot ili dominantni homozigot, -675 4G/5G i -675 5G/5G) imaju značajno duže vreme bez znakova bolesti (DFS) i ukupno preživljavanje (OS) u poređenju sa pacijentkinjama sa recesivnim homozigotnim genotipom (-675 4G/4G).

**Zaključak:** Vrednosti molekularnih biomarkera uPA i PAI-1 u tumorskom tkivu mogu imati uticaj na ishod bolesti kod pacijentkinja sa ER/PR pozitivnim, HER2 negativnim i nodus negativnim karcinomom dojke lečene adjuvantnom hormonskom terapijom. Podgrupa pacijentkinja sa recesivnim homozigotnim genotipom gena *PAI-1* (-675 4G/4G) može imati lošiji ishod bolesti u poređenju sa heterozigotnim/dominantno homozigotnim genotipom (-675 4G/5G i -675 5G/5G).

**Ključne reči:** rani karcinom dojke, molekularni biomarkeri, uPA/PAI-1, gen *PAI-1*.

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Epidemiologija

**UDK broj:**

# TESTING THE PREDICTIVE VALUE OF MOLECULAR BIOMARKERS IN THE ASSESSMENT OF THE COURSE AND OUTCOME OF THE DISEASE IN PATIENTS WITH HER2 NEGATIVE AND NODUS NEGATIVE BREAST CANCER

## ABSTRACT

**Introduction:** Clinical studies and practice have shown that the hormone receptor (HR) positive/receptor for human epidermal growth factor type 2 (HER2) negative breast cancers have different prognosis and that there is a need to further reclassify this group of tumors based on additional molecular biomarkers.

**Patients and methods:** The prognostic value of urokinase-type plasminogen activator (uPA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and 4G/5G variant of *PAI-1* gene was evaluated in a group of patients radically operated for breast cancer in whom tumors showed a positive steroid receptor status (estrogen receptor (ER) / progesterone receptor (PR)) and who were treated with adjuvant hormone therapy. The study included 81 patients with nodus negative, ER and/or PR positive and HER2 negative operable breast cancers receiving adjuvant endocrine therapy. uPA and PAI-1 concentrations in tumor tissue were determined by FEMTELLE® uPA/PAI-1 ELISA. Insertion (5G) / deletion (4G) polymorphism at position -675 of the *PAI-1* gene was detected by PCR-RFLP analysis.

**Results:** The study showed that patients with uPA values in tumor tissue above 3 ng/mg of protein had significantly reduced disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) compared to patients whose uPA values were less than or equal to 3 ng/mg of protein. Patients with PAI-1 protein values in tumor tissue above 14 ng/mg of protein have significantly reduced overall survival compared to patients with PAI-1 protein values below or equal to 14 ng/mg of protein. Patients with a dominant allele in the *PAI-1* genotype (heterozygote and dominant homozygote, -675 4G/5G and -675 5G/5G) have significantly longer DFS and OS compared with patients with recessive homozygote genotype (-675 4G/4G).

**Conclusion:** Values of molecular biomarkers uPA and PAI-1 in tumor tissue may have an impact on disease outcome in patients with ER/PR positive, HER2 negative, and nodus negative breast cancer treated with adjuvant endocrine therapy. A subgroup of patients with recessive homozygous genotype of *PAI-1* gene (-675 4G/4G) may have worse disease outcome compared to patients with heterozygous/dominant homozygous genotype (-675 4G/5G and -675 5G/5G).

**Keywords:** early breast cancer, molecular biomarkers, uPA/PAI-1, *PAI-1* gene.

**Research area:** Medicine

**Special topics:** Epidemiology

**UDC number:**

# SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
1.1. Epidemiologija karcinoma dojke .....	1
1.2. Prognostički i prediktivni faktori .....	1
1.2.1. Definicija .....	1
1.2.2. Prognostički faktori u vezi sa karakteristikama pacijenta .....	2
1.2.2.1. Životno doba .....	2
1.2.3. Prognostički faktori u vezi sa karakteristikama bolesti .....	3
1.2.3.1. Histološki tipovi tumora .....	3
1.2.3.2. Veličina tumora .....	3
1.2.3.3. Stepen histološke diferencijacije tumora (Histološki gradus tumora) .....	4
1.2.3.4. Limfovaskularna invazija .....	4
1.2.3.5. Status limfnih čvorova pazušne jame (nodusni status) .....	5
1.2.4. Molekularni faktori: hormonski receptori (ER i PR), receptor za humani faktor rasta tip 2 (HER2) i proliferativni indeks Ki 67 .....	6
1.2.4.1. Status receptora za estrogen i progesteron .....	6
1.2.4.2. Receptor za humani faktor rasta tip 2 (HER2) .....	6
1.2.4.3. Proliferativni indeks Ki 67 .....	7
1.3. Molekularni podtipovi karcinoma dojke .....	8
1.4. Lečenje ranog karcinoma dojke .....	8
1.4.1. Hirurška terapija .....	8
1.4.2. Postoperativna RT .....	9
1.4.3. Adjuvantna sistemska terapija: hemioterapija, hormonska terapija, ciljana terapija .....	9
1.4.3.1. Hemioterapija .....	10
1.4.3.2. Hormonska terapija .....	11
1.4.3.3. Ciljana terapija .....	11
1.5. HR pozitivan HER2 negativan podtip .....	12
1.5.1. Adjuvantna sistemska terapija .....	12
1.5.2. Testovi genskog profilisanja (Oncotype DX, Mammaprint) .....	13
1.6. Urokinazni aktivator plazminogena (uPA) i inhibitor aktivatora plazminogena tip 1 (PAI-1) .....	15
1.6.1. Fiziološka uloga .....	15
1.6.2. Značaj u rastu i širenju tumora .....	16
1.6.3. Prognostički i prediktivni značaj u karcinomu dojke .....	16
1.6.4. PAI-1 gen i polimorfizam (inserciono/delecioni polimorfizam na poziciji -675bp promotorske regije PAI-1 gena .....	17

1.6.5. Preporuke za određivanje biomarkera kod luminalnih HER2 negativnih karcinoma .....	18
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	19
3. PACIJENTI I METODE .....	20
3.1 Određivanje nivoa ekspresije ER, PR, HER2 i Ki67 - Imunohistohemijska analiza .....	20
3.2 Određivanje koncentracije uPA i PAI-1 ELISA testom .....	21
3.3 Izolacija DNK .....	21
3.4 Detekcija genetičkih varijanti - PCR-RFLP analiza .....	21
3.5 Statistička analiza .....	22
4. REZULTATI .....	23
4.1 Karakteristike ispitivane grupe, oboljenja i ishod lečenja .....	23
4.1.1 Karakteristike ispitivane grupe .....	23
4.1.2 Karakteristike bolesti .....	23
4.1.3 Način i ishod lečenja .....	25
4.2 Udruženost klasičnih prognostičkih faktora i intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 .....	27
4.3 Udruženost klasičnih prognostičkih faktora sa ishodom bolesti (DFS, OS, EFS) .....	30
4.4 Udruženost intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 sa ishodom bolesti (DFS, OS, EFS) .....	30
4.4.1. Udruženost intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 (standardne granične vrednosti) sa ishodom bolesti (DFS, OS, EFS) .....	30
4.4.2. Udruženost intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 (ROC granične vrednosti) sa ishodom bolesti (DFS, OS, EFS) .....	35
4.5 Udruženost -675 4G/5G PAI-1 genotipa sa ishodom bolesti (DFS, OS, EFS) .....	40
5. DISKUSIJA .....	43
6. ZAKLJUČCI .....	52
7. LITERATURA .....	53

# 1. UVOD

## 1.1. Epidemiologija karcinoma dojke

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 tokom 2018. godine u svetu je registrovano 2 089 000 novih slučajeva bolesti i 627 000 smrtnih ishoda [2]. Učestalost bolesti na globalnom nivou kontinuirano raste, a rizik da oboli od raka dojke ima 1 od 8 žena (12,5%) tokom života [2]. Broj novoobolelih slučajeva od raka dojke u centralnoj Srbiji tokom 2015. godine je iznosio 2966, dok je broj umrlih iznosio 1215 [3].

Epidemijski talas karcinoma dojke pogađa i razvijene i zemlje u razvoju. Ta raspodela, kada je u pitanju broj obolelih, gotovo je ravnomerna, dok je broj smrtnih ishoda u zemljama u razvoju za oko 40% veći [4].

Karcinom dojke u velikom broju zemalja čini oko 25% svih malignih bolesti ženske populacije, u najrazvijenijim zemljama čak 29%, dok u strukturi mortaliteta učestvuje sa oko 14–15% [5].

Geografska distribucija karcinoma dojke na globalnom nivou nije ravnomerna. Područja u kojima se registruje najviša učestalost bolesti su zapadna Evropa (89,9/100.000), Australija i Novi Zeland (85,5/100.000), severna Evropa (84/100.000), Severna Amerika (76,7/100.000) i južna Evropa (68,9/100.000), što se pripisuje višoj prevalenciji poznatih faktora rizika za ovu bolest u pomenutim regionima. Područje najniže incidencije karcinoma dojke je istočna Afrika (19,3/100.000)[6].

Analiza kretanja incidencije karcinoma dojke u zapadnoevropskim zemljama pokazala je trendove porasta, posebno kod žena starijih od 50 godina, što se delom pripisuje češćem i ranijem otkrivanju bolesti, odnosno efektima organizovanog skrininga, ali i efektima demografske tranzicije, koji vode povećanju broja žena u riziku od bolesti [4,7].

Kada je u pitanju mortalitet od karcinoma dojke, evidentan je trend opadanja u SAD i razvijenim zemljama. U Evropi mortalitet od karcinoma dojke poslednjih decenija kreće se od smanjenja za 30% u Engleskoj do povećanja od 25% u Estoniji. Osim kontribucije u povećanju incidencije, naročito u starijim uzrasnim grupama, evidentan je i učinak skrininga u snižavanju mortaliteta od karcinoma dojke [8]. Ukoliko se pomenuti trendovi nastave, već za 10 godina može se očekivati blizu 3 miliona novih slučajeva karcinoma dojke godišnje, na globalnom nivou [9].

## 1.2. Prognostički i prediktivni faktori

### 1.2.1. Definicija

Karcinom dojke je u visokom procentu izlečiva bolest. Najvažniji faktor je rana dijagnoza, gde je dovoljna i samo lokoregionalna terapija (hirurška intervencija +/- radioterapija). Međutim, karakteristika karcinoma dojke je da se relaps bolesti može javiti i kod onih pacijentkinja koje su dijagnostikovane u najranijem stadijumu bolesti i, često, i nakon više od 5 godina od operacije (kasni relapsi). Zbog toga se pacijentkinje dijagnostikovane u resektabilnom stadijumu bolesti (stadijum I i II) leče nakon radikalne operacije adjuvantnom sistemskom terapijom u cilju snižavanja rizika od relapsa bolesti i, u krajnjem, produženja preživljavanja [10]. Sa ciljem unapređenja terapije u pravcu



efikasnijeg lečenja i terapije skrojene prema pacijentu (engl. *patient tailored therapy*) ulažu se značajni napori za otkrivanje pouzdanih prognostičkih i prediktivnih faktora [11].

Prognostički faktori su markeri povezani sa rizikom od relapsa bolesti u odsustvu sistemske terapije, dok su prediktivni faktori markeri čije je prisustvo, ili odsustvo povezano sa terapijskim efektom antineoplastične terapije (sistemske ili radioterapije). Jedan isti marker može imati i prognostičku i prediktivnu vrednost. Na primer, pozitivan status ER je slab prognostički marker dobre prognoze, ali je istovremeno snažan prediktivni faktori pozitivnog terapijskog odgovora tumora na hormonsku terapiju [12,13]. Prilikom donošenja odluke o postoperativnoj primeni antineoplastične terapije uzimamo u obzir prognostičke i prediktivne faktore. Klasični prognostički faktori dele se u dve grupe: a) zavisni od pacijenta: životno doba (žene mlađe od 35 godina imaju lošiju prognozu od žena starijih od 35 godina) i b) zavisni od bolesti: broj metastatskih ipsilateralnih aksilarnih limfnih čvorova (najsnažniji prognostički faktor), veličina i gradus tumora i histološki tip, zatim biološki parametri koji se rutinski određuju imunohistohemijskom (IHH) metodom: ER, PR, HER2 i Ki 67 proliferativni indeks [14-17].

Prognostički faktori mogu da zavise kako od osobina domaćina, tako i od osobina samog tumora (Tabela 1).

Tabela 1. Prognostički faktori toka bolesti za primarni karcinom dojke

Parametri pacijenta	Parametri tumora
Životno doba	Nodusni status
	Veličina tumora
	Histološki gradus tumora
	Histološki tip tumora
	Limfo-vaskularna invazija
	HR status
	HER2 status
	Ki67

Prediktivni faktori u karcinomu dojke zavise od tumora i prikazani su u Tabeli 2.

Tabela 2. Prediktivni faktori toka bolesti za primarni karcinom dojke

Parametri pacijenta	Parametri tumora
-	ER status
	PR status
	HER2 status

## 1.2.2. Prognostički faktori u vezi sa karakteristikama pacijenta

### 1.2.2.1. Životno doba

Životno doba predstavlja faktor rizika za nastanak karcinoma dojke, budući da se učestalost karcinoma približno udvostručuje sa svakih 10 godina života, pri čemu se najveća učestalost beleži u periodu između 50. i 60. godine života [18].

Prognostički značaj životnog doba kod žena koje obole od karcinoma dojke nije u potpunosti razjašnjen. Do sada sprovedena istraživanja su uključivala ograničen broj ispitanica, pri čemu su rezultati studija bili oprečni [19-24].

Literaturni podaci pokazuju da mlađe žene, naročito mlađe od 35 godina imaju lošiju

prognozu od starijih od 35 godina. Upoređivanjem cele populacije pacijentkinja mlađih od 35 godina sa populacijom starijih od 35 godina, pokazano je da veći procenat mlađih pacijentkinja ima agresivnije biološke forme karcinoma (gradusa 3, trostruko negativni podtipovi, HER2 pozitivni podtipovi, veći broj zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova) [25]. Međutim, postoje analize koje ukazuju na to da je životno doba nezavisni prognostički faktor loše prognoze kod žena mlađih od 35 godina. Pokazano je da ove žene imaju lošije preživljavanje bez obzira na stadijum bolesti, biologiju tumora i lečenje u poređenju sa starijim od 35 godina [26]. Azim i saradnici su pokazali da karcinom dojke kod mladih žena ima jedinstvene biološke procese vezane za signalne puteve nezrelih ćelija mlečne žlezde (RANKL, c-kit, MAPK, PI3K) i utišavanje gena vezanih za apoptozu [27].

### 1.2.3. Prognostički faktori u vezi sa karakteristikama bolesti

#### 1.2.3.1. *Histološki tipovi tumora*

U zavisnosti od odnosa malignih ćelija i bazalne membrane, karcinomi dojke se mogu podeliti u dve grupe:

1. Neinvazivni (*in situ*) – maligne ćelije ne probijaju bazalnu membranu
2. Invazivni – maligne ćelije probijaju bazalnu membranu.

Od invazivnih karcinoma dojke najčešći su duktalni (~55%) i lobularni (~10%) [28,29]. Nešto ređe javljaju se medularni, tubularni, mucinozni i dr. [30]. Određene histološke forme karcinoma dojke imaju bolju prognozu, kao što je tubularni, adenoid cistični i medularni [31,32,33].

#### 1.2.3.2. *Veličina tumora*

Veličina tumora određuje se merenjem u najmanje dve dimenzije pri čemu se najveća izmerena vrednost uzima kao veličina tumora [34]. Veličina tumora predstavlja klasični prognostički faktor koji se, pored drugih faktora rizika, uzima u obzir u donošenju odluke da li je indikovana dalja sistemska adjuvantna terapija i/ili postoperativna radioterapija (RT) [11,35].

Između veličine tumora i preživljavanja postoji pozitivna korelacija, odnosno kod pacijentkinja sa manjim tumorima bolja je prognoza bolesti. Pre svega veličina tumora je u pozitivnoj korelaciji sa verovatnoćom za nastanak regionalnih metastaza, te sa brojem zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova [36]. Takođe veličina tumora utiče i na broj udaljenih metastaza, te na taj način tumor direktno utiče na verovatnoću za pojavu relapsa bolesti i smrtni ishod [37]. Prema Carter i sar. veličina tumora je nezavisan prognostički faktor kod pacijentkinja sa negativnim nalazom u limfnim čvorovima. Kod pacijentkinja kod kojih je veličina tumora manja od 1cm u prečniku zabeleženo je ukupno petogodišnje preživljavanje od gotovo 100%. Kada je prečnik tumora između 1-3cm ukupno petogodišnje preživljavanje opada i iznosi 89%, odnosno 85% kada je veličina dijametra tumora između 3-5cm [38]. Pozitivna korelacija dokazana je i u studiji Fisher i sar. pri čemu je petogodišnja stopa recidiva karcinoma približno 10% za pacijentkinje sa tumorom promera manjeg od 10 mm, a približno 30-50% za one sa tumorom promera od 50 mm i više [39]. Najnovija multicentrična studija sprovedena u Kanadi potvrdila je ranija zapažanja da je veličina tumora (granična vrednost veličine dijametra tumora = 2cm) nezavisan prognostički faktor za lokalni i regionalni recidiv bolesti, udaljene metastaze te karcinom specifično i ukupno preživljavanje [40].

Kod multifokalnih tumora, značaj veličine tumora nije u potpunosti razjašnjen, odnosno ne postoji saglasnost da li se prilikom merenja u obzir uzima promer najvećeg tumora, ili je u obzir potrebno uzeti ukupnu veličinu svih tumora zajedno. Prema Andea i sar. promer najvećeg tumora karcinoma predstavlja najpouzdaniju meru za gradiranje karcinoma [41]. Međutim lošija prognoza karakteriše multifokalne karcinome u poređenju sa unifokalnim karcinomima sličnih dimenzija usled češće pojave aksilarnih metastaza kod multifokalnih karcinoma [41].

### 1.2.3.3. *Stepen histološke diferencijacije tumora (histološki gradus tumora)*

Sa ciljem preciznije procene prognoze bolesti i optimizacije lečenja pacijenata uveden je histološki gradus tumora kao pokazatelj stepena agresivnosti tumora [42,43].

Prilikom određivanja histološkog gradusa u obzir se uzimaju tri karakteristike tumora pri čemu se svakoj dodeljuje vrednost 1-3:

1. Formiranje/prisustvo tubularnih struktura tkiva dojke (1-3)
2. Prisustvo nuklearnog polimorfizma/atipije (1-3)
3. Broj mitozna (1-3).

Sabiranjem vrednosti dodeljenih svakoj od posmatranih karakteristika dobija se ukupan skor koji može biti u rasponu od 3 do 9 na osnovu čega se određuje histološki gradus tumora:

- Gradus I - 3 do 5 bodova - dobro diferentovani tumori
- Gradus II - 6 do 7 bodova - umereno diferentovani tumori
- Gradus III - 8 do 9 bodova - slabo diferentovani tumori [44]

Slabo diferentovani tumori (tumori visokog gradusa) dovode se u vezu sa većom učestalošću relapsa bolesti, u poređenju sa dobro diferentovanim tumorima niskog gradusa [45].

Histološki gradus je značajan prognostički faktor i za ukupno preživljavanje. Bloom i Richardson su na jednoj seriji od oko 1400 pacijentkinja, od kojih je 360 praćeno u periodu od 15 godina, utvrdili da je stopa preživljavanja direktno srazmerna gradusu tumora. Tako, kod pacijentkinja sa tumorima gradusa I stopa 10-god preživljavanja iznosi oko 50%, dok kod pacijentkinja sa gradusom tumora III ona iznosi manje od 20% [44].

Iako se sistem „gradiranja“ tumora često koristi u određivanju prognoze oboljenja on ima određene nedostatke. Jedan od problema jeste nešto slabija reproducibilnost kod procesa „gradiranja“ od strane različitih patologa. Pored toga velika većina tumora se klasifikuje u gradus II koji predstavlja heterogenu grupu po pitanju ishoda bolesti [46].

Kada se histološki gradus koristi zajedno sa podacima o veličini tumora i histološkom statusu limfnih čvorova prognostička vrednost ovog parametra raste. Na osnovu ovih parametara sastavljen je Nottinghamski prognostički index (NPI – tabela 2) [47,48].

*Tabela 3. Predviđeno desetogodišnje karcinom specifično preživljavanje i kategorije Nottinghamskog prognostičkog indeksa (NPI)*

NPI	Zbir(skor)	Karcinom-specifično 10-godišnje preživljavanje	Ukupno 10-godišnje preživljavanje
I (odličan)	≤2,4	96%	88%
II (dobar)	>2,4 i ≤3,4	93%	86%
III (umeren)	>3,4 i ≤5,4	78%	74%
IV (loš)	>5,4	44%	42%

$NPI = \text{veličina tumora (cm)} \times 0,2 + \text{status limfnih čvorova (1-3)} + \text{histološki gradus (1-3)}$

### 1.2.3.4. *Limfovaskularna invazija*

Limfovaskularna invazija (LVI) se definiše kao prisustvo tumorskih ćelija u krvnim ili limfnim sudovima tkiva dojke koji okružuju invazivni karcinom dojke [49]. Vaskularna invazija može se naći u približno četvrtini slučajeva karcinoma dojke, a češće se vidi kod slabo diferentovanih, većih tumora, pre svega duktalnog invazivnog karcinoma [50].

Prisustvo LVI dovodi se u vezu sa povišenim rizikom od zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova kao i rizikom od prisustva udaljenih metastaza [51]. U studiji Abner i sar. kod pacijentkinja bez prisutne LVI zabeležene su metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima u 10% slučajeva dok je kod pacijentkinja sa LVI taj procenat iznosio preko 50% [52]. U istoj studiji utvrđeno je da LVI poseduje prognostički potencijal za pojavu udaljenih metastaza kod pacijentkinja sa negativnim statusom aksilarnih limfnih čvorova koje nisu bile podvrgnute adjuvantnoj sistemskoj terapiji. Kod pacijentkinja sa LVI 10-godišnje preživljavanje bez udaljenih metastaza iznosilo je 69%, dok je u slučaju pacijentkinja sa karcinomom dojke bez LVI taj procenat iznosio gotovo 90% [52]. U pogledu ukupnog preživljavanja LVI je nezavisan prognostički faktor kod pacijentkinja sa operabilnim karcinomom dojke sa ili bez prisutnih metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima [53,54].

#### 1.2.3.5. Status limfnih čvorova pazušne jame (nodusni status)

Status limfnih čvorova pazušne jame, odnosno prisustvo ili odsustvo metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame predstavlja najznačajniji prognostički faktor kod pacijentkinja sa karcinomom dojke [55]. Prema Fisher i sar. recidiv karcinoma dojke može da se očekuje u desetogodišnjem periodu nakon primarnog lečenja kod oko jedne četvrtine pacijentkinja sa karcinomom dojke kod kojih nisu otkrivene metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima, dok se recidiv kod pacijentkinja sa zahvaćenim aksilarnim limfnim čvorovima može očekivati kod oko tri četvrtine pacijentkinja [56].

Procena statusa limfnih čvorova pazušne jame se najčešće sprovodi intraoperativno metodom biopsije stražarnih limfnih čvorova, ili nakon disekcije pazušne jame.

U zavisnosti od broja zahvaćenih limfnih čvorova pacijentkinje se mogu razvrstati u 4 grupe [43]:

- Grupa I - 0 zahvaćenih limfnih čvorova,
- Grupa II - 1 do 3 zahvaćena limfna čvora,
- Grupa III - 4 do 9 zahvaćenih limfnih čvorova,
- Grupa IV - 10 i više zahvaćenih limfnih čvorova.

Rizik od pojave recidiva bolesti kao i ukupno preživljavanje direktno je srazmerno broju zahvaćenih limfnih čvorova [38,57,58].

Prema Nemoto i sar. procenat recidiva u prvih 5 godina od inicijalnog onkološkog lečenja karcinoma dojke iznosi 19.4% kod pacijentkinja bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima, 54.2% kada je zahvaćeno 5 limfnih čvorova, 71.5% kada je zahvaćeno 11-15 limfnih čvorova, te 82.2% kada je zahvaćeno 21 ili više limfnih čvorova. U pogledu petogodišnjeg preživljavanja kod odsustva metastaza ono iznosi 71.8%. Sa porastom broja zahvaćenih limfnih čvorova petogodišnje preživljavanje opada te u slučaju prisustva metastaza u 21+ limfnih čvorova iznosi 22.2% [59].

Pored broja zahvaćenih limfnih čvorova od prognostičkog značaja je i nivo aksilarne jame u kojoj su zahvaćeni limfni čvorovi, pri čemu metastaze u viši nivo pazušne jame i apeks ukazuju na lošiju prognozu bolesti [60]. Status aksilarnih limfnih čvorova uzima se u obzir pri odlučivanju o primeni adjuvantne sistemske terapije. Prema preporukama adjuvantno lečenje je indikovano kod svih pacijentkinja kod kojih postoje metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima, s obzirom na to da se u ovoj grupi pacijentkinja pojava recidiva bolesti u 10-godišnjem periodu beleži u oko 70% slučajeva [61, 62].

U jednoj od sveobuhvatnih studija novijeg datuma utvrđeno je da je status limfnih čvorova pazušne jame snažan prediktor pojave lokalnog i regionalnog recidiva bolesti, udaljenih metastaza, karcinom specifičnog i sveukupnog preživljavanja, te da je prognostički značaj ovog parametra nezavisan od veličine i gradusa tumora, vrste hirurške ili hemioterapije, te starosti pacijentkinja [40].

Status limfnih čvorova pazušne jame pokazuje i izvesne nedostatke u pogledu prognostičkog potencijala s obzirom na to da se kod gotovo 50% pacijentkinja sa pozitivnim statusom izlečenje

postiže lokalnom terapijom, dok se kod oko 30% pacijentkinja sa negativnim statusom kod kojih nije provedena sistemska (adjuvantna) terapija beleži pojava recidiva, ili metastaza u desetogodišnjem periodu [63].

#### 1.2.4. Molekularni faktori: hormonski receptori (ER i PR), receptor za humani faktor rasta tip 2 (HER2) i proliferativni indeks Ki 67

##### 1.2.4.1. Status receptora za estrogen i progesteron

Status receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR) predstavlja najstariji biomarker u dijagnostici karcinoma dojke. Prema ekspresiji receptora karcinomi dojke klasifikuju se u hormon receptor (HR) "pozitivne" i HR "negativne" karcinome [64,65]. Iako određeni broj izvora predlaže kvantifikaciju nivoa ekspresije, najnovije studije ukazuju na činjenicu da je za prognostičke i prediktivne potrebe dovoljna kvalitativna procena ER i PR statusa [66].

Od svih dijagnostikovanih karcinoma dojke kod oko 75% postoji pozitivna ekspresija ER [67]. Ovaj marker poseduje kako prognostički tako i prediktivni značaj, mada se u svakodnevnoj praksi koristi prvenstveno kao prediktivni faktor. Karcinome dojke sa pozitivnom ekspresijom karakteriše bolja prognoza [68]. S druge strane, ER negativni karcinomi su obično agresivniji i češće daju metastaze [69]. Bitno je napomenuti da ekspresiju ER treba posmatrati kao dinamičnu pojavu koja može da se menja kako bolest odmiče. Primećeno je da se kod približno 20% pacijentkinja kod kojih se utvrdi prisustvo ER pozitivnih tumora i kod kojih nakon adjuvantne hormonske terapije dođe do povlačenja oboljenja, javlja recidiv karcinoma kod koga ne postoji pozitivna ER ekspresija [70].

Ekspresija PR se obično određuje simultano sa određivanjem ekspresije ER, s obzirom na to da je utvrđeno da je njihova ekspresija indukovana vezivanjem estrogena za ER [71]. Rezultati nekoliko kliničkih studija ukazali su na činjenicu da je odgovor na hormonsku terapiju bolji kod pacijentkinja sa ER pozitivnim i PR pozitivnim karcinomima u poređenju sa ER pozitivnim i PR negativnim karcinomima dojke [72,73,74]. Prediktivni značaj PR statusa kao nezavisnog faktora pri donošenju odluke o sprovođenju adjuvatne hormonske terapije još uvek nije razjašnjen [72,73,75,76]. Stoga je preporuka da se kod svakog novodijagnostikovanog karcinoma dojke izvrši merenje ekspresije ER i PR [77,78].

Status ER i PR kod karcinomima dojke je snažan prediktivni faktor [79]. Tumori sa ER pozitivnim statusom dobro reaguju na endokrinu terapiju: antiestrogene lekove ili estrogenu deprivaciju. U populaciji pacijentkinja kod kojih se postavi dijagnoza ER pozitivnog karcinoma dojke beleži se povoljan odgovor na adjuvantnu hormonsku terapiju, što kao posledicu ima duži vremenski period do pojave relapsa bolesti nakon primarne terapije, duži period preživljavanja nakon pojave relapsa kao i značajno duže ukupno preživljavanje u poređenju sa pacijentkinjama kod kojih se utvrdi prisustvo karcinoma sa ER negativnim statusom. Ako se utvrdi da pored pozitivnog ER statusa postoji i pozitivan PR status, verovatnoća pozitivnog odgovora na hormonsku terapiju iznosi 75-80%, u poređenju sa 55% kod ER pozitivnog i PR negativnog statusa [80,81].

##### 1.2.4.2. Receptor za humani faktor rasta tip 2 (HER2)

HER2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) jeste vrsta receptora epidermalnog faktora rasta čija se ekspresija obavezno meri kod svih novootkrivenih slučajeva invazivnih karcinoma dojke [79]. Sinteza ovog proteina, koji se nalazi na površini tumorskih ćelija karcinoma dojke, kodirana je protoonkogenom *c-erbB2*, lociranim na dugom kraku hromozoma 17 (17q12). Amplifikacijom *HER2/neu* onkogenom, dolazi do prekomerne ekspresije HER2/neu glikoproteina (HER2 receptori) na površini tumorskih ćelija [82]. Prekomerna ekspresija HER2 receptora za posledicu ima pojačanu proliferaciju ćelija, invazivnost i metastaziranje [83]. Ovi efekti posredovani

su aktivacijom MAPK i PI3K/AKT signalnih puteva, kao i deformacijom ćelijske membrane usled čega ćelije karcinoma postaju slabije vezane za susedne ćelije i vanćelijski matriks [84].

Prekomerna ekspresija HER2 receptora beleži se kod oko 15-20% invazivnih karcinoma dojke. Pozitivna ekspresija HER2 receptora češće se sreće kod ER negativnih karcinoma (30% u poređenju sa 12% kod ER pozitivnih karcinoma) [85], ali među HER2 pozitivnim tumorima oko 1/3 su HR negativni (tzv. neluminalni HER2 pozitivni podtip), a oko 2/3 su HR pozitivni tumori (tzv. luminalni HER2 pozitivni podtip) [86].

HER2/neu status se najčešće određuje imunohistohemijski (IHH) pri čemu se određuje broj HER2 proteinskih receptora, a vrednosti mogu da budu označene kao 0, 1+, 2+, ili 3+. HER2 pozitivni karcinomi su karcinomi sa ekspresijom HER2 3+, dok su HER2 negativni karcinomi oni sa ekspresijom HER2 0 ili 1+. Kada je IHH određen HER2 status označen kao „2+“, to znači da je HER2 status nepoznat, te se radi druga analiza kojom se utvrđuje postojanje amplifikacije HER2/neu gena jednom od *in situ* hibridizacija (fluorescentna, hromogena ili silver) [87], koja označava pozitivan HER2 status.

Pozitivan nalaz ekspresije HER2 receptora predstavlja negativan prognostički faktor. Dovodi se u vezu sa agresivnim tokom bolesti, kraćim vremenskim intervalom do pojave recidiva i nižom stopom preživljavanja naročito kod pacijenata sa pozitivnim nalazom u aksilarnim limfnim čvorovima [88,89,90].

HER2 status ima daleko veći značaj kao prediktivni faktor odgovora na ciljanu terapiju, koja je usmerena na blokadu HER2 signalnog puta. Kod pacijentkinja kod kojih se postavi dijagnoza HER2 pozitivnog statusa na raspolaganju stoje ciljani molekularni agensi kao što su trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab emtanzin i lapatinib [91]. S druge strane karcinomi s pozitivnim HER2 statusom pokazuju veću osetljivost na antracikline, a rezistenciju na tamoksifen [11].

### 1.2.4.3. Proliferativni indeks Ki67

Indeks proliferativnosti ćelija predstavlja jedan od široko korišćenih biomarkera karcinoma dojke koji se dovodi u vezu sa lošim ishodom karcinoma [92]. Karcinome kod kojih postoji veća proliferativna aktivnost karakteriše kraći vremenski period do pojave relapsa bolesti i lošije preživljavanje [93].

Ekspresija Ki67 proteina određuje se imunohistohemijskom metodom i beleži se tokom svih faza ćelijskog ciklusa (G1, S, G2 i faza mitoze) izuzev G0 faze. Nivo Ki67 nizak je tokom G1 i S faze, a najviši nivo beleži se tokom faze mitoze [94].

U pogledu prognostičkog značaja ovog parametra postoje neslaganja. Prema EGTM ekspertskom panelu Ki67 može da se koristi u kombinaciji sa drugim prognostičkim faktorima radi određivanja prognoze bolesti posebno u grupama sa niskom (< 10% obojenih ćelija) ili visokom ekspresijom (> 25% obojenih ćelija) [78]. Zbog niske reproducibilnosti testa, formirana je Internacionalna radna grupa za određivanje Ki67 kod karcinoma dojke 2011. godine, ali do danas metoda nije u potpunosti standardizovana [95]. Zbog toga, ASCO (American Society of Clinical Oncology) ne preporučuje korišćenje Ki67 kao prognostičkog faktora kod karcinoma dojke u rutinskoj praksi [77].

Protein Ki67 se takođe ne može smatrati ni samostalnim prediktorom odgovora na terapiju. Primećeno je međutim da se kod pacijentkinja kod kojih postoje karcinomi sa visokim indeksom proliferacije ćelija beleži bolji terapijski odgovor prilikom lečenja taksanima u poređenju sa netaksanskom terapijom, kao i kod lečenja letrozolom u poređenju sa lečenjem tamoksifenom [96].

### 1.3. Molekularni podtipovi karcinoma dojke

Pre dve decenije objavljen je prvi rad gde je urađena genska analiza karcinoma dojke na osnovu koje su tumori dojke bili podeljeni u nekoliko prognostičkih podtipova: luminal A, luminal B, HER2 i bazalni podtip [97]. Kako je genska analiza složen i skup proces u rutinskoj praksi se koristi imunohistohemijska analiza kojom se određuju ovi molekularni markeri na proteinskom nivou, određuju se receptori za estrogen i progesteron i HER2 i na osnovu njihove ekspresije procenjuje podtip tumora. Ove analize ne odslikavaju potpuno verno i podelu koja bi bila zasnovana na genskoj analizi i zbog toga se podtipovi karcinoma dojke zasnovani na ER, PR i HER2 statusu nazivaju surogat markerima ovih podtipova [98]. Podela na podtipove tumora je veoma važna zbog njihovog prediktivnog značaja, što znači da se u lečenju pacijenata sa različitim podtipovima karcinoma dojke primenjuje optimalna terapija za pojedini podtip. Danas postoje sledeće podgrupe prema HR i HER2 statusu:

1. Luminalni A podtip: ER $\geq$ 50% i PR $\geq$ 20% i HER2 negativan, i Ki67 <20% (hormonska terapija je terapija izbora, hemioterapija ima malu, ili nikakvu dodatnu korist)
2. Luminalni B podtip: deli se na dva podtipa:
  - a. Luminalni B/HER2 negativni podtip: ER<50% ili PR neg ili < 20%, Ki67 > 20%
  - b. Luminalni HER2 pozitivni podtip: HR pozitivni (bez obzira na ekspresiju receptora) i HER2 pozitivni, Ki67 bilo koji (uz hormonsku terapiju obavezno se primenjuje i kombinacija hemioterapije i HER2 blokade)
3. Tzv. *basal-like* podtip: ER0 i PR0 i HER2 negativan, bez obzira na Ki67 indeks, tzv. trostruko negativni karcinom dojke (hemioterapija je terapija izbora)
4. Tzv. *HER2 enriched* (neluminalni HER2 pozitivni) podtip: ER0 i PR0 i HER2 pozitivan (terapija izbora je kombinacija hemioterapije i HER2 blokade).

### 1.4. Lečenje ranog karcinoma dojke

#### 1.4.1. Hirurška terapija

Primarno lečenje inicijalno resektabilnog tumora je hirurška terapija kada se sprovodi radikalno odstranjivanje tumora i regionalnih limfnih čvorova. Odstranjivanje tumora vrši se izvođenjem mastektomije ili poštedne operacije kojom se otklanja tumor i margina zdravog tkiva. Poštednom operacijom zadržava se zdravo tkivo dojke, međutim ovakav način hiruškog lečenja nosi sa sobom rizik od relapsa bolesti. Tokom same intervencije sprovodi se *ex tempore* patohistološka analiza odstranjenog tkiva kako bi se potvrdilo da je u potpunosti otklonjeno tkivo karcinoma. Prisustvo ćelija karcinoma na ivici uzorka naziva se pozitivnom hirurškom marginom i dovodi se u vezu sa rizikom od ipsilateralnog relapsa bolesti. Količina tkiva koju treba ukloniti da bi se osigurala negativna margina bila je predmet debate, a posledica takvog stanja su bile česte reoperacije (reekscizija margine ili mastektomija) nakon definitivnog patohistološkog nalaza [99,100]. U meta-analizi Houssami i saradnika utvrđeno je da se učestalost lokalnog relapsa ne razlikuje kod poštedne operacije u slučaju invazivnog karcinoma dojke sa hirurškom marginom od 1 mm, 2 mm ili 5 mm ukoliko se u obzir uzme i primena adjuvantne terapije [101]. Prema Udruženju onkoloških hirurga i Američkom udruženju radijacione onkologije smatra se da je hirurška margina dovoljna kada tumorskih ćelija nema na ivici uzetog uzorka, te da šire margine ne snižavaju značajno rizik od relapsa kada je hirurška terapija udružena sa adekvatnom adjuvantnom terapijom [102].

U slučaju da je poštedna operacija kontraindikovana (pacijentkinje koje ne mogu biti podvrgnute radioterapiji, mutlifokalni karcinomi sa sumnjivim mikrokalcifikatima u više od jednog kvadranta dojke) potrebno je sprovesti mastektomiju pri kojoj se uklanja žlezdano tkivo dojke zajedno sa bradavicom i areolom [103].

Prisustvo ćelija karcinoma u limfnim čvorovima zahteva uklanjanje limfnih čvorova. Aksilarna disekcija limfnih čvorova je radikalnija intervencija koja kod većine pacijentkinja podrazumeva uklanjanje limfnih čvorova nivoa I i II (lateralno i ispod *m. pectoralis minor*) [104]. Komplikacije koje prate aksilarnu disekciju su hematomi, seromi, parestezije, ograničena pokretljivost ruke, povećan rizik od nastanka infekcija, limfedem [105].

Biopsija stražarnih limfnih čvorova je manje invazivna procedura koju prati manje postoperativnih komplikacija i koja se preporučuje kod pacijentkinja sa ranim karcinomima dojke. U ovoj intervenciji identifikuju se stražarni limfni čvorovi ubrizgavanjem radioobeženog koloida i plave boje [106]. Radioaktivnost limfnih čvorova beleži se mobilnom gama-kamerom uz vizuelnu detekciju plave boje u limfaticima. Obično se na ovaj način ukloni 1 do 2 limfna čvora koji se šalju na patološku analizu [104]. U slučaju negativnog nalaza izbegava se uklanjanje većeg broja limfnih čvorova i pojava komplikacija koje prate aksilarnu disekciju limfnih čvorova.

#### 1.4.2. Postoperativna radioterapija

Radioterapija podrazumeva primenu X-zraka radi uklanjanja lokalnog tumorskog tkiva zaostalog nakon hiruške intervencije. Ova vrsta terapije se koristi kod karcinoma dojke u ranom stadijumu nakon poštedne hirurške intervencije, ili nakon mastektomije kod lokalno uznapredovalog karcinoma [107].

Adjuvatna radioterapija cele dojke nakon poštedne hiruške intervencije dovodi do značajnog smanjenja pojave recidiva bolesti u 10-godišnjem periodu (sa 35.0% na 19.3%) i smanjenja karcinom specifičnog mortaliteta u 15-ogodišnjem periodu sa 25.2% na 21.4% [108].

Ova vrsta terapije dovodi do akutnih i odloženih neželjenih dejstava kao što su: opšta slabost, lokalne reakcije kože, limfoedem, fibroza kože dojke. Znatno ređe mogu da se jave i pneumonitis, frakture rebara, kardiotoksičnost i angiosarkom.

Radioterapija zida grudnog koša nakon mastektomije preporučuje se u situacijama kada se kod karcinoma dojke zabeleže sledeće karakterisitke: dijametar tumora veći od 5 cm, zahvaćeno 4 ili više limfnih čvorova pazušne jame, zahvaćena hirurška/resekciona margina ili kada postoji ekstenzivna limfovaskularna invazija. Opsežna SUPREMO klinička studija je ukazala na to da ovakva vrsta terapije 2 godine po završetku lečenja izaziva više simptoma od strane zida grudnog koša u poređenju sa pacijentkinjama koje nisu bile podvrgnute ovoj terapiji, ali je razlika mala i smatra se klinički nerelevantnom. Sama studija je još uvek u toku te uticaj ovakve terapije na 10-ogodišnje preživljavanje još nije poznat [109].

Radioterapijom se tretiraju i supraklavikularni limfni čvorovi kada je kod karcinoma dojke zabeleženo 4 ili više pozitivnih limfnih čvorova u pazušnoj jami [110]. Tretiranje pazušne jame radioterapijom se ne preporučuje zbog povišenog rizika od nastanka limfedema kao neželjenog dejstva terapije. Međutim u AMAROS studiji utvrđeno je da radioterapija pazušne jame pokazuje niži rizik od nastanka limfedema u poređenju sa disekcijom limfnih čvorova pri čemu je terapijski ishod sličan i uporediv. Zabeležena učestalost recidiva u petogodišnjem periodu u predelu pazušne jame iznosila je 0.43% nakon disekcije limfnih čvorova, odnosno 1.19% nakon aksilarne radioterapije [111].

#### 1.4.3. Adjuvantna sistemska terapija: hemioterapija, hormonska terapija, ciljana terapija

Adjuvantna sistemska terapija se primenjuje nakon radikalne hirurške intervencije i ima za cilj da snizi rizike od relapsa bolesti i produži preživljavanje. Vrste sistemske terapije su: hemioterapija, hormonska terapija i ciljana terapija. Nekada se pre operativnog zahvata primenjuje



sistemska terapija preoperativno i naziva se neoadjuvantnom terapijom. Cilj preoperativne terapije je prevođenje neresektabilnog stadijuma bolesti u resektabilni u slučaju postavljanja dijagnoze lokalno odmaklog karcinoma dojke ili smanjivanje veličine tumora u inicijalno resektabilnom stadijumu bolesti radi omogućavanja izvođenja poštedne operacije tumora dojke [110]. Posle neoadjuvantne terapije i hirurške intervencije može se sprovesti postoperativna zračna terapija i adjuvantna sistemska terapija u zavisnosti od biološkog podtipa tumora.

S obzirom na to da svaka od ovih vrsta terapija izaziva određena neželjena dejstva, pre donošenja odluke o vrsti adjuvantne terapije u obzir se uzimaju odnos potencijalne koristi od lečenja i rizik od pojave toksičnosti [112]. Radi lakšeg donošenja odluke o izboru terapije razvijen je i određen broj on-line kalkulatora koristi i rizika poput *Adjuvant!Online* i *PREDICT* koji na osnovu karakteristika pacijenta i tumora predviđaju verovatnoću za recidiv bolesti, stopu mortaliteta u 10-ogodišnjem periodu kao i moguću korist od adjuvantne terapije [113,114]. Pored pomenutih, koji se najčešće koriste, na raspolaganju su i Cancermath.net te FinProg project [115,116].

### 1.4.3.1. Hemioterapija

Prvi rezultati kliničkih studija koji su ukazali na potencijalnu korist od primene hemioterapeutika u lečenju karcinoma dojke pojavili su se 60-ih i 70-ih godina prošlog veka [117,118,119]. Od tog perioda izolovan je ili sintetisan čitav niz lekova koji su u mnogome promenili tok bolesti kod pacijentkinja sa karcinomom dojke.

Meta-analize publikovane od strane EBCTCG ukazale su na podatak da adjuvantna hemioterapija značajno snižava učestalost pojave recidiva bolesti u petogodišnjem periodu (bez značajnijeg uticaja na mortalitet u istom periodu) te takođe utiče na snižavanje stope mortaliteta u 15-godišnjem periodu za 38% (starosti <50 godina) i 20% (starosti 50-69 godina) uz 6-mesečnu antraciklinsku polihemioterapiju). Rezultati su ukazali da uspeh terapije zavisi od starosti pacijentkinje, a u nešto manjem obimu od vrste hemioterapeutika, dodatne upotrebe endokrine terapije te histopatoloških kriterijuma [120].

Danas na raspolaganju stoji čitav niz protokola za lečenje karcinoma dojke hemioterapeutima. U najvećem broju slučajeva sekvencijalno se primenjuju lekovi iz grupa antraciklina i taksana koji predstavljaju najefikasnije grupe citotoksičnih lekova kako za karcinom u ranom stadijumu tako i za karcinom dojke u uznapredovalom stadijumu [121].

Antraciklini predstavljaju hemioterapeutike koji su derivati antibiotika rodomicina B i koji su 50-ih godina prošlog veka izolovani iz G<sup>+</sup> streptomiceta [122]. Doksorubicin, koji se smatra najaktivnijim pojedinačnim citotoksičnim agensom kod metastatskog karcinoma dojke, izolovan je iz *Streptomyces peucetius* [123]. Loša strana ovog leka jeste kardiotoksičnost budući da kod duže upotrebe dolazi do nastanka kongestivne kardiomiopatije. Epirubicin, koji predstavlja epimer doksorubicina jeste srodan lek koji pokazuje značajno manji intezitet kardiotoksičnosti [124,125].

Paklitaksel je prvi lek iz ove grupe izolovan iz kore pacifičke tise (*Taxus brevifolia*) [126]. Mehanizam dejstva paklitaksela zasniva se na inhibiciji mikrotubula (inhibicija depolimerizacije). Ovaj lek karakteriše vrlo slaba rastvorljivost [127,128]. Pored paklitaksela u ovoj grupi nalazi se i polusintetski lek docetaksel koji karakteriše nešto jače inhibitorno delovanje na mikrotubule kao i bolja rastvorljivost [129]. Oba leka prilikom primene pokazuju sklonost ka izazivanju akutnih hipersenzitivnih reakcija usled čega je potrebna premedikacija kortikosteoidima i antihistaminicima [130,131].

Zajednička neželjena dejstva karakteristična za sve vrste hemioterapeutika podrazumevaju promene prvenstveno u tkivima kod kojih postoji ubrzana deoba ćelija te se tako javljaju alopecija i mijelosupresija, sa leukopenijom i neutropenijom. Pored pomenutih javlja se slabost, malaksalost, mukozitis, mučnina, povraćanje itd. Pobjrojana neželjena dejstva javljaju se brzo nakon primene terapije, ali se većina može uspešno prevenirati, a ako se pojave uprkos prevenciji, mogu se uspešno

ublažiti. Odložena neželjena dejstva hemioterapije kod mladih žena, koja mogu imati uticaj na opšte zdravlje su rana menopauza i sekundarna ovarijalna insuficijencija [110].

### 1.4.3.2. Hormonska terapija

Adjuvantna hormonska terapija može da se primeni kod pacijentkinja sa ER pozitivnim karcinomima dojke, što čini 60-80% svih karcinoma dojke [80].

Danas na raspolaganju stoje dve osnovne vrste adjuvantne hormonske terapije:

1. blokiranje dejstva estrogena na nivou ER:
  - a. Selektivni modulatori estrogenskih receptora (engl. *Selective ER Modulators, SERM*) – tamoksifen (kod premenopauznih i postmenopauznih žena)
2. estrogena deprivacija (smanjivanje nivoa estrogena u krvi):
  - a. Inhibitori aromataze (IA) III generacije (anastrozol, letrozol, eksemestan) kod postmenopauznih žena
  - b. ovarijalna ablacija (ovariektomija ili zračna kastracija) ili ovarijalna supresija (primena LHRH analoga, goserelin, triptoorelin ili leuprorelin) kod premenopauznih žena, uvek u kombinaciji sa tamoksifenom ili inhibitorom aromataze.

Oba terapijska modaliteta za cilj imaju eliminaciju efekta estrogena koji se ostvaruje preko ER u tkivu dojke radi sprečavanja tumorske proliferacije posredovane ovim hormonom [132]. Tamoksifen je lek iz grupe SERM koji se kompetitivno sa endogenim estrogenom vezuje za ER. Vezivanjem tamoksifena za ER u tkivu dojke dolazi do efekta suprotnog delovanju estrogena (antagonistički efekat) što za posledicu ima smanjenu proliferaciju tumorskih ćelija [133]. Na drugim tkivima tamoksifen ispoljava parcijalnu agonističku aktivnost što dovodi do proliferativnog efekta na endometrijum i moguće pojave karcinoma endometrijuma. Pored karcinoma endometrijuma neželjena dejstva tamoksifena uključuju vensku trombozu i moguću pojavu plućne embolije [134,135]. Ovaj lek predstavlja dobru terapijsku opciju kako kod pacijentkinja u premenopauzi tako i kod pacijentkinja kod kojih je nastupila menopauza [134].

Kod pacijentkinja u menopauzi sinteza estrogena u ovarijumima ne postoji. Pod dejstvom enzima aromataze u neendokrinih tkivima (potkožno masno tkivo, jetra, mišići, ćelije karcinoma dojke) vrši se konverzija androgena, porekla nadbubrežne žlezde, u estrogene. Inhibitori aromataze blokiraju aromatazu i na taj način smanjuju koncentraciju estrogena u cirkulaciji i tumorskom tkivu odnosno u masnom tkivu dojke [136]. Inhibitori aromataze se mogu koristiti od samog početka adjuvantnog lečenja, ili sekvencijalno rano u periodu praćenja, nakon 2-3 godine uzimanja tamoksifena.

Anastrozol i letrozol su po svojoj strukturi nesteroidni IA koji dovode do reverzibilne inhibicije enzima dok eksemestan pripada grupi steroidnih IA koji dovode do ireverzibilne inhibicije enzima. Ove razlike omogućuju zamenu lekova iz različitih grupa radi postizanja boljeg terapijskog efekta ili umanjenja neželjenih dejstava [137]. Neželjena dejstva koja prate primenu ovih lekova uključuju između ostalog i gubitak mineralne gustine kostiju, artralgiju, hiperholesterolemiju i anginozne tegobe [138].

### 1.4.3.3. Ciljana terapija

Osnov ciljane terapije u karcinomu dojke čini humano monoklonsko antitelo trastuzumab koje je usmereno protiv HER2 transmembranskog receptora kod HER2 pozitivnog karcinoma dojke. Nakon vezivanja trastuzumaba za HER2 receptor pokreće se proces poznat kao ćelijska citotoksičnost zavisna od antitela (engl. *Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*). Deo terapijskog efekta zasniva se i na sprečavanju nastanka p95HER2 24 fragmenta čime se dodatno ograničava prenos

signala za malignu transformaciju. Pored toga dolazi i do nishodne regulacije receptora čime se ograničava signal za dalji rast i deobu uz inhibiciju HER2 posredovane angiogeneze [139]. Efikasnost trastuzumaba u lečenju HER-2 pozitivnog karcinoma dojke potvrđena je u nekoliko velikih kliničkih studija pri čemu primena ovog leka snižava rizik od recidiva bolesti za 45% - 50% [140-143].

Profil neželjenih dejstava trastuzumaba je prihvatljiv, s tim da je potrebno napomenuti da postoji nizak rizik od nastanka srčane disfunkcije i reverzibilne kardiomiopatije. Za razliku od antraciklinskih hemioterapeutika kod kojih nastaje ireverzibilno oštećenje miocita, kardiomiopatija uzrokovana trastuzumabom pokazuje reverzibilni karakter [144].

## 1.5. HR pozitivan HER2 negativan podtip

### 1.5.1. Adjuvantna sistemska terapija

Prema ESMO vodiču HR pozitivni/HER2 negativni karcinomi ubrajaju se u Luminal A i Luminal B (HER2 negativne) tumore. Luminal A podtip karakteriše nizak gradus, jaka pozitivna ekspresija ER/PgR i HER2-negativan status, te niska proliferativna aktivnost. Luminal B tumori su takođe sa ER pozitivnom ekspresijom, ali je ona varijabilnog stepena, takođe su sa HER2- negativnim statusom, ali su višeg gradusa i sa jačom proliferativnom aktivnošću [145,146,147].

Izbor terapije bazira se na analizi većeg broja faktora poput predviđene osetljivosti karcinoma na određenu terapiju, verovatnoće za pojavu recidiva, akutne i hronične toksičnosti terapije, biološke starosti pacijenta, opšteg zdravstvenog statusa, komorbiditeta i lične sklonosti pacijenta. Sa adjuvantnom hemioterapijom treba započeti unutar 3-6 nedelja od hirurške intervencije, s obzirom na to da efikasnost značajno opada ako započne se nakon 12 i više nedelja od hirurške intervencije [148].

Hormonska terapija je terapija izbora kod svih luminalnih karcinoma dojke. S druge strane primena citotoksične adjuvantne terapije zavisi od verovatnoće za pojavu recidiva, biološke agresivnosti (gradus, proliferativnost, vaskularna invazija), predviđenog terapijskog odgovora na endokrinu terapiju. Kod većine luminal A karcinoma hemioterapija ne smanjuje dodatno rizike od relapsa bolesti, te se preporučuje uz adjuvantnu hormonsku terapiju samo u slučaju velikog tumorskog opterećenja (veličina tumora > 5 cm ili > 3 pozitivna regionalna limfna čvora). Radi pomoći u odlučivanju o potrebi za terapijom razvijeno je nekoliko ranije pomenutih alata poput *PREDICT Breast cancer* i *Adjuvant! Online* [113,114].

Kod pacijentkinja u premenopauzi ESMO vodič preporučuje upotrebu tamoksifena u trajanju 5-10 godina. U slučaju da tokom prvih pet godina lečenja tamoksifenom pacijentkinja uđe u menopauzu potrebno je razmotriti zamenu tamoksifena inhibitorom aromataze u zavisnosti od rizika za pojavu kasnog recidiva bolesti. U slučaju pacijentkinja sa karcinomom visokog rizika moguće je terapiju tamoksifenom zameniti lekovima iz grupe inhibitora aromataze uz obaveznu ovarijalnu supresiju primenom LHRH analoga i praćenje nivoa estrogena u krvi [145].

Kod pacijentkinja u menopauzi inhibitori aromataze i tamoksifen se smatraju standardnom terapijom. U ovoj grupi pacijentkinja upotreba tamoksifena se dovodi u vezu sa češćom pojavom neželjenih dejstava poput tromboemboličkih komplikacija, endometrijalne hiperplazije uz nizak rizik od pojave karcinoma endometrijuma, te je posebna pažnja potrebna kod pacijentkinja sa faktorima rizika za nastanak ovih pojava [145].

Inhibitori aromataze primenjeni samostalno u poređenju sa tamoksifenom pokazuju apsolutno povećanje od 4% u stopi preživljavanja bez bolesti, međutim bez značajnije dobiti u stopi ukupnog preživljavanja (1%–2%) [149,150,138]. Primena tamoksifena i inibitora aromataze podrazumeva različite kombinacije, od kombinacije 2-3 godišnje primene tamoksifena potom sekvencijalno inhibitora aromataze do ukupno 5 ili 7 godina, ili kasna sekvencijalna primena do ukupno 10 godina. Adjuvantna primena ovako produžene hormonske terapije najviše snižava rizike od pojave primarnog

tumora kontralateralne dojke, dok je uticaj na snižavanje rizika od udaljenih metastaza, koje imaju najveći uticaj na ukupno preživljavanje, skroman i zavisi od inicijalnog rizika za relaps bolesti [151-157].

U pogledu adjuvantne hemioterapije kod ER pozitivnih HER2 negativnih karcinoma preporuke ESMO nalažu primenu hemioterapije samo kod karcinoma visokog rizika, kao što su tumori > 5 cm, visok histološki gradus tumora, > 3 pozitivna limfna čvora, niži sadržaj ER i/ili PR [145, 158,159]. Najčešće se primenjuje kombinacija antraciklina i ciklofosfamida i, sekvencijalno, taksani, a preporučena dužina primene je 12-24 nedelja (4-8 ciklusa) [155,160].

Sveukupno gledano, primena adjuvantne hemioterapije postiže relativno smanjenje stope mortaliteta od karcinoma dojke za prilično jednu trećinu [120,161]. Donošenje odluke o primeni hemioterapije dodatno može biti olakšano određivanjem nivoa uPA i PAI-1 ili upotrebom eseja za određivanje genske ekspresije kao što su: *MammaPrint*, *Oncotype DX*, *Prosigna*, *Endopredict* ili *Breast Cancer Index*. Ovim esejima moguće je pouzdanije proceniti rizik za pojavu recidiva karcinoma i predvideti potencijalnu korist od hemioterapije [78,162,163].

### 1.5.2. Testovi genskog profilisanja (*Oncotype DX*, *Mammaprint*)

Adjuvantna hormonska terapija je terapija izbora za sve pacijente sa HR pozitivnim HER2 negativnim karcinomima dojke. Međutim, poznato je da neke od ovih pacijentkinja imaju dodatne koristi od primene adjuvantne hemioterapije. U donošenju odluke da li primeniti hemioterapiju oslanjamo se pre svega na klasične prognostičke faktore (veličina tumora i broj pozitivnih limfnih čvorova) i prediktivne faktora (manji skor HR ili visok Ki67) [155]. Međutim, analize pokazuju da ovi parametri nisu dovoljno dobri, te je utvrđeno da na osnovu genskog profilisanja (ekspresija malog broja gena koji ukazuju na proliferativnost tumora) mogu bolje da se identifikuju pacijentkinje koji imaju lošiju prognozu, te je kod njih indikovana i hemioterapija.

#### **Oncotype DX**

*Oncotype DX* je prvi od klinički validiranih eseja za ispitivanje genoma kojim se kod karcinoma dojke predviđa verovatnoća recidiva bolesti i identifikuju pacijenti koji će imati koristi od primene adjuvantne terapije (hemioterapije) [164]. Ovim RT-PCR (engl. *reverse transcriptase – polimerase chain reaction*) esejem ispituje se 21 gen i to 5 referentnih i 16 gena povezanih sa karcinomom dojke koji se dovode u vezu sa ćelijskom proliferacijom, invazivnim rastom i odgovorom na hormonsku terapiju. Testom se dobija tzv. *recurrence score* (RS) koji može imati vrednosti od 1-100, a ukazuje na verovatnoću pojave recidiva unutar 10 godina od postavljanja dijagnoze. U zavisnosti od vrednosti skora pacijenti se svrstavaju u tri kategorije prema riziku od pojave recidiva bolesti – nizak rizik (0-17), umeren rizik (18-30) i visok rizik (31 i više) [164]. Test je validiran retrospektivno kod pacijentkinja koje su bile uključene u NSABP B20 prospektivnu studiju čiji je primarni cilj bio da utvrdi da li postoji razlika u efikasnosti između adjuvantne primene hormonske terapije (TAM) i kombinacije adjuvantne hemioterapije (CMF ili MF) i hormonske terapije u populaciji pacijentkinja sa nodus negativnim HR pozitivnim tumorima [165]. Analiza je pokazala da pacijentkinje sa tumorima sa  $RS \geq 31$  imaju značajnu dodatnu korist od primene hemioterapije, dok u grupi sa  $RS < 11$  ta korist ne postoji. U grupi sa intermedijernim RS, značajna korist od primene hemioterapije nije mogla biti utvrđena, ali nije mogla ni da se isključi.

Validacija testa u grupi nodus pozitivnih pacijentkinja sa HR pozitivnim tumorima urađena je retrospektivno na rezultatima SWOG 8814 studije čiji je primarni cilj bio da utvrdi da li postoji razlika u efikasnosti između adjuvantne hormonske terapije (TAM) i kombinacije hemioterapije (CAF) i hormonske terapije [166]. I ova analiza potvrdila je značajnu korist od dodavanja hemioterapije hormonskoj terapiji kod pacijentkinja sa tumorima sa  $RS \geq 31$ . Prediktivna vrednost testa za dodatnu

korist od dodavanja hemioterapije postoji u prvih 5 godina od operacije, ali nije pokazana za period od 5-10 godina posle operacije.

Vrednost *Oncotype DX* testa ispitivana je u prospektivnoj TAILORx (NCT00310180) studiji faze 3. U studiju su uključivane pacijentkinje sa nodus negativnim, HR pozitivnim i HER2 negativnim tumorima dojke koje su bile lečene samo adjuvantnom hormonskom terapijom (RS<18), samo adjuvantnom hemioterapijom koja je uključivala (različite kombinacije antraciklina i/ili taksana i neantraciklinske režime (RS>25), dok su pacijentkinje sa tumorima RS 18-25 bile randomizovane na samo hormonsku terapiju i kombinaciju hemioterapije i hormonske terapije [167]. Prva analiza pokazala je da pacijentkinje sa niskim RS lečene samo adjuvantnom hormonskom terapijom imaju odličnu prognozu [5-god stopa DFS 93.8% (95% CI 92.4 to 94.9) i 5-god stopa *Distant disease-free survival* (DDFS) 99.3% (95% CI, 98.7 to 99.6)]. Nakon 9 godina praćenja, utvrđeno je da adjuvantna hormonska terapija nije inferiorna u odnosu na adjuvantnu kombinaciju hemioterapije i hormonske terapije kod pacijentkinja sa tumorima sa intermedijernim RS (9-god stopa DDFS 95% prema 94.5%) [168]. Studija je međutim pokazala da bi žene mlađe od 50 godina možda imale koristi od primene adjuvantne hemio-hormonske terapije ako je RS tumora 16-25.

Primena *Oncotype DX* testa dovela je do izmena u terapijskim protokolima i ređe upotrebe adjuvantne hemioterapije naročito kod pacijentkinja sa ER pozitivnim HER2 negativnim i nodus negativnim karcinomima dojke [169,170,171,172,77,78]. Posledično, izostanak primene adjuvantne hemioterapije doneo je uštedu sredstava, te je u nekoliko različitih zemalja utvrđena kost-efektivnost primene *Oncotype DX* testa u slučaju ER pozitivnih HER2 negativnih karcinoma dojke u ranom stadijumu [169].

### **MammaPrint**

*MammaPrint* je kao i prethodno pomenuti *Oncotype DX* više puta validiran test koji se koristi za predviđanje verovatnoće za pojavu recidiva karcinoma dojke kao i za odabir adekvatne terapije kod iste bolesti [173-176]. Za razliku od *Oncotype DX* testa koji u obzir uzima 21 gen, *MammaPrint* test ispituje ekspresiju 70 gena ključnih za karcinom, a rezultat testa svrstava pacijentkinje u 2 grupe – grupa sa niskim, odnosno grupa sa visokim rizikom za recidiv [177].

MINDUCT klinička studija faze 3 u koju je bilo uključeno 6693 pacijentkinja iz 9 evropskih zemalja poslužila je da dokaže kliničku korist *MammaPrint* testa u cilju selekcije pacijenata za lečenje adjuvantnom hemioterapijom, odnosno redukcije upotrebe adjuvantne hemioterapije bez negativnog ishoda po pitanju uspešnosti lečenja [178]. U studiju su uključene pacijentkinje sa nodus negativnim ili nodus pozitivnim (do 3 pozitivna limfna čvora) karcinomima dojke nakon radikalne operacije. Pacijentkinje su bile podeljene prema kliničkim parametrima na grupu sa niskim i grupu sa visokim rizikom od relapsa bolesti i istovremeno na grupu sa genomski niskim i genomski visokim rizikom. Kod pacijentkinja kod kojih se poklopio klinički sa genomskim rizikom za relaps bolesti, lečene su sve samo adjuvantnom hormonskom terapijom (nizak rizik) ili su sve primale kombinaciju hemioterapije i hormonske terapije. Pacijentkinje kod kojih se klinički i genomski rizici nisu poklopili (23.2%) bile su randomizovane na granu sa adjuvantnom hormonskom terapijom i granu sa kombinacijom hemio- i hormonske terapije. Rezultati su pokazali da je 5-godišnja stopa DDFS kod pacijentkinja koje su bile klasifikovane u grupu sa visokim kliničkim i niskim genomskim rizikom lečene samo adjuvantnom hormonskom terapijom, iznosila 94.7% (95% CI 92.5 to 96.2). Uzimajući u obzir da je 46% pacijentkinja sa visokim kliničkim rizikom imalo istovremeno genomski nizak rizik za relaps bolesti, to znači da je vrednost *MammaPrint* testa u tome što skoro 50% pacijentkinja mogu biti pošteđene nepotrebne primene hemioterapije i njenih neželjenih efekata.

Rezultati RASTER prospektivne, multicentrične opservativne studije takođe su potvrdili uticaj rezultata *MammaPrint* testa na izmenu odluke o upotrebi adjuvantne hemioterapije kod oko 50% slučajeva pri lečenju pacijentkinja sa ER pozitivnim, HER2 negativnim karcinomima dojke [175]. Do sličnih rezultata došlo se i u studijama Pohl i sar., te Kuijer i sar. u kojima je takođe zabeležen uticaj *MammaPrint* testa na ređe propisivanje adjuvantne hemioterapije [179,180].

## 1.6. Urokinazni aktivator plazminogena (uPA) i inhibitor aktivatora plazminogena tip 1 (PAI-1)

Karcinom dojke predstavlja najčešći maligni tumor u ženskoj populaciji, pri čemu se kod 25% do 40% karcinoma razvijaju udaljene metastaze [1]. U procesu invazivnog rasta i metastaziranja karcinoma značajnu ulogu imaju proteolitički enzimi. Sistem urokinaznog plazminogen aktivatora (uPA) koji pripada porodici serinskih proteaza najznačajniji je u procesu invazivnog rasta i metastaziranja karcinoma dojke. Ovaj sistem sastoji se iz urokinaznog plazminogen aktivatora (uPA); membranskog receptora za uPA (uPAR), te inhibitora aktivatora plazminogena (PAIs) [181,182].

### 1.6.1. Fiziološka uloga

#### **uPA: Struktura, uloga i mehanizam dejstva**

Urokinazni aktivator plazminogena (uPA) predstavlja dvolančani protein koji se sekretuje u neaktivnom obliku kao zimogen (pro-urokinaza). Jednolančanu pro-urokinazu karakteriše mnogo slabija proteolitička aktivnost [183]. uPA se sastoji iz dva peptidna lanca (A – amino terminalni i B – lanac) koji su povezani disulfidnom vezom. A lanac sadrži epidermalnom faktoru rasta sličan (*EGF-like*) domen koji nosi sve informacije potrebne za vezivanje za uPA receptor, dok lanac B sadrži katalitičko mesto. Aktivacija pro-uPA i nastanak aktivne forme uPA katalizovana je delovanjem plazmina. S druge strane aktivirana uPA prevodi inaktivni plazminogen u aktivnu formu plazmin. Stoga se može reći da između uPA i plazmina postoji pozitivna povratna sprega [184].

Plazmin je proteaza koja se sastoji od dva peptidna lanca povezana disulfidnim vezama. Primarna i najšire poznata uloga plazmina je održavanje prohodnosti krvnih sudova razgradnjom fibrina u trombima. Zahvaljujući sposobnosti da razgrađuje i druge supstrate plazmin u organizmu poseduje i fiziološke funkcije poput razgradnje ekstraćelijskog proteinskog matriksa čime se omogućuje migracija ćelija i procesi poput embriogeneze, zarastanja rana, angiogeneza. Plazmin se takođe dovodi u vezu i sa patološkim procesima poput onkogeneze i diseminacije, metastaziranja tumora [185,186,187].

uPA ispoljava svoje proteolitičko delovanje nakon vezivanja za odgovarajući uPA receptor (uPAR), za koji se pored uPA sa velikim afinitetom vezuju se pro-uPA kao i ECM (ekstra celularni matriks) protein vitronektin. uPAR je ekstraćelijski glikoprotein (55-60 kDa), sastavljen iz 3 homologna domena (D1,D2,D3), pri čemu je poslednji preko glikozil fosfatidil inozitola vezan za ćelijsku membranu [188,189]. U procesu vezivanja uPa za uPAR segment D1 je najbitniji za uspešnu interakciju [190].

Vezivanjem uPA za uPAR dolazi do aktivacije čitavog niza signalnih molekula između ostalog i ekstraćelijski regulisane kinaze (ERK)/mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK). Aktivacijom ovih proteina dolazi do promena u proliferaciji ćelija, adheziji ćelija i metastaziranju [191].

#### **Unutrašnji inhibitori uPA**

Aktivacija uPA može biti inhibisana dejstvom inhibitora aktivatora plazminogena 1 i 2 (PAI-1, PAI-2), pri čemu je dominantniji uticaj PAI-1 [192]. PAI-1 nastaje u ćelijama strome koje okružuju tumorske ćelije i to u endotelnim ćelijama, megakariocitima i ćelijama glatkih mišića, a skladišti se u trombocitima [193,194]. Ovaj molekul vezuje se za aktivni oblik uPA pri čemu nastaje kompleks uPAR-uPA-PAI-1. Nakon vezivanja za uPA dolazi do internalizacije čitavog kompleksa. Unutar ćelije lizozomi razgrađuju uPA-PAI-1 kompleks, a uPAR se reciklira i vraća na površinu ćelije [183,195,196]. PAI-1 pokazuje selektivnost prema aktivnom obliku uPA, s obzirom na to da ne deluje na pro-uPA [197].

### 1.6.2. Značaj u rastu i širenju tumora

Pored prevođenja plazminogena u plazmin, smatra se da uPA katalizuje aktivaciju i drugih metaloproteinaza čime se se pokreće proteolitička aktivnost koja omogućuje invaziju tumorskih ćelija u krvne sudove i njihovo rasejavanje te rast na mestu metastaziranja [198,199]. Vezivanjem uPA za uPAR dolazi do pokretanja ćelija usled proteolize ekstraćelijskog matriksa, a time i invazije tumorskih ćelija, hemotakse, ćelijske adhezije i angiogeneze [188,200]. Prekomerna ekspresija uPAR nije karakteristika samo karcinoma dojke već se beleži i kod drugih karcinoma poput karcinoma jajnika, pluća, želuca, kolona, jetre i to ne samo kod ćelija karcinoma već i kod endotelnih ćelija, makrofaga i fibroblasta [201]. Na kulturi ćelija karcinoma kolona utvrđeno je da je invazija tumorskih ćelija u direktnom odnosu sa brojem uPA-uPAR kompleksa, odnosno broja receptora za koje je na površini ćelija vezana uPA [202].

Vezivanjem uPA za uPAR, kao što je ranije pomenuto dolazi do aktivacije čitavog niza signalnih molekula koji moduliraju proliferaciju ćelija, adheziju ćelija i metastaziranje [191].

Uloga PAI-1 u biologiji tumora je dvojaka. Internalizacijom kompleksa uPA-uPAR PAI-1 deluje povoljno u smislu inhibicije invazije i metastaziranja tumorskih ćelija. Međutim postoje istraživanja koja ukazuju na to da ovaj molekul pokazuje i potpuno suprotan efekat pospešujući rast i diseminaciju tumora koji se zasniva na moduliranju ćelijske adhezije, uticaju na angiogenezu kao i stimulisanju ćelijske profliacije [183,203].

### 1.6.3. Prognostički i prediktivni značaj u karcinomu dojke

uPA i PAI-1 su proteinski molekuli koji su neizostavni deo u procesu invazivnog rasta i metastaziranja malignih tumora [198]. Nivo ovih molekula povišen je u malignom tkivu u poređenju sa nivoom u benignim lezijama i zdravom tkivu dojke [204]. Oba molekula bila su predmet ispitivanja u pogledu mogućnosti korišćenja u prognostičke i prediktivne svrhe kod karcinoma dojke. Prvi rezultati koji upućuju na značaj ovih molekula publikovani su u studiji Duffy [203]. Zabeleženo je, a kasnije i potvrđeno, da povišen nivo uPA u primarnom karcinomu može da bude udružen sa lošijom prognozom kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke u odnosu na pacijentkinje sa niskim vrednostima [205,206]. Veći broj studija potvrdio je ove rezultate i ukazao na mogućnost upotrebe uPA i PAI-1 kao nezavisnih prognostičkih parametara kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke [207-211].

Pokazano je da je uPA nezavisni faktor prognoze u odnosu na klasične prognostičke faktore raka dojke, kao što su veličina i gradus tumora, status aksilarnih limfnih nodusa u proceni rizika od relapsa bolesti, te da predstavlja snažniji prognostički faktor u poređenju sa tradicionalno korišćenim prognostičkim faktorima (estrogen i progesteron receptorski status, HER2, EGFR, p53 i Nottingham Index), naročito ako se radi o nodus-negativnim karcinomima dojke [182,203].

Uzimajući u obzir mehanizam delovanja PAI-1 očekivano bi bilo pretpostaviti da su visoki nivoi ovog molekula u tumorskom tkivu u korelaciji sa niskom verovatnoćom za nastanak metastaza i dobrim ishodom bolesti. Međutim, kao što je napomenuto ranije, visoki nivoi PAI-1 u karcinomu dojke se povezuju sa lošim ishodom bolesti [183,203].

Veći prognostički značaj dobija se kada se oba parametra koriste zajedno (uPA i PAI-1) u poređenju sa pojedinačnom upotrebom uPA i PAI-1 [212]. Povišen nivo oba parametra smatra se znakom koji upućuje na lošu prognozu oboljenja [213]. Kod pacijentkinja sa nodus-negativnim statusom karcinoma nizak nivo uPA i PAI-1 ukazuje na izuzetno dobru prognozu oboljenja sa petogodišnjim preživljavanjem bez relapsa (engl. *disease free survival* – DFS) od preko 90% čak i bez adjuvantne sistemske terapije [214]. Očekivano, visok nivo oba parametra ukazuje na kraći period do relapsa oboljenja kao i nižu stopu ukupnog preživljavanja [209,215].

Oba parametra, uPA i PAI-1, imaju značajno mesto u procesu odlučivanja o izboru adekvatne terapije kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke. Visoke koncentracije oba molekula kod pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova ukazuju da će pacijentkinje imati koristi od primene adjuvantne hemioterapije, dok kod pacijentkinja sa niskim vrednostima pomenutih markera nije potrebna adjuvantna terapija čime se izbegava nepotrebna pojava neželjenih dejstava i smanjuju troškovi lečenja [203].

U pogledu različitih vrsta adjuvantne sistemske terapije u studiji Foekens i sar., utvrđeno je da se kod pacijentkinja sa uPA negativnim karcinomima beleži bolji terapijski odgovor na tamoksifen u poređenju sa pacijentkinjama sa uPA pozitivnim karcinomima. Visok nivo PAI-1 ima nešto slabiji prediktivni značaj, ali se takođe povezuje sa slabijim terapijskim odgovorom kod primene tamoksifena [216].

Takođe, Harbeck i sar. su utvrdili da nivo uPA/PAI-1 ima prediktivni značaj odgovora na antraciklinsku hemioterapiju: značajno bolji odgovor kod tumora sa visokim, u poređenju sa tumorima sa niskim nivoima oba markera [162].

Merenje vrednosti uPA i PAI-1 se danas standardno preporučuje u procesu određivanja prognoze bolesti i odabira adekvatne terapije, naročito kod pacijentkinja sa nodus negativnim statusom karcinoma [77,78].

#### 1.6.4. *PAI-1* gen i polimorfizam (inserciono/delecioni polimorfizam na poziciji -675 bp promotorske regije gena *PAI-1*)

Urokinaza plazminogen aktivator (uPA) sistem uključen je u čitav niz procesa u ljudskom organizmu uključujući i metastaziranje i invazivni rast malignih tumora pre svega tako što razgrađuje bazalnu membranu i ekstraćelijski matriks [188,200]. Inhibitor aktivatora plazminogena tipa 1 (PAI-1) jeste protivteža uPA, odnosno kontrolni mehanizam koji reguliše aktivnost uPA i koji takođe ima značajnu ulogu u progresiji karcinoma kontrolišući ćelijsku adheziju i migraciju ćelija [183,203]. U doznazavisnom odnosu ovaj molekul učestvuje u modulaciji rasta karcinoma, invazivnom ponašanju i angiogenezi [217].

Gen za sintezu PAI-1 nalazi se na hromozomu 7 (7q21.3-q22.1) i smatra se da polimorfizam u *PAI-1* genu utiče na intenzitet sinteze i nivo PAI-1 u organizmu [218]. Insercija/delecija jednog nukleotida (guanozina) opisana kao 4G/5G polimorfizam na poziciji -675 bp (bazni par – bp) jeste najčešće izučavana zbog pretpostavljenog uticaja na transkripciju *PAI-1* [219,220,221]. Frekvencija 4G/5G alela varira u različitim populacijama od 26.7/73.3% do 52.5/47.5% [222]. U populaciji zdravih osoba u Srbiji frekvencija 4G alela je 58%, a 5G alela 42%. U studiji Đorđević i sar., kod 19.05% ispitanika utvrđen je 5G/5G genotip, 46.19% su heterozigotni nosioci 4G/5G genetičke varijante, dok je kod 34.76% ispitanika utvrđen 4G/4G genotip [223].

Fiziološki nivo transkripcije vezuje se uz alelsku varijantu 5G koja sadrži vezujuća mesta za aktivator i represor transkripcije, dok se 4G alelska varijanta dovodi u vezu sa višim nivoma PAI-1 u plazmi s obzirom da vezuje samo aktivator [224]. Osobe homozigoti za alel 5G imaju za oko 25% niže vrednosti PAI-1 u plazmi u poređenju sa osobama koje su homozigoti za alel 4G [225]. Slični rezultati publikovani su u studiji Castello i sar. [226].

Međutim dostupne su i studije sa potpuno oprečnim navodima što upućuje na nekonzistentnost rezultata [227,228]. Među studijama koje su sprovedene sa ciljem utvrđivanja povezanosti između 4G/5G polimorfizma i karcinoma dojke takođe postoje neusaglašenosti. U studiji Zhang i sar. rezultati ukazuju da je kod pacijentkinja sa karcinomom dojke koje su 4G homozigoti za *PAI-1* značajno skraćen period preživljavanja bez bolesti kao i ukupno preživljavanje u poređenju sa pacijentkinjama koje su 5G homozigoti [229]. Nasuprot ovim rezultatima u studiji Lei i sar. utvrđeno



je da je kod pacijentkinja koje su 5G homozigoti period ukupnog preživljavanja kraći u poređenju sa pacijentkinjama kod kojih je utvrđen 4G/4G i 4G/5G *PAI-1* genotip [230].

Oprečni rezultati studija mogu biti posledica nedostataka pojedinačnih studija, ali definitivno ukazuju na potrebu za sprovođenjem dodatnih istraživanja kako bi se razrešile nedoumice u pogledu uticaja 4G/5G polimorfizma na ishod bolesti.

### 1.6.5. Preporuke za određivanje biomarkera kod luminalnih HER2 negativnih karcinoma dojke

Prema ESMO vodičima u slučaju luminal-B ER pozitivnih HER2 negativnih karcinoma dojke odluku o primeni adjuvantne hemioterapije treba doneti nakon procene rizika od pojave recidiva bolesti. Kao pomoć u odlučivanju ESMO vodič preporučuje određivanje ekspresije uPA-PAI-1 ili primenu genskih eseja poput *MammaPrint*-a ili *Oncotype DX*. Vodič dozvoljava upotrebu i drugih genskih eseja poput *Prosigna*, *Endopredict* ili *Breast Cancer Index* [145].

Slične preporuke mogu se naći u i EGTM vodiču koji predlaže upotrebu pomenutih biomarkera ne samo kod nodus negativnih ER pozitivnih HER2 negativnih karcinoma, već i u slučaju nodus pozitivnih karcinoma kada je broj zahvaćenih limfnih čvorova između 1 i 3 [78].

EGTM preporučuje da *Oncotype DX* test može da obezbedi dodatnu vrednost postojećim faktorima u proceni neophodnosti adjuvantne hemioterapije kod nodus negativnih, ER pozitivnih i HER2 negativnih invazivnih karcinoma dojke, te kod pacijentkinja sa HER2 negativnim, ER pozitivnim karcinomima kada su zahvaćena 1-3 limfna čvora [78]. Za razliku od EGTM *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) predlaže upotrebu ovog testa samo kod nodus negativnih, ER pozitivnih, HER2 negativnih karcinoma dojke [231].

Prema EGTM vodičima *MammaPrint* test može da se koristi za određivanje prognoze bolesti i odlučivanje o potrebi za primenom adjuvantne hemioterapije kod pacijentkinja sa novootkrivenim invazivnim karcinomom dojke koji je nodus negativan ili nodus pozitivan sa 1-3 zahvaćena limfna čvora. Pacijentkinje koje se prema kliničkim i patološkim kriterijumima klasifikuju kao pacijentkinje visokog rizika, a prema *MammaPrint* testu niskog rizika mogu biti kandidati kod kojih neće biti primenjena adjuvantna hemioterapija [78]. Slične preporuke date su i najnovijim ASCO vodičima [231].

Iako vodiči u suštini izjednačavaju upotrebu eseja genske ekspresije i određivanje ekspresije uPA i PAI-1 bitno je napomenuti da je poslednje pomenuti test dosta jednostavniji za izvođenje, a i jeftiniji, iako je za oba testa genske ekspresije utvrđeno da postoji kost-efektivnost. Dok se kod najčešće korišćenih testova genske ekspresije koriste RT-PCR (*Oncotype DX*) odnosno *DNA-microarray* (*MammaPrint*) kod uPA PAI-1 meri se nivo dva proteina ELISA metodom što predstavlja daleko jednostavniju i manje zahtevnu tehniku [176].

Pokazalo se da određivanje intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 kod luminalnih tumora predstavlja prognostički faktor: što je viši nivo oba markera to je lošija prognoza bolesti. Istovremeno pokazana je njihova prediktivna vrednost u predviđanju pozitivnog odgovora na antraciklinsku hemioterapiju u poređenju sa CMF hemioterapijom. Međutim, prema našim saznanjima do sada nije urađena analiza povezanosti nivoa uPA/PAI-1 na prognozu kod pacijentkinja sa nodus negativnim luminalnim HER2 negativnim tumorima lečenih adjuvantnom hormonskom terapijom koje imaju najbolju prognozu.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja bili su sledeći:

1. Ispitivanje povezanosti koncentracije uPA i PAI-1 proteina sa klasičnim faktorima prognoze: veličinom tumora, gradusom tumora, procentom ER i Ki67 u grupi pacijentkinja dijagnostikovanih u prvom i drugom stadijumu bolesti, sa HR-pozitivnim i HER2-negativnim karcinomima dojke koji se nije proširio u regionalne limfne čvorove (nodus negativna grupa);
2. Ispitivanje prognostičke vrednosti klasičnih faktora prognoze (veličina tumora, gradus tumora, procenat ER i Ki67) u grupi pacijentkinja dijagnostikovanih u prvom i drugom stadijumu bolesti, sa HR-pozitivnim i HER2-negativnim karcinomima dojke koji se nije proširio u regionalne limfne čvorove (nodus negativna grupa);
3. Ispitivanje prognostičke vrednosti tumorske koncentracije uPA/PAI-1 proteina u grupi pacijentkinja dijagnostikovanih u prvom i drugom stadijumu bolesti, sa HR-pozitivnim i HER2-negativnim karcinomima dojke koji se nije proširio u regionalne limfne čvorove (nodus negativna grupa);
4. Određivanje graničnih vrednosti koncentracije uPA/PAI-1 proteina koji daju najbolji odnos senzitivnosti i specifičnosti za prognozu relapsa karcinoma dojke, u grupi pacijentkinja dijagnostikovanih u prvom i drugom stadijumu bolesti, sa HR-pozitivnim i HER2-negativnim karcinomima dojke koji se nije proširio u regionalne limfne čvorove (nodus negativna grupa);
5. Ispitivanje povezanosti 4G/5G inserciono/delecionog polimorfizma na poziciji -675 promotorske regije *PAI-1* gena sa preživljavanjem bez znakova bolesti (*disease-free survival* - DFS), ukupnim preživljavanjem (*overall survival* - OS) i preživljavanjem bez pojave relevantnog događaja (*event-free survival* – EFS).

### 3. PACIJENTI I METODE

Istraživanje je dizajnirano po tipu kohortne studije.

U istraživanje je uključena 81 pacijentkinja koje su u periodu od 2010. do 2012. godine ispunile sve kriterijume za uključivanje u istraživanje. Kriterijumi za uključivanje u istraživanje su bili sledeći: patohistološki dokazan HR-pozitivni i HER2–negativni karcinom dojke, čiji je sveži smrznuti uzorak uskladišten u banci tumora IORS-a, urađeno hirurško odstranjenje tumora i regionalnih limfnih čvorova, sa ili bez sprovedene postoperativne zračne terapije, patohistološki određena veličina primarnog tumora dojke do 5 cm (pT1-2), bez patohistološki dokazanih metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (pN0), sprovedena adjuvantna hormonska terapija tokom 5 godina posle operacije.

Sve pacijentkinje su dale pisanu saglasnost za uzimanje uzorka biološkog materijala za banku tumora i učešće u istraživanjima.

Sve pacijentkinje su praćene posle završenog inicijalnog lečenja prema protokolima za praćenje pacijentkinja sa dijagnozom karcinoma dojke koji uključuje: kliničke preglede u polugodišnjim intervalima, kontrolnu mamografiju jednom godišnje, laboratorijske analize jednom godišnje, druge preglede po potrebi, a prema opštem stanju pacijentkinje. Podaci o ishodu bolesti dobijeni su iz njihovih istorija bolesti. Ishod bolesti definisan je vremenom do pojave događaja na sledeći način:

- preživljavanje bez znakova bolesti – DFS (engl. *disease-free survival*): vreme od operacije do pojave lokoregionalnog recidiva i/ili udaljenih metastaza i/ili primarnog tumora suprotne dojke;
- ukupno preživljavanje – OS (engl. *overall survival*): vreme od operacije do smrtnog ishoda, bez obzira na njegov uzrok;
- preživljavanje bez događaja – EFS (engl. *event-free survival*): vreme od operacije do pojave lokoregionalnog recidiva i/ili udaljenih metastaza i/ili primarnog tumora suprotne dojke i/ili drugog primarnog tumora drugih organa ili smrtnog ishoda bez obzira na njegov uzrok.

Klasični faktori prognoze određeni su nakon operacije tumora: veličina tumora prema pT kriterijumima, gradus tumora prema Scarf/Bloom/Richardson kriterijumima.

#### 3.1. Određivanje nivoa ekspresije ER, PR, HER2 i Ki67 - Imunohistohemijska analiza (IHH)

Nivo ekspresije ER, PR, HER2 i Ki67 određen je imunohistohemijskim (IHH) bojenjem isečaka tumorskog tkiva fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafinu. Granične vrednosti za utvrđivanje pozitivnog statusa hormonskih receptora (*Allred score*) za ER i PR bile su 3–8 [232]. Antitela korišćena za IHH bojenje bila su: anti-humano ER $\alpha$  (klon SP1, 1:200 razblaženje; LabVision), anti-humano PR (klon PgR 636, 1:500 razblaženje; Dako) i anti-humano HER2 (klon CB11, 1:800 razblaženje; Novocastra). Negativan HER2 status je definisan kao IHC 0, IHC 1+ i IHC 2+/CISH (hromogen *in situ* hibridizacija – engl. *chromogen in situ hybridization*) – negativni tumori [233]. Ki67 je određivan pomoću Lab-Vision monoklalnog antitela (klon SP6, razblaženje 1:200). Za vizuelizaciju je korišćen *ULTRA vision detection system* (RTU, ready for use, Lab Vision). Granična vrednost za nizak Ki67 proliferativni indeks bila je Ki67 (u) manje od 15% ćelija karcinoma dojke.

### 3.2. Određivanje koncentracije uPA i PAI-1 ELISA testom

Koncentracije uPA i PAI-1 u tumorskim tkivima određene su komercijalno dostupnim ELISA testom (FEMTELLE<sup>®</sup>, Sekisui Diagnostics). Proteinski ekstrakti tkiva pripremljeni su homogenizacijom smrznutih uzoraka tumorskog tkiva u TBS puferu (engl. *Tris Buffered Saline*) homogenizatorom *Ultra Turrax*. Deterdžent Triton-X 100 je dodat homogenatima tkiva u konačnoj koncentraciji od 1% nakon čega su uzorci inkubirani na šejkeru u trajanju od 16 h na temperaturi od 4 °C. Nakon inkubacije, ekstrakti su centrifugirani brzinom od 16,000 g u trajanju od 1 h na temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja odvojen je proteinski ekstrakt (supernatant) koji je zamrznut i čuvan na temperaturi od -20 °C do analiziranja. Koncentracija ukupnih proteina u ekstraktima tumorskog tkiva merena je pomoću *Pierce<sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, kataloški broj 23227). Određivanje koncentracije uPA i PAI-1 u ekstraktima tumorskog tkiva vršeno je pomoću FEMTELLE<sup>®</sup> uPA/PAI-1 ELISA, prema uputstvu proizvođača (Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, USA, ref. 899). Razblaženi rastvori ekstrakata tumorskog tkiva, kontrolni uzorci i uPA ili PAI-1 standardi dodati su u obložene mikrobunare. Ploče sa mikrobunarima su inkubirane tokom noći na temperaturi od 8 °C. Nakon ispiranja, u mikrobunare su dodata antitela za detekciju, a potom su ploče inkubirane u trajanju od 1h na sobnoj temperaturi. U sledećem koraku ploče su isprane, a uPA ili PAI-1 enzimski konjugat je dodat u mikrobunare. Nakon inkubacije u trajanju od 1h, ploče su isprane i TMB supstrat rastvor je dodat u svaki mikrobunar. Ploče su inkubirane u trajanju od 20 min nakon čega je enzimaska reakcija zaustavljena dodavanjem H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 450 nm korišćenjem Multiskan EX Thermo Labsystems čitača. Svi uzorci su analizirani u duplikatu. Standardne referentne granične vrednosti za uPA i PAI-1 su bile 3 ng/mg proteina za uPA i 14 ng/mg proteina za PAI-1 [209].

### 3.3. Izolacija DNK

Tumorska DNK uspešno je izolovana iz 79 sveže zamrznutih uzoraka tkiva karcinoma dojke metodom izolovanja. Inicijalna disrupcija i digestija ćelija izvedena je SDS–proteinazom K, nakon čega je dodata visoka koncentracija soli (6M natrijum hlorid). Nakon odbacivanja proteina, DNK je ekstrahovana i istaložena etanolom. Koncentracija i čistoća izolovane DNK utvrđena je spektrofotometrijski (Nanodrop, Shimadzu).

### 3.4. Detekcija genetičkih varijanti - PCR-RFLP analiza

Detekcija genetičkih varijanti urađena je pomoću klasične metode analize dužine restrikcionih fragmenata - RFLP (engl. *restriction fragment length polymorphism*).

Inserciono/delecioni polimorfizam na poziciji -675 bp promotorske regije *PAI-1* gena (-675 4G/5G) je određivan korišćenjem sledećih prajmera: uzvodni 5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3' i nizvodni 5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3' čime su dobijeni PCR produkt od 98 bp za 4G alel i PCR produkt od 99 bp za 5G alel. Reakcije umnožavanja izvođene su pri sledećim uslovima: početna denaturacija na temperaturi od 94 °C u trajanju od 5 min, zatim 40 ciklusa: na 94 °C 30 s, na 56 °C 30 s, na 72 °C 30 s te završna elongacija 10 min na temperaturi od 72 °C. Produkti PCR reakcije proveravani su elektroforezom na 2% agaroznom gelu, a zatim digestirani sa *BsII* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) restrikcionim enzimom prema uputstvima proizvođača. Fragmenti digestije su razdvojeni u 8% poliakrilamidnom gelu. Veličina restrikcionog fragmenta *PAI-1* (-675) 5G alela bila je 77-bp, a *PAI-1* (-675) 4G alela 98-bp.

### 3.5. Statistička analiza

U statističkoj obradi podataka korišćeni su metodi deskriptivne i analitičke statistike. Za ispitivanje normalnosti raspodele podataka korišćeni su Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testovi. Nominalne i ordinalne varijable opisane su raspedelom učestalosti njihovih kategorija, a merne varijable merama centralne tendencije i merama varijabiliteta. U okviru analitičke statistike korišćeni su parametarski i neparametarski testovi u zavisnosti od distribucije varijabli. Od parametarskih testova razlike korišćeni su T-test i ANOVA test, a od neparametarskih testova Kruskal-Volisov test, Wilcoxon rank sum test, Men-Vitnjev U test, Fišerov test i  $\chi^2$  test. Analiza povezanosti procenjivana je u zavisnosti od prirode posmatranih varijabli na osnovu koeficijenata korelacije Pirsonovog ili Spirmanovom testa korelacije ranga. U analizi vremena do pojave događaja kojim su definisani ishodi lečenja bolesti (DFS, OS, EFS) korišćene su analize preživljavanja (Kaplan-Meier metoda, medijana i 95% interval poverenja). Za ispitivanje diskriminativnog potencijala intratumorskih nivoa uPA i PAI-1 za prognozu pojave događaja kojim je definisan EFS korišćene su ROC (*Receiver Operating Characteristics curve*) metode koje uključuju: površinu ispod ROC krive (*area under the ROC curve* - *AUC ROC* prema DeLongovom metodu) i Likelihood ratio test za AUC ROC. Pomoću ROC metode određene su granične (*cut-off*) vrednosti nivoa oba markera sa najboljom senzitivnošću i specifičnošću. Vrednost  $p < 0,05$  korišćena je kao kriterijum značajnosti, a Bonferroni korekcija za multipla poređenja.

Statistička analiza izvršena je pomoću statističkog programa R (verzija 3.3.2 (2016-10-31) -- "Sincere Pumpkin Patch"; Copyright (C) 2016 The R Foundation for Statistical Computing; Platform: x86\_64 -w64-mingw32/x 64 (64-bit); downloaded: January 21, 2017).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakteristike ispitivane grupe, oboljenja i ishod lečenja

#### 4.1.1. Karakteristike ispitivane grupe

U istraživanje je ukupno uključena 81 pacijentkinja, srednje životne dobi od 66 godina (opseg 36 – 82). Sve, osim 2 pacijentkinje, bile su postmenopauzne. Karakteristike uključenih pacijentkinja prikazane su na Tabeli 4.

*Tabela 4. Opšte karakteristike pacijentkinja*

<b>Karakteristike</b>	<b>N (%)</b>
<b><i>Životna dob (godine)</i></b>	
Medijana (opseg)	66 (36-82)
Prosek (SD)	65.6 (10.58)
<b><i>Menopauzni status</i></b>	
Premenopauzne	2 (2.5)
Postmenopauzne	79 (97.5)
<b>Ukupno</b>	<b>81 (100)</b>

#### 4.1.2. Karakteristike bolesti

Pedeset i šest posto pacijentkinja dijagnostikovano je u stadijumu 2, 71/81 (88%) su imale tumore do 30 mm, a 67/81 (83%) pacijentkinja imale su intermedijerni gradus tumora (gradus 2). Sve pacijentkinje su bile klinički (fizikalni i UZ pregled) bez patološki palpabilnih limfnih čvorova u istostranoj aksilarnoj regiji, s tim što je to kod većine [77/81(95.06%)] bilo i patohistološki (PH) potvrđeno. Kliničke i PH karakteristike tumora prikazane su na Tabeli 5.

Tabela 5. Kliničke i patohistološke karakteristike tumora

<b>Karakteristike</b>	<b>N (%)</b>
<b>Stadijum bolesti na dg</b>	
Stadijum 1	36 (44.44)
Stadijum 2	45 (55.56)
<b>Pato-histološki nalaz</b>	
Duktalni invazivni	36 (44.44)
Lobularni invazivni	36 (44.44)
Drugi	9 (11.12)
<b>Veličina tumora</b>	
≤ 20 mm	34 (41.98)
20-30 mm	37 (45.68)
> 30 mm	9 (11.11)
Nepoznato	1 (1.23)
<b>Gradus tumora</b>	
Gradus 1	11 (13.58)
Gradus 2	67 (82.72)
Gradus 3	3 (3.70)
<b>Nodusni status</b>	
Nodus-negativni	77 (95.06)
Nodus-pozitivni	-
Nepoznato*	4 (4.94)

\*klinički nodus-negativne

Sve pacijentkinje su imale pozitivni združeni status ER i PR, s tim što je 80/81 (98.7%) imalo ER-pozitivne/PR-pozitivne ili ER-pozitivne/PR-nepoznate tumore, a 1/81 (1.3%) je imala ER-negativni/ PR-pozitivni status tumora. Proliferativni indeks Ki67 određen je kod 51/81 (62.9%) od kojih je 22/81 (22.16%) imalo nizak proliferativni indeks, a medijana za celu grupu je iznosila 25% (opseg 3%-90%). U našoj ispitivanoj grupi polovina pacijentkinja [40/81 (49.38%)] imala je intratumorsku koncentraciju uPA iznad 3 ng/mg proteina, a 49/81 (60.49%) PAI-1 iznad 14 ng/mg proteina. Značajno veći broj pacijentkinja imao je ili oba markera niskih (37.04%) ili visokih nivoa (46.91%) u poređenju sa pacijentkinjama koje su imale jedan marker niskih, a drugi visokih koncentracija (13.58% je imalo uPA nizak/PAI-1 visok, a 2.47% uPA visok/PAI-1 nizak intratumorski nivo) (Fisher exact test,  $p < 0.0001$ ). Receptorski status i intratumorska koncentracija uPA i PAI-1 prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6. Statusi hormonskih receptora (HR) i HER2 status i nivoi tumorskog uPA i PAI-1

<b>Karakteristike</b>	<b>N (%)</b>
<b>ER status</b>	
ER-pozitivni	80 (98.77)
ER-negativni	1 (1.23)
<b>PR status</b>	
PR-pozitivni	51 (62.96)
PR-negativni	4 (4.94)
PR-nepoznato	26 (32.10)
<b>HER2 status</b>	
HER2-pozitivni	-
HER2-negativni	81 (100)
<b>Ki67 status (%)</b>	
Srednja vrednost (SD)	26.76 (20.44)
Medijana (opseg)	25 (3-90)
Ki67 < 15%	22 (27.16)
Ki67 ≥ 15%	29 (35.80)
Ki67 nepoznat	30 (37.04)
<b>uPA (ng/mg proteina)</b>	
Srednja vrednost (SD)	4.37 (3.9)
Medijana (opseg)	3 (0.1-18.7)
uPA ≤ 3	41 (50.62)
uPA > 3	40 (49.38)
<b>PAI-1 (ng/mg proteina)</b>	
Srednja vrednost (SD)	21.47 (18.89)
Medijana (opseg)	16 (0-140)
PAI-1 ≤ 14	32 (39.51)
PAI-1 > 14	49 (60.49)
<b>uPA/PAI-1 kombinacije</b>	
uPA ≤ 3/PAI-1 ≤ 14	30 (37.04)
uPA ≤ 3/PAI-1 > 14	11 (13.58)
uPA > 3/PAI-1 ≤ 14	2 (2.47)
uPA > 3/PAI-1 > 14	38 (46.91)

#### 4.1.3. Način i ishod lečenja

Kod 46/81 (44.44%) pacijentkinja urađena je radikalna mastektomija, kod 41/81 (50.62%) poštedna operacija dojke uz disekciju regionalnih limfnih čvorova u istostranoj aksilarnoj regiji, dok je kod 4/81 (4.94%) urađena široka tumorektomija. Kod svih pacijentkinja kod kojih nije urađena radikalna mastektomija, sprovedena je i postoperativna RT [45/81 (55.56%)]. Sve pacijentkinje primale su samo adjuvantnu hormonsku terapiju i to: [70/81 (86.42%)] samo tamoksifen tokom 5 godina, [2/81 (2.47%)] LHRH analog goserelin uz tamoksifen, a [9/81 (11.11%)] je primalo i inhibitore aromataze III generacije sekvencijalno posle primene tamoksifena. Na Tabeli 7 prikazan je način lečenja ispitivanih pacijentkinja.



Tabela 7. Način lečenja

Karakteristike	N (%)
<b>Tip hirurške intervencije</b>	
Radikalna mastektomija	36 (44.44)
Poštedna operacija dojke	41 (50.62)
Drugo	4 (4.94)
<b>Adjuvantna sistemska terapija</b>	
Da	81 (100)
Ne	-
<b>Adjuvantna hormonska terapija</b>	
TAM	70 (86.42)
TAM + GOSERELIN	2 (2.47)
IA	9 (11.11)
<b>Postoperativna radioterapija</b>	
Da	45 (55.56)
Ne	36 (44.44)

TAM – tamoksifen; IA – inhibitori aromataze

Na Tabeli 8 prikazan je ishod lečenja pacijentkinja u našoj grupi. Nakon medijane praćenja od 62 meseca (opseg 27 – 75 mes) relaps bolesti zabeležen je kod 10/81 (12.35%) pacijentkinja, dok je u istom periodu preminulo 7/81 (8.64%), od kojih je 2 preminulo bez relapsa karcinoma dojke. Kada se uzmu u obzir svi mogući ishodi lečenja (relevantni događaji) kod 15/81 (18.52%) je zabeležen jedan od ovih događaja.

Tabela 8. Ishod lečenja

Karakteristike	N (%)
<b>Relaps bolesti</b>	
Da	10 (12.35)
Ne	71 (87.65)
<b>Lokalizacija prvog</b>	
Loko-regionalni relaps	4 (4.94)
Pluća	3 (3.70)
jetra	1 (1.23)
Kosti	4 (4.94)
CNS (mozak)	1 (1.23)
kontralateralni ca. dojke	1 (1.23)
<b>Ishod</b>	
Preminule	7 (8.64)
Žive	74 (91.36)
<b>Relevantni događaji*</b>	
Da	15 (18.52)
Ne	66 (81.48)

\* Relevantni događaji: pojava loko-regionalnog recidiva i/ili udaljenih metastaza i/ili kontralateralnog karcinoma dojke i/ili primarnog karcinoma drugog organskog sistema i/ili smrt iz bilo kod razloga.

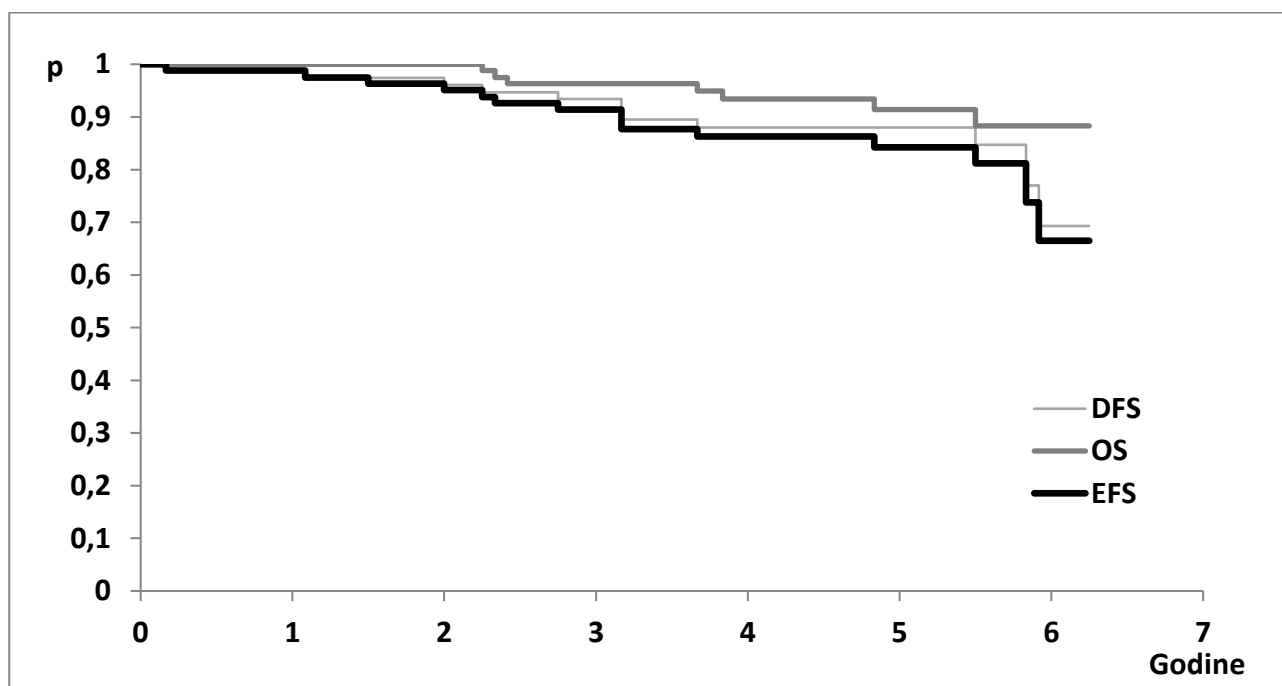
Tabela 9 prikazuje ishode lečenja analiziranih pacijentkinja. Medijana vremena do pojave događaja nije dostignuta ni za jedan ishod, dok je donja granica 95% intervala poverenja dostiguta samo za EFS i iznosi 71 mesec.

Tabela 9. Ishodi lečenja u ispitivanoj grupi (DFS, OS i EFS)

Ishod	broj pacijenata	broj događaja	medijana (mes)	95% CI (mes)
DFS	81	12	NR	NR
OS	81	7	NR	NR
EFS	81	15	NR	> 71

CI – confidence interval (interval poverenja); NR – not reached (nije dostignuto); DFS – disease-free survival; OS – overall survival; EFS – event-free survival.

Na grafikonu 1 prikazana su sva vremena u celoj ispitivanoj grupi pacijentkinja.



Grafikon 1. DFS, OS i EFS u grupi analiziranih pacijentkinja.

#### 4.2. Udruženost klasičnih prognostičkih faktora i intratumorskog nivoa uPA i PAI-1

Ispitali smo sledeće klasične prognostičke faktore: a) veličina tumora ( $\leq 20$  mm prema 20-30 mm prema  $> 30$  mm), b) gradus tumora (gradus 1 prema gradus 2 i 3), c) nivo ER ( $\geq 50\%$  prema  $< 50\%$ ) i d) Ki67 proliferativni indeks ( $< 15\%$  prema  $\geq 15\%$ ) i njihovu povezanost sa nivoima uPA i PAI-1. Značajno veći broj pacijentkinja sa tumorima sa Ki67  $\geq 15\%$  imao je intratumorski nivo uPA  $> 3$  ng/mg proteina u poređenju sa pacijentkinjama sa tumorima sa Ki67  $< 15\%$  (Pearson  $\chi^2$  Test,  $p=0.039$  (tabela 10)).

Tabela 10. Klasični prognostički faktori i nivo uPA (standardna referentna vrednost)

Klasični faktori prognoze	uPA intratumorski nivo (ng/mg proteina)				Pearson $\chi^2$ test
	intratumorski nivo		učestalost		
	Srednja vrednost (SD)	Wilcoxon rank sum test	$\leq 3$	$> 3$	
<b>Veličina tumora</b>					
$\leq 20$ mm	3.9 (4.3) 2.5 (0.1-18.7)	NS*	21 (51.2%)	13 (32.5%)	NS#
20 - 30mm	4.9 (3.8) 4.0 (0.5-15.5)		15 (36.6%)	22 (55.0%)	
$> 30$ mm	4.3 (2.4) 5.1 (0.6-7.1)		4 (9.8%)	5 (12.5%)	
nepoznato	-		1 (2.4%)	-	
<b>Gradus tumora</b>					
gradus 1	4.1 (3.1) 5.2 (0.2-8.9)	NS	5 (12.2%)	6 (15.0%)	NS
gradus 2/3	4.4 (4.0) 3 (0.1-18.7)		36 (87.8%)	34 (85.0%)	
<b>ER</b>					
$\geq 50\%$	4.1 (3.6) 2.9 (0.2-15.5)	NS	20 (48.8%)	18 (45.0%)	NS
$< 50\%$	4.6 (5.2) 3.3 (0.1-18.7)		21 (51.2%)	22 (55.0%)	
<b>Ki67 index</b>					
$< 15\%$	3.8 (4.0) 1.8 (0.2-13.3)	NS	14 (34.2%)	8 (20.0%)	<b>0.039</b>
$\geq 15\%$	4.8 (3.4) 5.1 (0.5-15.5)		10 (24.4%)	19 (47.5%)	
nepoznato	-		17 (41.5%)	13 (32.5%)	
<b>Ukupno</b>	<b>81 (100%)</b>	-	<b>41 (100%)</b>	<b>40 (100%)</b>	-

\* Kruskal Wallis Test; # Fisher exact test; NS- statistički nesigifikantno

Tumori sa Ki67  $\geq 15\%$  imaju značajno viši intratumorski nivo PAI-1 u poređenju sa tumorima sa Ki67  $< 15\%$  (Wilcoxon Rank Sum Test,  $p=0.038$ ) (tabela 11). Za prognostičke podgrupe ostalih ispitivanih klasičnih prognostičkih faktora (veličina i gradus tumora i procenat ER pozitivnih ćelija) nije nađena značajna razlika između broja pacijenata sa visokim i niskim nivoom markera. Takođe, nije nađena ni značajna korelacija sa nivoom oba markera između različitih podgrupa klasičnih prognostičkih faktora.

Tabela 11. Klasični prognostički faktori i nivo PAI-1 (standardna referentna vrednost)

Klasični faktori prognose	PAI-1 intratumorski nivo (ng/mg proteina)				Pearson $\chi^2$ test
	intratumorski nivo		učestalost		
	Srednja vrednost (SD)	Wilcoxon rank sum test	$\leq 14$	$> 14$	
<b>Veličina tumora</b>					
$\leq 20\text{mm}$	17.7 (14.1)				
	12.5 (0.0-51.8)		18 (56.3%)	16 (32.7%)	
20 - 30mm	24.6 (22.9)	NS*	10 (31.3%)	27 (55.1%)	NS#
	17 (7.5-140)				
$> 30\text{mm}$	24.6 (16.2)				
nepoznato	24.5 (6.0-51.0)		3 (9.4%)	6 (12.2%)	
	-		1 (3.1%)	-	
<b>Gradus tumora</b>					
gradus 1	20.4 (15.3)	NS	5 (15.6%)	6 (12.2%)	NS
	18.6 (0.9-46.0)				
gradus 2/3	21.6 (19.5)				
	16.0 (0.0-140)		27 (84.4%)	43 (87.8%)	
<b>ER</b>					
$\geq 50\%$	21.9 (23.0)	NS	15 (46.9%)	23 (46.9%)	NS
	15.3 (0.9-140)				
$< 50\%$	21.1 (14.6)				
	16.8 (0.0-56.8)		17 (53.1%)	26 (53.1%)	
<b>Ki67 index</b>					
$< 15\%$	17.0 (13.0)	0.038	11 (34.4%)	11 (22.5%)	NS
	13.8 (0.9-56.8)				
$\geq 15\%$	27.5 (25.3)				
	20.0 (3.0-140)		7 (21.9%)	22 (44.9%)	
nepoznato	-		14 (43.8%)	16 (32.7%)	
<b>Ukupno</b>	<b>81 (100%)</b>	-	<b>32 (100%)</b>	<b>49 (100%)</b>	-

\* Kruskal Wallis Test; # Fisher exact test; NS-statistički nesignifikantno

### 4.3. Udruženost klasičnih prognostičkih faktora sa ishodom bolesti (DFS, OS, EFS)

Pacijentkinje sa tumorima većim od 30 mm imaju značajno kraće i preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) i preživljavanje bez pojave relevantnog događaja (EFS) u poređenju sa pacijentkinjama sa tumorima manjim od 20 mm [(Log-rank test sa Bonferroni korekcijom;  $p = 0.0056$  ( $0.05/3 = 0.0167$ ))] (Tabela 12).

Tabela 12. Udruženost klasičnih prognostičkih faktora sa ishodom bolesti

Karakteristike	DFS (mes)		OS (mes)		EFS (mes)	
	Medijana (95% CI)	Log-rank test	Medijana (95% CI)	Log-rank test	Medijana (95% CI)	Log-rank test
<b>Veličina tumora</b>						
≤ 20mm	NR		NR		NR	
20 - 30mm	NR	<b>0.0082</b>	NR	NS	71 (>71)	<b>0.013</b>
> 30mm	70 (>38)		NR		70 (>38)	
<b>Gradus tumora</b>						
gradus 1	NR	NS	NR	NS	NR	NS
gradusi 2/3	NR		NR		NR	
<b>ER</b>						
≥50%	NR	NS	NR	NS	NR	NS
<50%	NR		70 (>70)		70 (>70)	
<b>Ki67 index</b>						
<15%	NR	NS	NR	NS	NR	NS
≥15%	NR		NR		NR	

NR-not reached (nije dostignuto); NS-statistički nesigifikantno; DFS-disease-free survival; OS-overall survival; EFS-event-free survival.

### 4.4. Udruženost intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 sa ishodom bolesti (DFS, OS, EFS)

#### 4.4.1. Udruženost intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 (standardne granične vrednosti) sa ishodom bolesti (DFS, OS, EFS)

Ispitali smo da li pacijentkinje koje su iskusile jedan od događaja kojim su definisani DFS, OS i EFS imaju različite nivoe uPA i PAI-1. Na tabeli 13 prikazano je da tumori onih pacijentkinja koje su iskusile neki od događaja kojim je definisan EFS imaju značajno viši nivo uPA i PAI-1 u odnosu na pacijentkinje bez događaja.

Tabela 13. Nivoi uPA i PAI-1 u odnosu na pojavu relevantnog događaja (EFS)

Biomarker	Relevantni događaj		Wilcoxon rank sum test
	Da	Ne	
<b>uPA nivo</b>			
Srednje (SD)	6.5 (4.8)	3.9 (3.5)	<b>p=0.042</b>
Medijana (rang)	5.7 (0.5-18.7)	2.7 (0.1-15.5)	
<b>PAI-1 nivo</b>			
Srednje (SD)	33.7 (32.7)	18.7 (12.9)	<b>p=0.037</b>
Medijana (rang)	27.2 (8-140)	15.1 (0-56.8)	

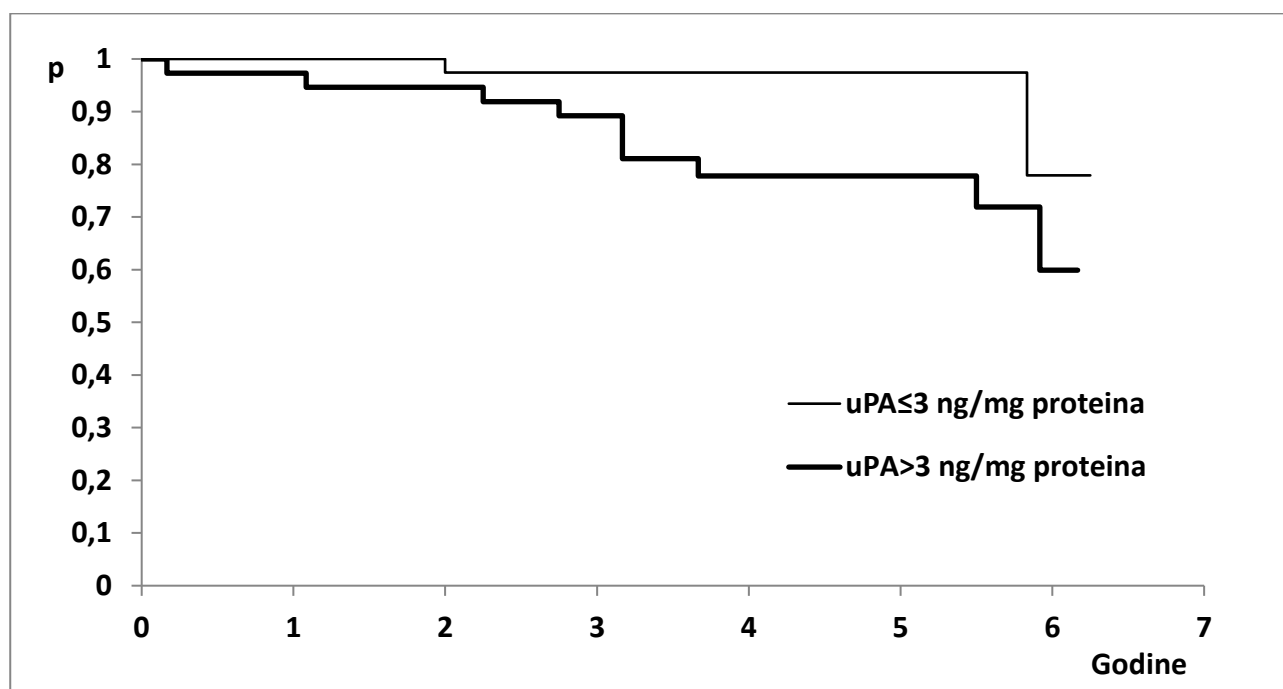
\* Relevantni događaji: pojava loko-regionalnog recidiva i/ili udaljenih metastaza i/ili kontralateralnog karcinoma dojke i/ili primarnog karcinoma drugog organskog sistema i/ili smrt iz bilo kod razloga.

Iako medijane do pojave svih događaja kojim su definisani DFS, OS i EFS nisu dostignute pacijentkinje sa tumorima uPA > 3 ng/mg proteina imale su značajno kraće DFS i OS u poređenju sa pacijentkinjama sa tumorima uPA ≤ 3 ng/mg proteina. Nadalje, pacijentkinje sa tumorima PAI-1 > 14 ng/mg proteina imale su značajno kraće OS u poređenju sa pacijentkinjama sa tumorima PAI-1 ≤ 14 ng/mg proteina. Rezultati su prikazani na tabeli 14 i grafikonima 2-4.

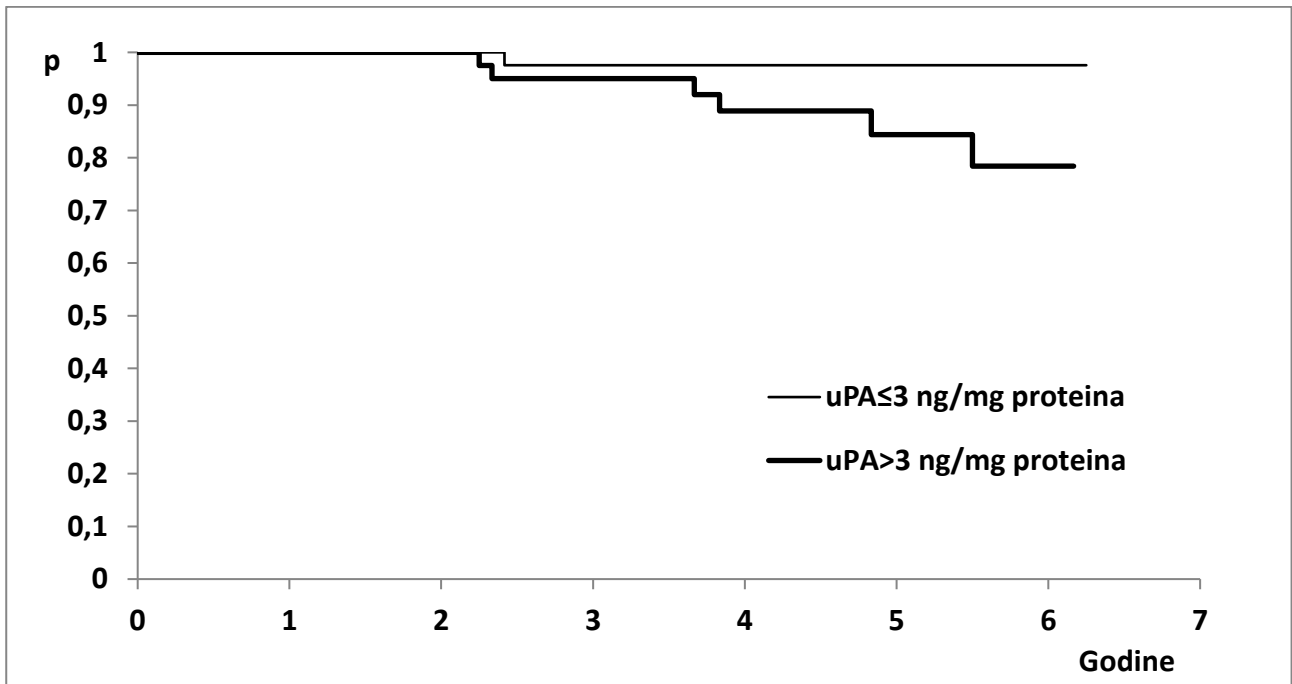
Tabela 14. Povezanost nivoa uPA i PAI-1 (standardne granične vrednosti) sa DFS, OS i EFS.

Karakteristike	DFS (mes)		OS (mes)		EFS (mes)	
	Medijana (95% CI)	Log-rank test, p	Medijana (95% CI)	Log-rank test, p	Medijana (95% CI)	Log-rank test, p
<b>uPA</b>						
≤ 3 ng/mg prn	NR (NR)	p=0.015	NR (NR)	p=0.04	NR (> 70)	NS
> 3 ng/mg prn	NR (> 71)		NR (NR)		NR (> 71)	
<b>PAI-1</b>						
≤ 14 ng/mg prn	NR (NR)	NS	NR (NR)	p=0,018	NR (> 70)	NS
> 14 ng/mg prn	NR (NR)		NR (NR)		NR (> 71)	

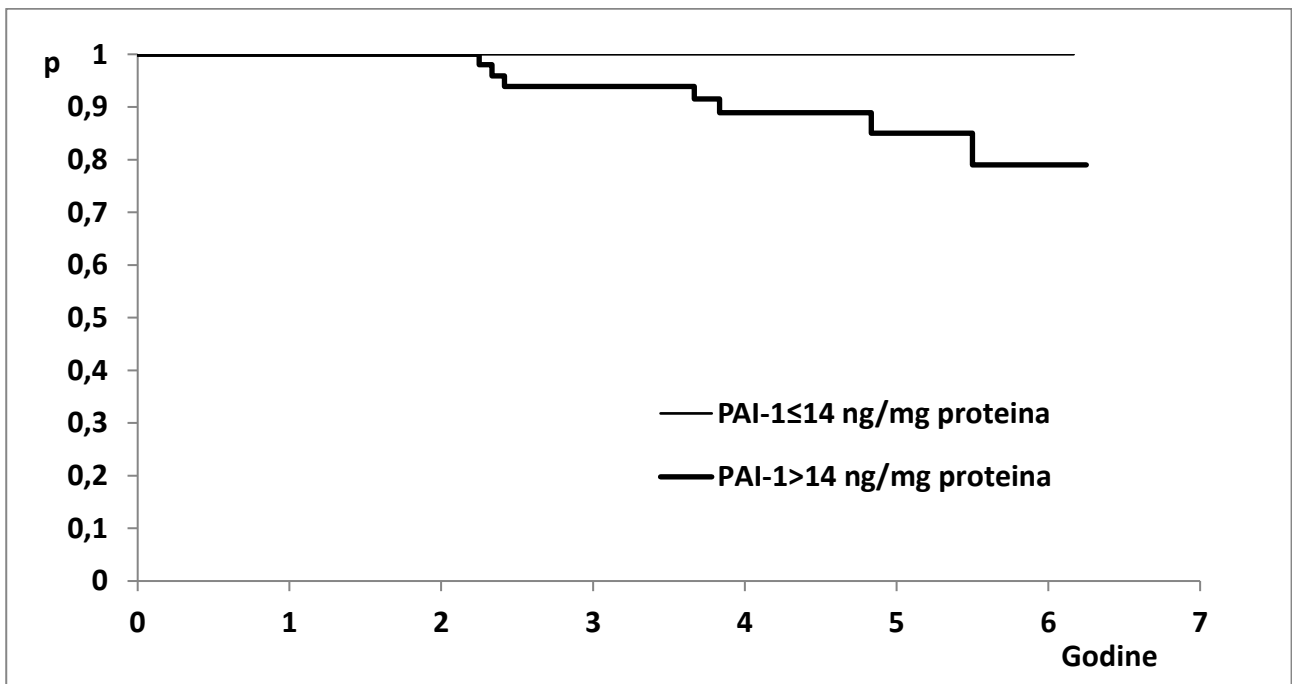
NR-not reached (nije dostignuto); NS-statistički nesigifikantno; DFS-disease-free survival; OS-overall survival; EFS-event-free survival.



Grafikon 2: DFS u zavisnosti od standardnih graničnih vrednosti uPA ( $p=0.015$ )



Grafikon 3: OS u zavisnosti od standardnih graničnih vrednosti uPA ( $p=0.04$ )



Grafikon 4: OS u zavisnosti od standardnih graničnih vrednosti PAI-1 ( $p=0.018$ )

Da bi istražili uticaj združenog sadržaja uPA i PAI-1 u tumorima, ispitivana grupa pacijentkinja podeljena je u 3 podgrupe: 1) uPA i PAI-1 oba povišena (N=38, 46.91%), 2) jedan od markera povišen, a drugi u granicama normale (N=13, 16.05%) i 3) uPA i PAI-1 oba u granicama normale (N=30, 37.94%). Nije bilo razlike u DFS, OS i EFS između ove tri podgrupe pacijentkinja (Tabela 15).

Tabela 15. Udruženost različitih nivoa uPA i PAI-1 sa ishodom bolesti

Karakteristike	DFS (mes)		OS (mes)		EFS (mes)	
	Medijana (95% CI)	Log-rank test	Medijana (95% CI)	Log-rank test	Medijana (95% CI)	Log-rank test
<b>Združeni nivo uPA i PAI-1</b>						
<b>oba povišena</b>	NR (>70)		NR		NR (>70)	
<b>jedan povišen</b>	NR	NS	NR	NS	NR	NS
<b>oba snižena</b>	NR (>71)		NR		NR (>71)	

NR-not reached (nije dostignuto); NS-statistički nesigifikantno; DFS-disease-free survival; OS-overall survival; EFS-event-free survival.

Uzimajući u obzir da je ispitivana grupa mala i da komparacija multiplih poređenja između malih podgrupa ne može u ovom trenutku dati pouzdane rezultate, odvojili smo posebno grupu sa oba markera povišena i uporedili sa ishodom bolesti ostalih pacijentkinja (Tabela 16).

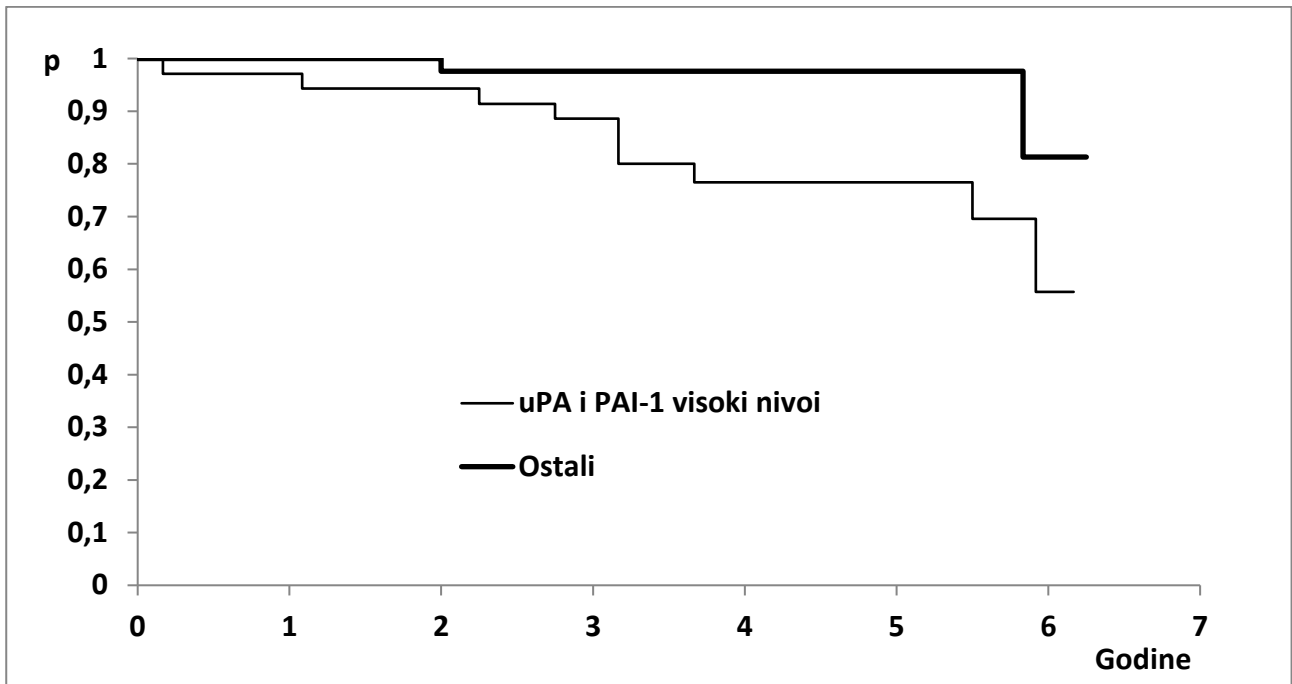
Tabela 16: Poređenje DFS, OS i EFS između podgrupa pacijentkinja sa tumorima koji sadrže uPA i PAI-1 visokog nivoa i ostalih podgrupa pacijentkinja

Događaj	Broj pacijenata	Broj događaja	Medijana	95%CI	Log-Rank test, p-vrednost
<b>DFS</b>					
uPA/PAI-1 visok nivo	35	10	NR	71- NR	p=0.006
Ostali*	41	2	NR	NR - NR	
<b>OS</b>					
uPA/PAI-1 visok nivo	38	6	NR	NR - NR	p=0.024
Ostali*	43	1	NR	NR - NR	
<b>EFS</b>					
uPA/PAI-1 visok nivo	38	11	NR	71- NR	p=0.025
Ostali*	43	4	NR	NR - NR	

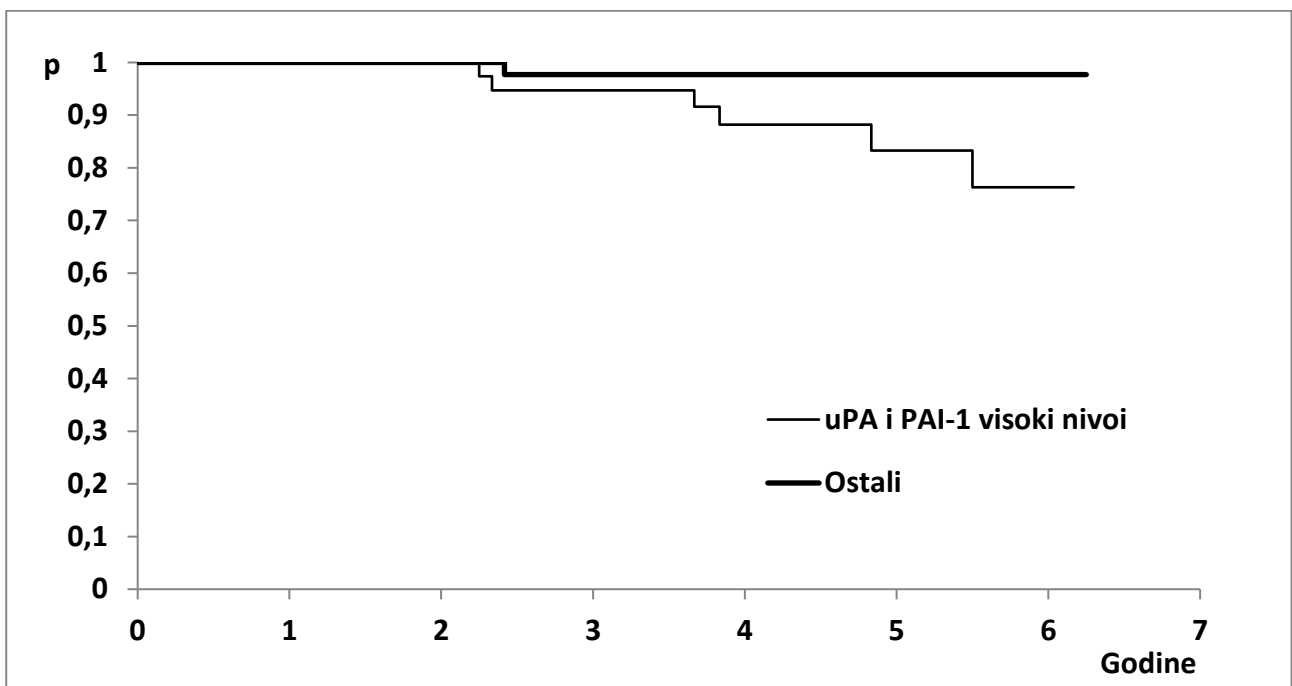
\*Ostali - uPA nizak/PAI-1 nizak i uPA nizak/PAI-1 visok i uPA visok/PAI-1 nizak; \*\*NR – nije dostignuto (not reached); DFS-disease-free survival; OS-overall survival; EFS-event-free survival.

Tako, pacijentkinje sa tumorima sa istovremeno uPA > 3 ng/mg proteina i PAI-1 > 14 ng/mg proteina imaju značajno kraće DFS (Log Rank test, p= 0.006), OS (Log Rank test, p= 0.024) i EFS (Log Rank test, p=0.025) u poređenju sa ostalim pacijentkinjama (uPA > 3 ng/mg proteina i PAI-1 < 14 ng/mg proteina; uPA < 3 ng/mg proteina i PAI-1 > 14 ng/mg proteina i uPA < 3 ng/mg proteina i PAI-1 < 14 ng/mg proteina) (Grafikoni 5-7).

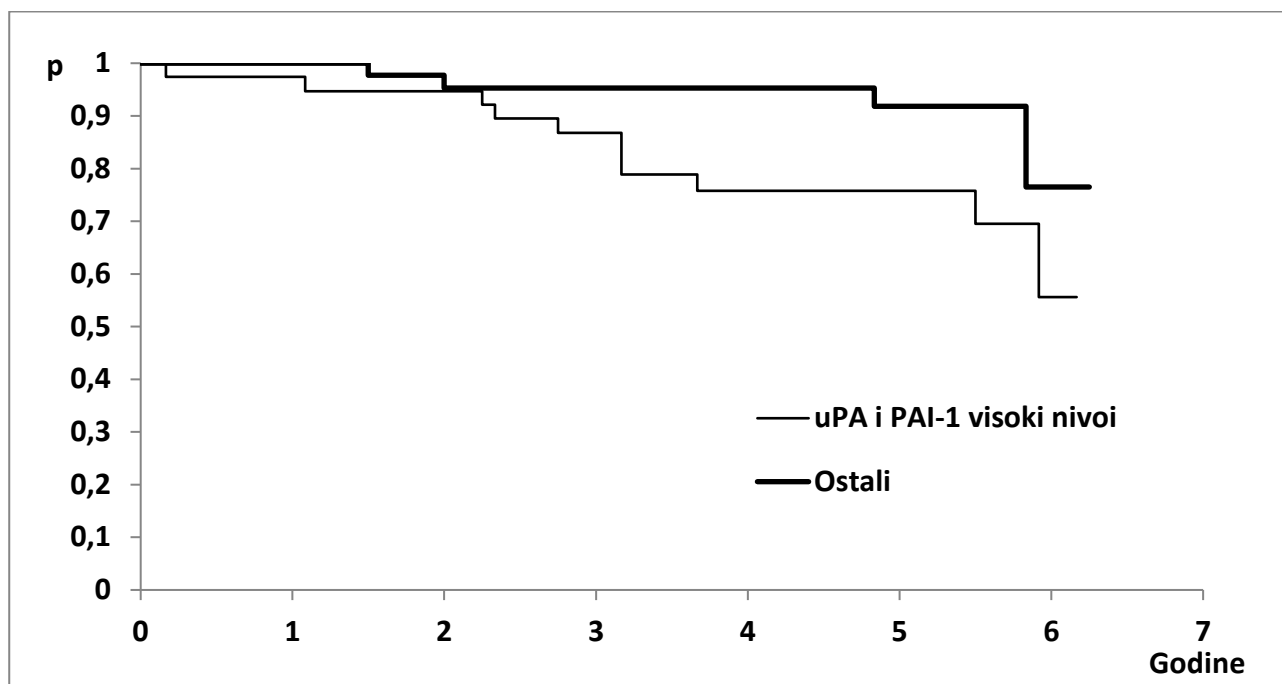




Grafikon 5: DFS u zavisnosti od združenog sadržaja uPA i PAI-1 (oba povišena prema ostali) ( $p=0.006$ )



Grafikon 6: OS u zavisnosti od združenog sadržaja uPA i PAI-1 (oba povišena prema ostali) ( $p=0.024$ )



Grafikon 7: EFS u zavisnosti od združenog sadržaja uPA i PAI-1 (oba povišena prema ostali) ( $p=0.025$ )

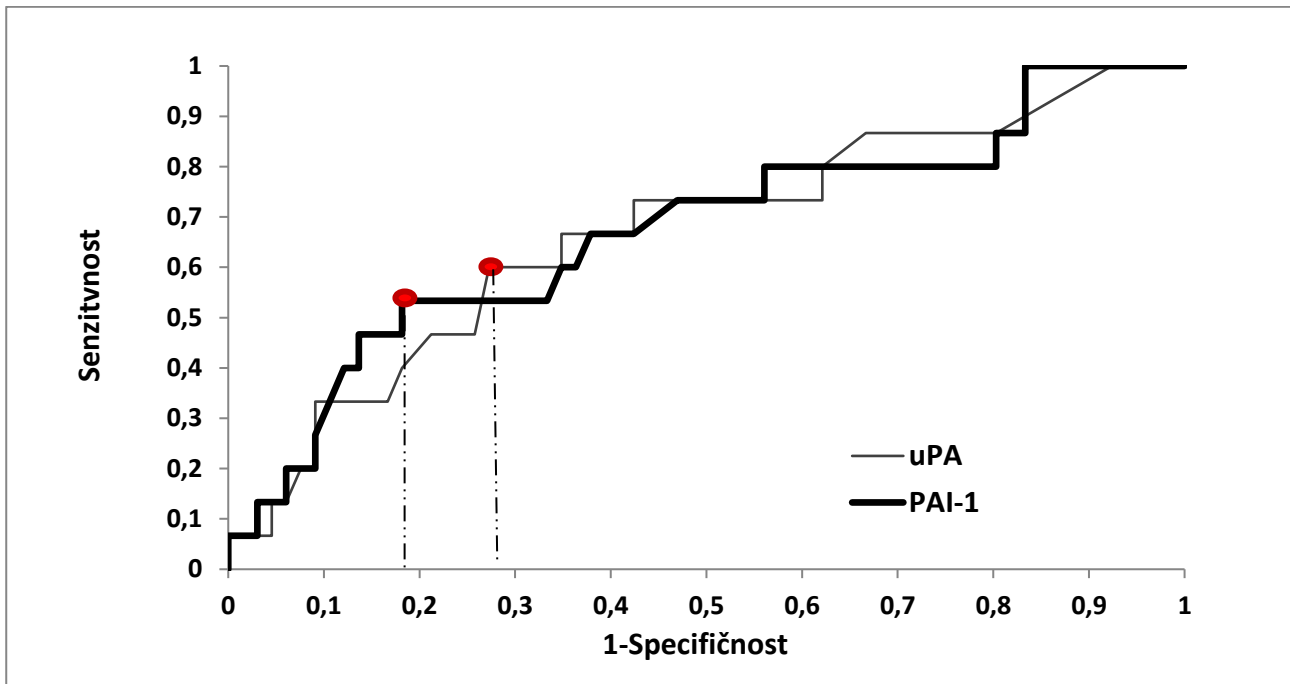
#### 4.4.2. Udruženost intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 (ROC granične vrednosti) sa ishodom bolesti (DFS, OS, EFS)

Korišćenjem ROC analize, potvrdili smo da je diskriminativni potencijal uPA i PAI-1 da predvidi pojavu relevantnog događaja veća sa ROC *cut-off* (graničnim) vrednostima: 5.65 ng/mg proteina za uPA i 27.10 ng/mg proteina za PAI-1 (Tabela 17; grafikon 8) u poređenju sa klasičnim graničnim vrednostima.

Tabela 17. Rezultati ROC analize za uPA i PAI-1 i relevantnih događaja

Karakteristike	uPA	PAI-1
AUC ROC* (95% CI)	66.9% (50.9%-82.9%)	67.32% (50.8%-83.8%)
Likelihood ratio test**	<b>p = 0.0268</b>	<b>p = 0.0099</b>
ROC <i>cut-off</i> vrednost#	5.65	27.10
Senzitivnost (95% CI)	60.0% (33.3%-86.7%)	53.44% (26.7%-80.0%)
Specifičnost (95% CI)	72.7% (62.1%-83.3%)	81.82% (72.7%-90.9%)

\*Area Under the ROC curve (DeLong's method); \*\*Likelihood ratio test za AUC ROC; #Nivo (ng/mg proteina) sa maksimalnom senzitivnošću i specifičnošću.



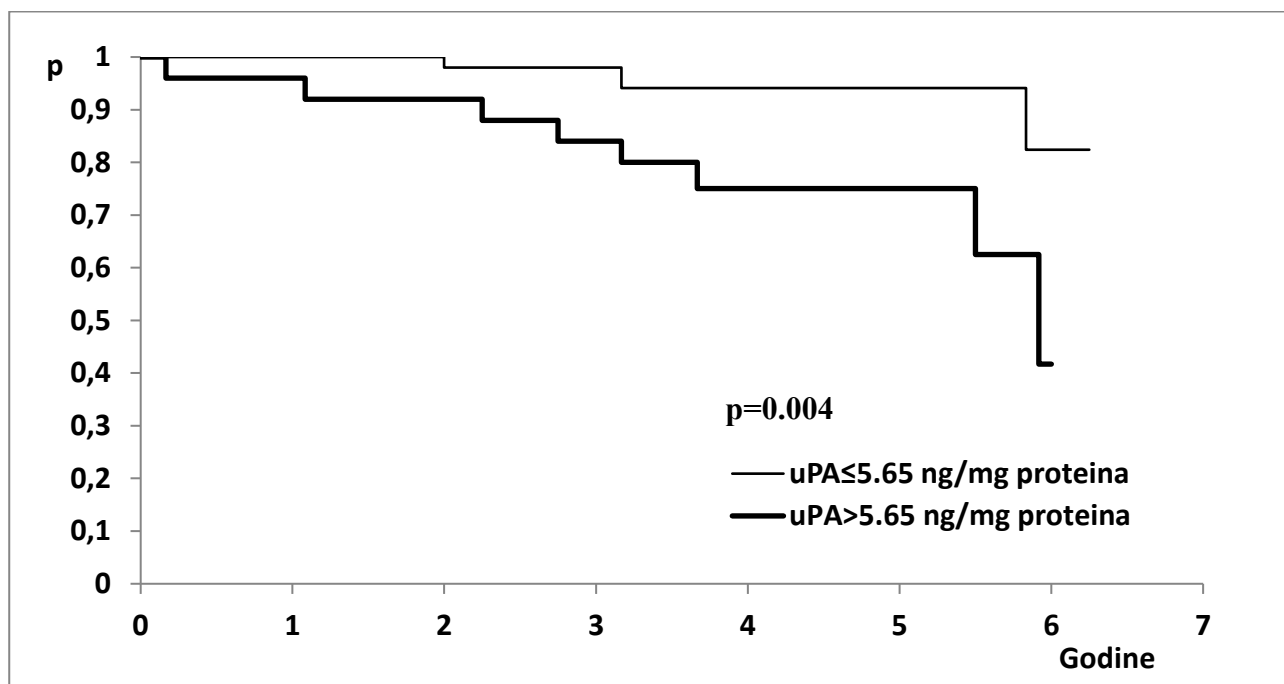
Grafikon 8: ROC kriva za intratumorski nivo PAI-1 i PAI-1

Pacijentkinje sa tumorima čiji je nivo uPA  $\leq 5.65$  ng/mg proteina imaju značajno duže DFS, OS i EFS u poređenju sa pacijentkinjama sa tumorima koji sadrže uPA  $> 5.65$  ng/mg proteina. (Tabela 18, Grafikoni 9-11)

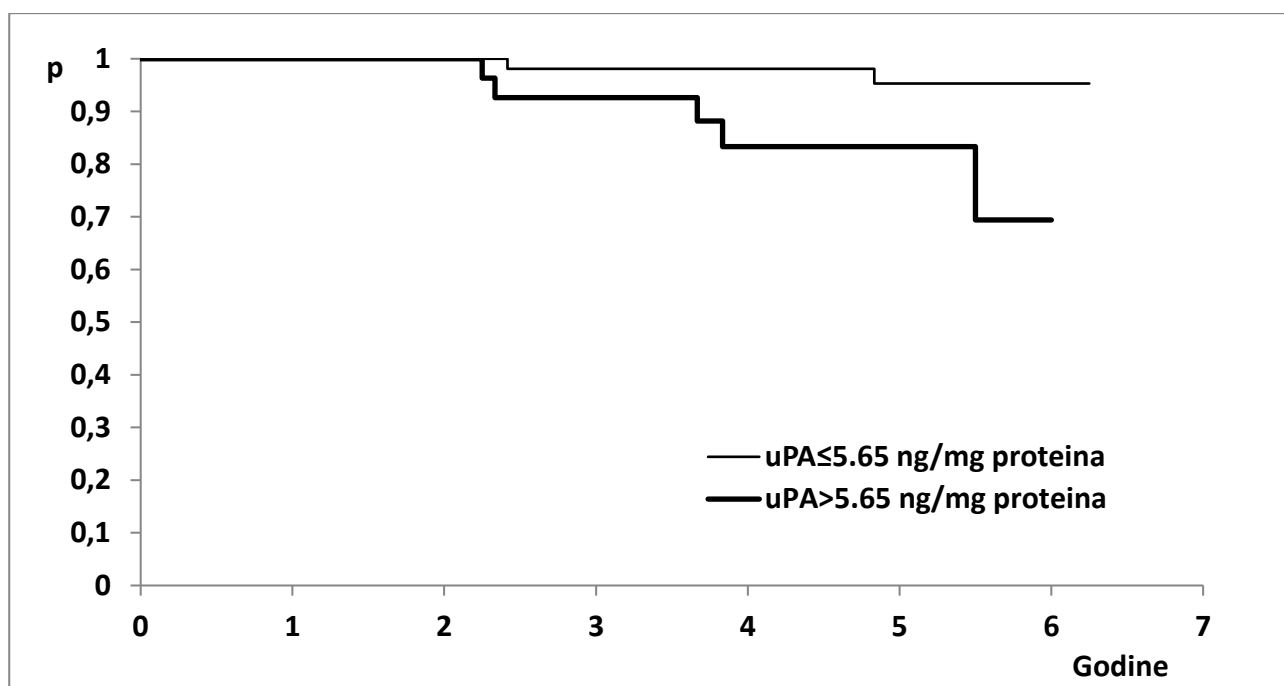
Tabela 18. DFS, OS i EFS u odnosu na ROC granične vrednosti uPA

Događaj	uPA (ng/mg prn)	Broj događaja (broj pacijenata)	Medijana (mes)	95% CI	Log Rank test, p
DFS	$\leq 5.65$	4 (51)	NR	NR	p=0.004
	$> 5.65$	8 (25)	71	$> 66$	
OS	$\leq 5.65$	2 (54)	NR	NR	p=0.012
	$> 5.65$	5 (27)	71	$> 66$	
EFS	$\leq 5.65$	6 (54)	NR	NR	p=0.009
	$> 5.65$	9 (27)	NR	$> 66$	

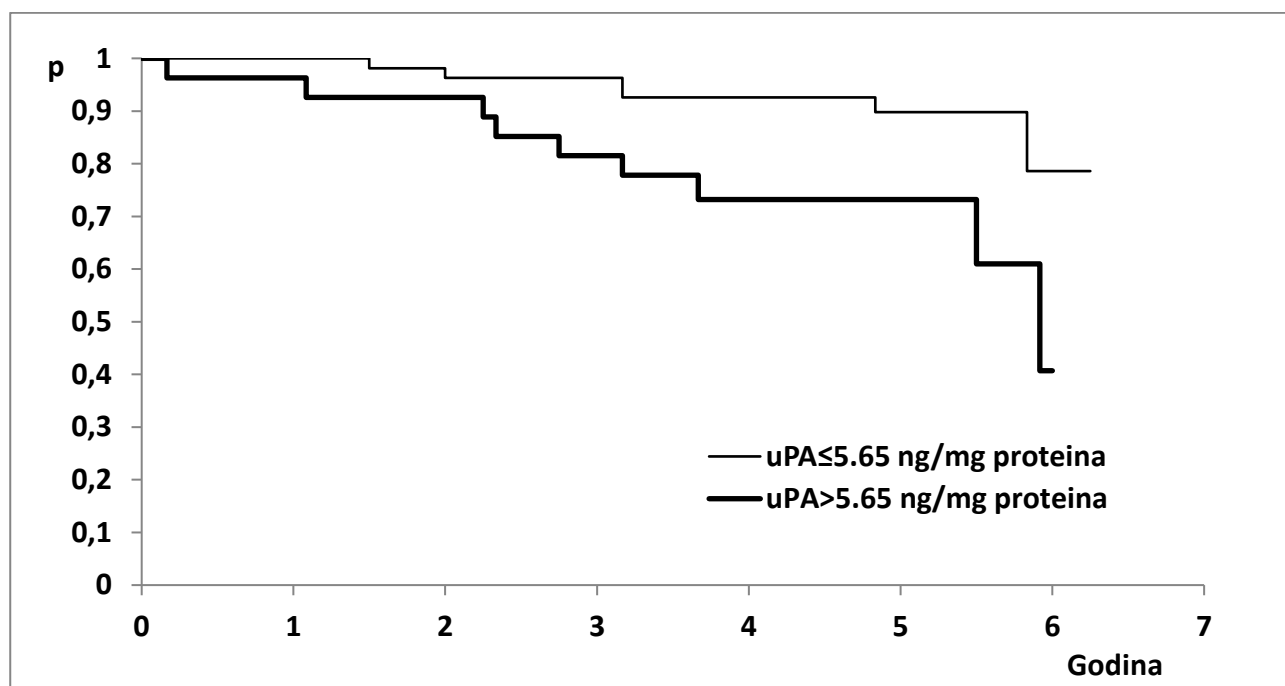
DFS-disease-free survival; OS-overall survival; EFS-event-free survival; NR – nije dostignuto (not reached).



Grafikon 9: Povezanost uPA ROC graničnih vrednosti i DFS ( $p=0.004$ )



Grafikon 10: Povezanost uPA ROC graničnih vrednosti i OS ( $p=0.012$ )



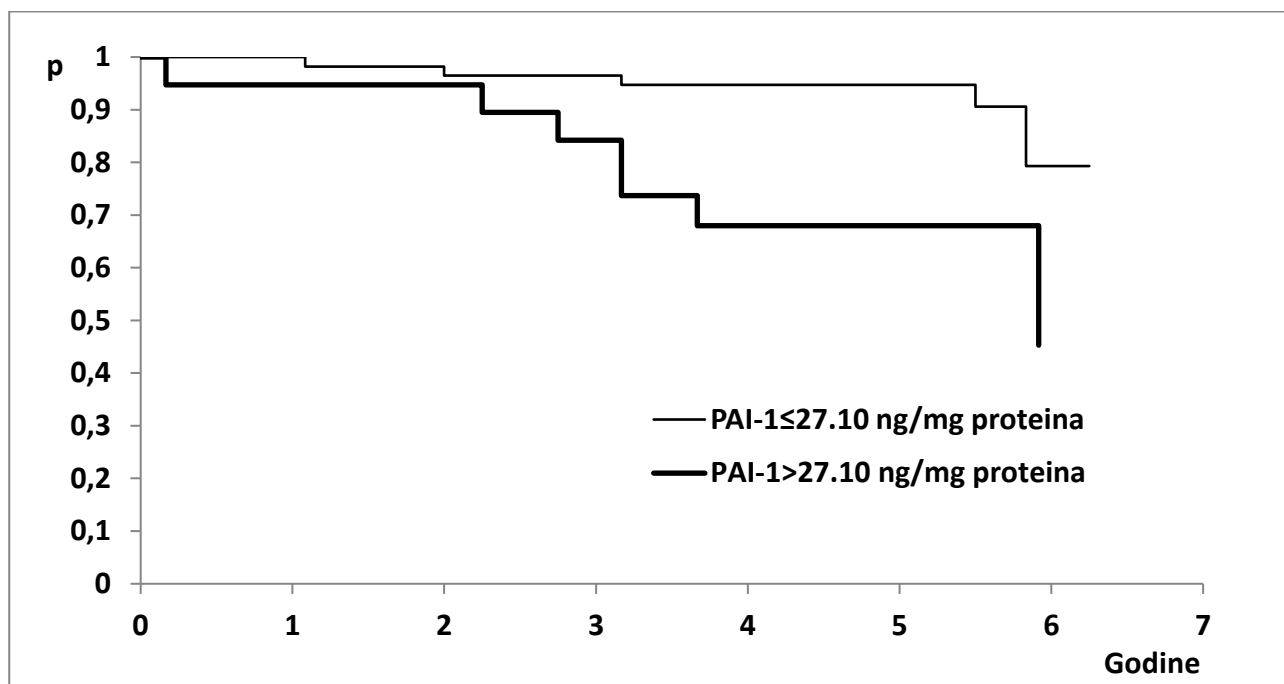
Grafikon 11: Povezanost uPA ROC graničnih vrednosti i EFS ( $p=0.009$ )

Slično, pacijentkinje sa tumorima sa PAI-1 nivoima  $\leq 27.1$  ng/mg proteina imaju značajno duže DFS, OS, i EFS u poređenju sa pacijentkinjama sa tumorima sa PAI-1  $> 27.1$  ng/mg proteina. (Tabela 19, Grafikoni 12-14).

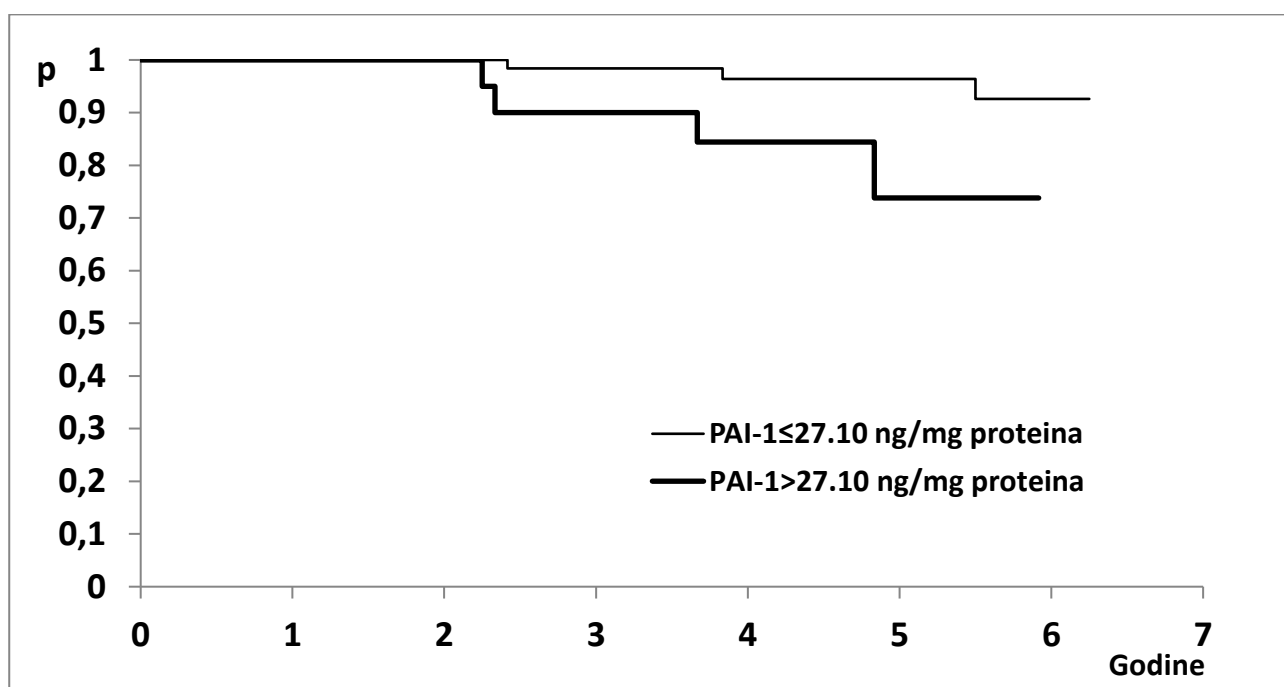
Tabela 19. DFS, OS i EFS u odnosu na ROC granične vrednosti PAI-1

Događaj	uPA (ng/mg prn)	Broj događaja (broj pacijenata)	Medijana (mes)	95% CI	Log Rank test, p
DFS	$\leq 27.1$	7 (61)	NR	NR	$p=0.004$
	$> 27.1$	8 (20)	71	$> 44$	
OS	$\leq 27.1$	6 (61)	NR	NR	$p=0.017$
	$> 27.1$	4 (20)	NR	NR	
EFS	$\leq 27.1$	6 (54)	NR	NR	$p=0.009$
	$> 27.1$	9 (27)	NR	$> 66$	

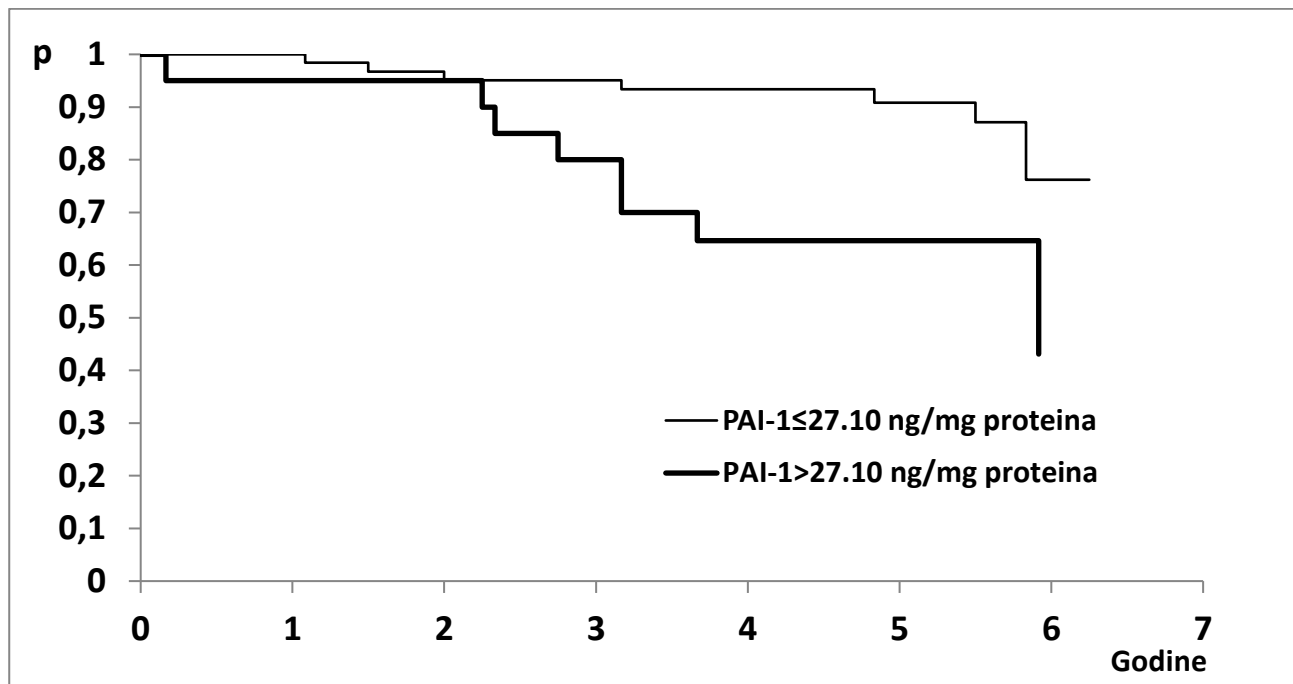
ROC – površina ispod ROC krive; DFS-disease-free survival; OS-overall survival; EFS-event-free survival; NR – nije dostignuto (*not reached*).



Grafikon 12: Povezanost PAI-1 ROC graničnih vrednosti i DFS ( $p=0.004$ )



Grafikon 13: Povezanost PAI-1 ROC graničnih vrednosti i OS ( $p=0.017$ )



Grafikon 14: Povezanost PAI-1 ROC graničnih vrednosti i EFS ( $p=0.004$ )

#### 4.5. Udruženost -675 4G/5G PAI-1 genotipa sa ishodom bolesti (DFS, OS, EFS)

Tumori sa -675 4G/4G genotipom imaju značajno viši tumorski nivo uPA u poređenju sa pacijentkinjama sa tumorima koji imaju dominantne alele u svojim genotipovima (-675 4G/5G i -675 5G/5G) i trend ka većim koncentracijama PAI-1 (Tabela 20)

Tabela 20. Tumorski nivoi uPA i PAI-1 u odnosu na -675 4G/5G PAI-1 genotipove

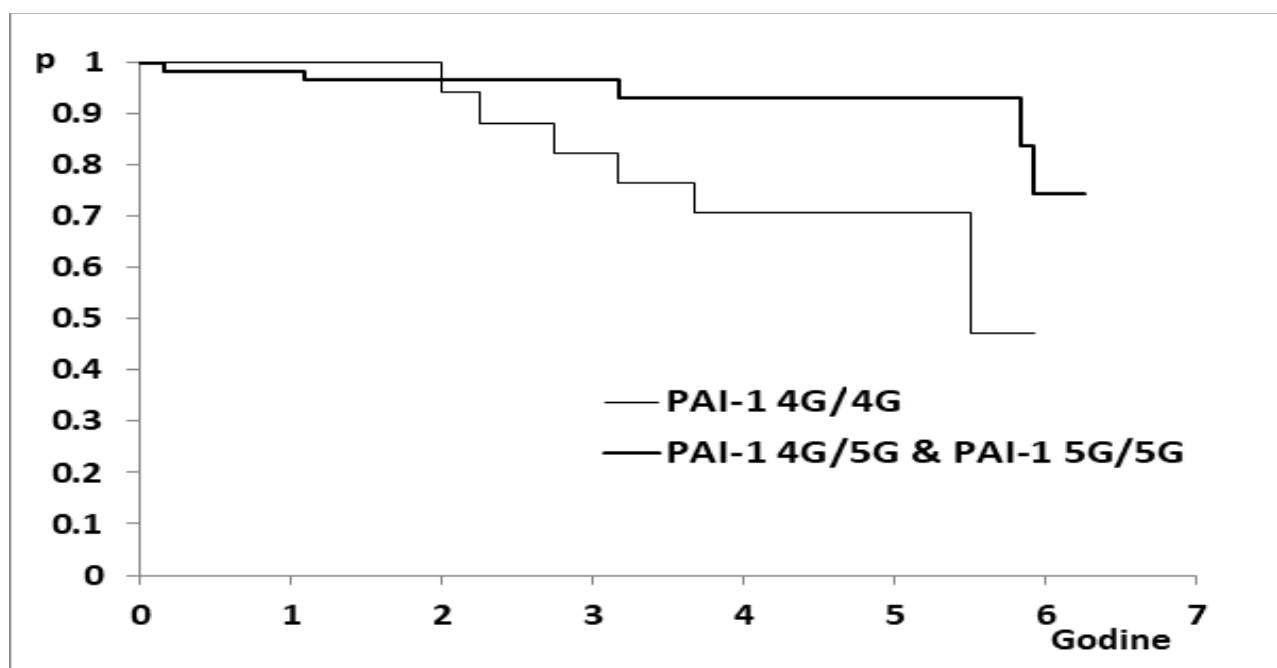
PAI-1 genotip	uPA nivo (ng/mg proteina)	Wilcoxon rank sum test, p	PAI-1 nivo (ng/mg proteina)	Wilcoxon rank sum test, p
4G/4G				
Srednja vrednost (SD)	6.21 (4.74)		30.5 (29.76)	
Medijana (rang)	5.5 (0.5-18.7)	0.032	19.8 (6.5-140)	0.076
4G/5G i 5G/5G				
Srednja vrednost (SD)	3.67 (3.21)		18.76 (12.59)	
Medijana (rang)	2.7 (0.2-15.5)		15.1 (0.9-56.8)	

Povezanost -675 4G/5G PAI-1 genotipova sa ishodom bolesti, DFS, OS i EFS ispitivana je Log Rank testom (Tabela 21). Pacijentkinje sa tumorima koji imaju recesivni genotip insercija/delecija polimorfizma na poziciji -675 bp promotorske regije PAI-1 gena (-675 4G/4G) imaju značajno kraće DFS, OS i EFS u poređenju sa pacijentkinjama sa tumorima heterozigotnog (-675 4G/5G) i dominantno homozigotnog genotipa (-675 5G/5G) (Log Rank test,  $p<0.01$ ) (Grafikoni 15-17).

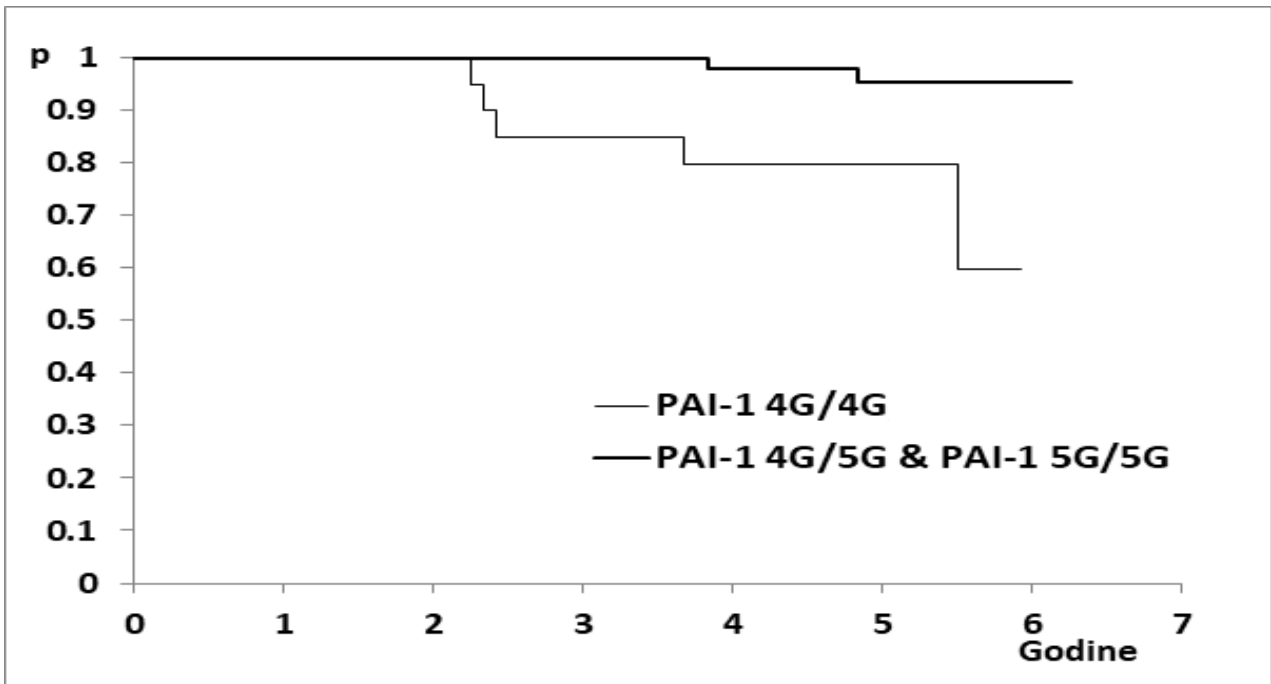
Tabela 21. DFS, OS i EFS u odnosu na ROC granične vrednosti PAI-1

Događaj	PAI-1 genotip	Broj događaja (broj pacijenata)	Medijana (mes)	95% CI	Log Rank test, p
DFS	4G/4G	6 (17)	66	> 66	p=0.005
	4G/5G i 5G/5G	6 (57)	NR	NR	
OS	4G/4G	5 (20)	NR	> 66	p=0.001
	4G/5G i 5G/5G	2 (59)	NR	NR	
EFS	4G/4G	8 (20)	66	> 44	p=0.001
	4G/5G i 5G/5G	7 (59)	NR	NR	

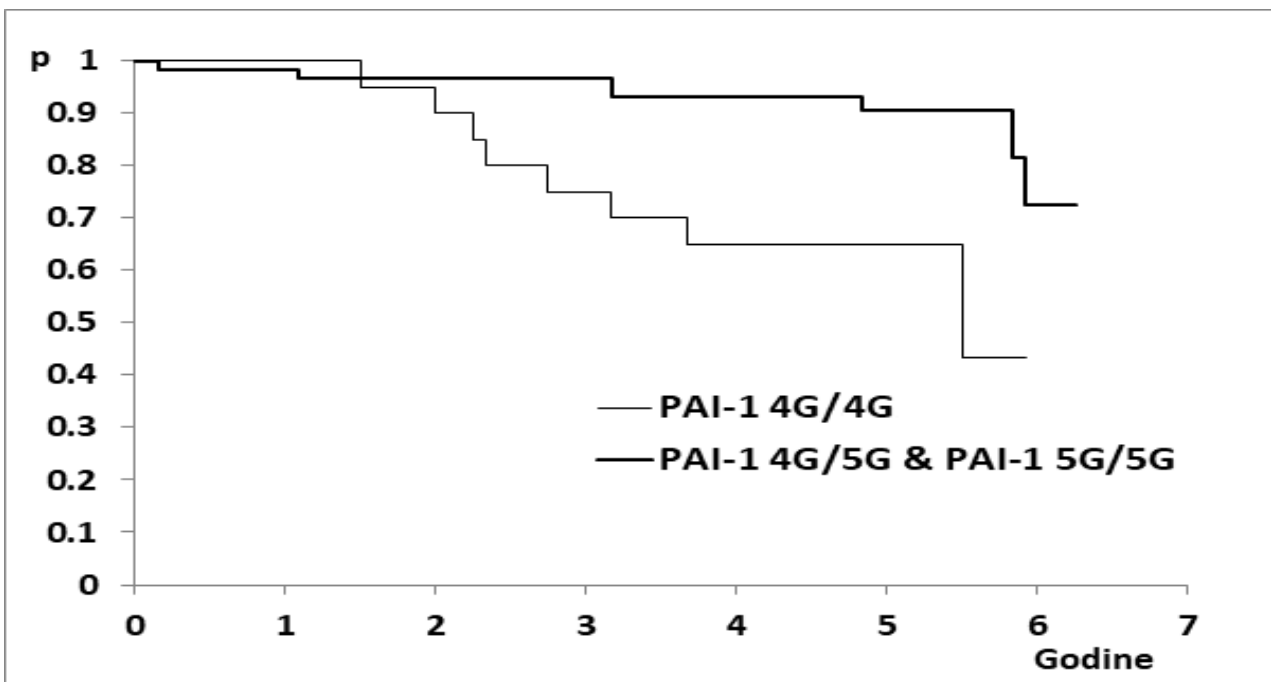
DFS-disease-free survival; OS-overall survival; EFS-event-free survival; NR – nije dostignuto (*not reached*).

Grafikon 15: Povezanost PAI-1 genotipova i DFS ( $p=0.005$ )





Grafikon 16: Povezanost PAI-1 genotipova i OS ( $p=0.001$ )



Grafikon 17: Povezanost PAI-1 genotipova i EFS ( $p=0.001$ )

## 5. DISKUSIJA

Naša ispitivana grupa obuhvatila je strogo selektovanu podgrupu pacijentkinja sa HR pozitivnim/HER2 negativnim karcinomima dojke stadijuma I i II, bez zahvatanja regionalnih limfnih čvorova (nodus negativna bolest) u momentu postavljanja dijagnoze. Ova podgrupa pacijentkinja ima najbolju prognozu, što znači da većina (oko 70%) ovih žena nakon radikalnog odstranjivanja njihovih tumora i regionalnih limfnih čvorova neće doživeti relaps karcinoma dojke. Ipak, neke žene će nakon izvesnog vremena od operativnog zahvata imati relaps bolesti, što se može desiti i posle 2 i 3 decenije od inicijalnog lečenja [10]. Pokazano je da HR pozitivni/HER2 negativni tumori dobro reaguju na hormonsku terapiju, tako da je adjuvantna hormonska terapija terapija izbora koja ima za cilj da dodatno smanji rizik od pojave relapsa bolesti [155]. Međutim, poznato je da dodavanje adjuvantne hemioterapije hormonskoj terapiji kod nekih od ovih pacijentkinja donosi dodatnu korist, tj. dodatno doprinosi smanjenju rizika od pojave relapsa bolesti. Ono što se ne zna pouzdano, to je kojim ženama treba propisati hemioterapiju i koje su žene kandidati za produženu hormonsku terapiju duže od 5 godina.

Određivanje bioloških podtipova tumora na osnovu IHH analize ER, PR, HER2 i Ki67 (klinički fenotipovi) predstavlja surogat definicije [98] molekularnih podtipova karcinoma dojke koji su određeni na osnovu genske ekspresije (genotipovi) i podeljeni su na luminalne A i B, HER2 “obogaćene” (engl. *HER2 enriched*) i bazalnim ćelijama slične tumore (engl. *basal like*) [97]. Danas se koriste u rutinskoj praksi testovi genskog profilisanja, kao što su *Oncotype DX* i *MammaPrint* (prva generacija) i *Endopredict CS*, *PAM50* i *BC index* (druga generacija) u cilju preciznijeg određivanja rizika od pojave relapsa bolesti i identifikacije pacijentkinja kojima je potrebno pored adjuvantne hormonske terapije ordinirati i hemioterapiju. Međutim, pre otkrića testova genskog profilisanja tumora, pokazano je da intratumorski nivoi uPA i PAI-1 predstavljaju faktore loše prognoze i prediktivne faktore odgovora na antraciklinsku hemioterapiju [234,209].

Sistem plazminogen/plazmin igra ključnu ulogu u razgrađivanju (degradaciji) nekoliko proteina, medju kojima i fibrina, što ima svoju fiziološku ulogu u rastvaranju fibrinskih ugrušaka u krvnim sudovima. Aktivacija uPA vezivanjem za svoj receptor (uPAR) pretvara plazminogen u plazmin. Kao reakcija na povišenje nivoa plazmina, povećava se sinteza PAI-1, fiziološkog inhibitora uPA, koji se vezuje za kompleks uPA-uPAR. Ovaj sistem se, takođe, aktivira u procesu zarastanja rana. Smatra se da uPA podstiče migraciju malignih ćelija time što dovodi do razgrađivanja ekstraćelijskog matriksa [235,236]. Osim toga, nedavno objavljeni rad ukazuje na to da uPA i PAI-1 pomažu opstanak maligne ćelije u krvi i kosnoj srži i time olakšavaju proces metastaziranja. Uloga PAI-1 nije samo da inhibira uPA, već podstiče procese metastaziranja malignih ćelija, promoviše angiopoezu i inhibira p53-indukovanu apoptozu [237]. Inhibicija fibrinolize pod uticajem PAI-1 dovodi do nakupljanja fibrina, što potencijalno štiti tumorske ćelije tako što pomaže da izbegnu imunološki nadzor i time omogućava njihovo preživljavanje [238]. Prognostički značaj uPA i njenog inhibitora PAI-1 u pacijentkinja sa nodus negativnim ranim karcinomima dojke pokazan je u radovima objavljenim pre dve decenije, ali je to potvrđeno i u kasnijim istraživanjima [206,234,239,240]. Nizak nivo uPA i PAI-1 u tumorima ovih pacijenata ukazuje na bolju prognozu u poređenju sa visokim vrednostima ovih markera.

U retrospektivnoj studiji sprovedenoj u okviru jedne institucije, analizirali smo uticaj klasičnih prognostičkih faktora i intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 na ishode bolesti HR-pozitivnih i HER-2-negativnih pacijentkinja obolelih od karcinoma koji se nije proširio u regionalne limfne čvorove, a kod kojih je primenjivana adjuvantna hormonska terapija. Od svih ispitivanih klasičnih faktora prognoze (veličina i gradus tumora, procenat ER u tumorskim ćelijama i Ki67 indeks), samo je veličina tumora bila od prognostičkog značaja: pacijentkinje sa tumorima većim od 30 mm imale su značajno kraće DFS i EFS u odnosu na pacijentkinje sa tumorima do 20 mm ili manjim, što se poklapa

sa rezultatima do kojih su došli Dovnik i Takac [241]. Izgleda da nivoi uPA i PAI-1 ne utiču na ovaj rezultat, budući da nije zabeležena udruženost između veličine tumora i nivoa uPA i PAI-1. Poznato je da je veličina tumora pored gradusa tumora, nezavisni klasični prognostički faktor kod pacijentkinja sa nodus negativnim karcinomima dojke [242].

Od drugih klasičnih faktora prognoze ispitivali smo uticaj ekspresije ER i Ki67. Granična vrednost od 50% za ekspresiju ER diskriminiše između luminalnog A i luminalnog B fenotipa. Ekspresija PR nije mogla da bude uzeta u obzir budući da trećina (26/81) pacijentkinja nije imala određen PR, a od ostalih 53 pacijentkinje sa određenim PR, samo 4 je imalo ER pozitivne / PR negativne tumore, dok je jedna pacijentkinja imala ER negativan/PR pozitivan tumor, dakle ukupno 5/81 (6%). Istovremena pojava pozitivne ekspresije PR u odsustvu ekspresije ER je neobična, jer se zna da je ekspresija PR mera aktivnosti ER signalnog puta, koja odražava delovanje estrogena putem njegovog vezivanja za ER. To je tumorski fenotip karcinoma dojke koji se javlja sa najmanjom učestalošću (1.6%) i postoje mišljenja da je zapravo ER lažno negativan rezultat, što bi se moglo dokazati u ponavljanim analizama ER [243].

Zbog toga nije mogla da se napravi drugačija podela između luminal A i B fenotipa osim na osnovu ekspresije ER. Mi u našoj grupi nismo našli da nivo ekspresije ER utiče na ishod bolesti ispitivanih pacijentkinja. Smatramo da nivo ekspresije PR ne bi značajno uticao na ovaj rezultat i da smo bili u mogućnosti da uradimo i ekspresiju PR kod svih pacijentkinja. Od 43/81 (53%) sa  $ER \geq 50\%$  njih 21 je imalo  $PR > 20\%$  (luminal A fenotip), 5 je imalo nisku ekspresiju PR, što znači da je ostalih 17 imalo nepoznate PR i u ovoj podgrupi suštinski ne znamo podelu između grupa luminal A i luminal B tumora. Malo je verovatno da bi mali broj ovih pacijentkinja koji bi bio zapravo svrstan u aktuelnu grupu sa  $ER < 50\%$  tumorima, mogao da utiče na ovaj rezultat. U planu je duže praćenje ovih pacijentkinja kada će se uraditi i ekspresija PR kod svih pacijentkinja.

Naša analiza je pokazala da postoji značajna udruženost intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 i ekspresije Ki67: karcinomi sa  $Ki67 \geq 15\%$  imali su značajno više nivoe PAI-1 u odnosu na karcinome sa  $Ki67 < 15\%$ , ali nije bilo razlike u ishodu bolesti između pacijentkinja sa nižim i višim Ki67 indeksima. U pogledu prognostičkog značaja ovog parametra postoje neslaganja. Prema EGTM ekspertskom panelu Ki67 može da se koristi u kombinaciji sa drugim prognostičkih faktorima radi određivanja prognoze bolesti posebno u grupama sa niskom ( $< 10\%$  obojenih ćelija) ili visokom ekspresijom ( $> 25\%$  obojenih ćelija) [78]. Zbog niske reproducibilnosti testa, formirana je Internacionalna radna grupa za određivanje Ki67 kod karcinoma dojke 2011. godine, ali do danas metoda nije u potpunosti standardizovana [95]. Zbog toga, ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) ne preporučuje korišćenje Ki67 kao prognostičkog faktora kod karcinoma dojke u rutinskoj praksi [77].

Rezultati naše studije ukazuju na značaj prognostičke vrednosti intratumorskih nivoa uPA i PAI-1 kod pacijentkinja sa ranim HR pozitivnim/HER2 negativnim karcinomima dojke koje su primale adjuvantnu endokrinu terapiju. Pacijentkinje sa  $uPA > 3$  ng/mg proteina imale su značajno kraće DFS i OS, dok su pacijentkinje sa  $PAI-1 > 14$  ng/mg proteina imale značajno kraće OS, što je u skladu sa rezultatima do kojih su došli drugi autori [205,244,207,208,209]. Međutim, nismo uspeli da potvrdimo da združeni povišeni sadržaj oba markera ima bolji prognostički značaj u odnosu na to kada je pozitivan samo jedan od ispitivanih biomarkera. Razlog tome je manji broj pacijentkinja sa diskordantnim nivoima oba markera i, sledstveno tome, i mali broj događaja u ovoj podgrupi pacijentkinja. U našoj ispitivanoj grupi, od 40/81 (49.5%) pacijentkinja sa intratumorskim vrednostima  $uPA > 3$  ng/mg proteina, 38 pacijentkinja je takođe imalo vrednosti  $PAI-1 > 14$  ng/mg proteina. Ovo je u skladu sa studijama koje su sproveli De Cremoux i sar. [239] i Lampelj i sar. [245], u kojima je potvrđena značajna pozitivna korelacija između vrednosti uPA i PAI-1 kod tumora dojke.

Za razliku od ovoga, u poređenju sa podacima do kojih su došli Lampelj i sar. gde je 21% pacijenata sa nodus negativnim tumorima imalo visoke vrednosti oba biomarkera [245], u našem istraživanju je značajno veći broj pacijenata (47%) imao povišene vrednosti oba markera. Ova nepodudarnost u frekvenciji pacijenata obolelih od karcinoma dojke sa visokim vrednostima uPA i PAI-1 između našeg istraživanja i onog koje su sproveli Lampelj i sar. može se bar delimično pripisati razlikama u selekciji ispitanika, odnosno grupi

pacijenata. Druga mogućnost je da je deo tumora koji je poslat u banku tumora IORS-a bio blizu prethodne povrede tkiva biopsijom, uz uslov da je prošlo manje od nedelju dana od biopsije do operativnog zahvata. Procedura u IORS-u je da se preoperativno uradi biopsija tkiva, a potom se zakazuje radikalna hirurška intervencija kod onih kod kojih je to indikovano. Kako je srednje vreme od biopsije do operacije bilo 4 nedelje, malo je verovatno da ovo može biti razlog detekcije visokih nivoa markera u našoj grupi pacijentkinja [246]. S druge strane, Harbeck i sar. su takođe našli da je povišen nivo makar jednog biomarkera zabeležen u 45% pacijenata sa nodus negativnim karcinomima dojke [247] što je nešto niže nego u našoj grupi (60%).

Povrh toga, u odnosu na standardne referentne granične vrednosti za uPA i PAI-1 (3 ng/mg proteina za uPA and 14 ng/mg proteina za PAI-1), ROC granične vrednosti (5.65 ng/mg za uPA and 27.10 ng/mg za PAI-1) imaju pouzdaniji diskriminativni potencijal da odvoje pacijente u podgrupe sa boljim i lošijim ishodom bolesti. Naši rezultati sugerišu da podizanje standardnih uPA i PAI-1 graničnih vrednosti može doprineti boljem diskriminativnom učinku oba markera u prognozi bolesti u ispitivanoj grupi pacijentkinja. Štaviše, ovi pacijenti bi imali veliku korist od ove analize u smislu dalje klasifikacije na grupe sa boljom i lošijom prognozom. Uzimajući u obzir da je ispitivana grupa mala i da komparacija multiplih poređenja između malih podgrupa ne može u ovom trenutku dati pouzdane rezultate, odvojili smo posebno grupu sa oba markera povišena i uporedili sa ishodom bolesti ostalih pacijentkinja. Tako smo dobili relevantan rezultat da kada su oba markera iznad graničnih vrednosti da te pacijentkinje imaju značajno lošiji ishod bolesti (DFS, OS i EFS) u odnosu na pacijentkinje sa tumorima koji imaju sve ostale kombinacije ovih biomarkera.

Nemačka grupa istraživača je pre skoro 20 godina potvrdila prvi put kliničku vrednost uPA/PAI-1 biomarkera u grupi pacijentkinja sa ranim nodus negativnim karcinomima dojke [209]. Kriterijum uključivanja bio je da su dijagnostikovane u stadijumu 1 ili 2 bez zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova (N0 stadijum) i bez poznatog HER2 statusa (u to vreme se nije određivao). Uključene su i pre- i postmenopauzne pacijentkinje, bez obzira na sadržaj steroidnih receptora. Ukupno je analizirano 556 pacijentkinja od kojih je 241 imalo niske nivoe uPA i PAI-1 i nije primalo nikakvu adjuvantnu terapiju. Ostale pacijentkinje imale su visoke nivoe bilo jednog ili oba markera i one su randomizovane na granu bez adjuvantne hemioterapije i granu sa adjuvantnom CMF hemioterapijom (A-CMF protokol: kombinacija ciklofosfamida, metotreksata i 5-fluorouracila). Ni jedna pacijentkinja nije primala adjuvantnu hormonsku terapiju. U ovoj studiji upoređeni su ishodi lečenja između podgrupe sa niskim i podgrupe sa visokim nivoima markera u grani koja nije lečena adjuvantnom hemioterapijom i grani koja je lečena A-CMF hemioterapijom. U grani bez A-CMF 3-godišnja stopa relapsa kod pacijentkinja sa tumorima sa niskim sadržajem uPA i PAI-1 (n=208) iznosila je 6.7% (95%CI 2.5% - 10.8%) prema 14.7% (95%CI 8.5% - 20.9%) kod pacijentkinja sa tumorima sa visokim nivoom markera (n=166) (Log-rank test,  $p < 0.006$ ). Potom je urađeno poređenje DFS u grupi pacijentkinja sa tumorima sa visokim nivoom biomarkera između podgrupe lečene A-CMF (n=88) i podgrupe koja nije lečena adjuvantnom terapijom (n=94). Prva analiza pokazala je da primena hemioterapije značajno smanjuje rizik od pojave relapsa bolesti: 3-godišnja stopa relapsa 12.0% (95%CI 3.9% - 20.2%) prema 18.1% (95%CI 9% - 27.1%), što znači da A-CMF smanjuje relativni rizik od relapsa bolesti u ovoj grupi pacijentkinja za više od 70% (RR 0.27, 95% CI 0.09 to 0.78,  $p < 0.16$ ). Multivarijantna analiza koja je obuhvatila klasične faktore prognoze: veličina (T1 vs T2) i gradus tumora (G1 vs G2 vs G3), status HR (pozitivni prema negativni), životno doba (<50 godina prema  $\geq 50$  godina), pokazala je da su nivoi uPA/PAI-1 i gradus tumora nezavisni faktori prognoze gde visok nivo uPA/PAI-1 i visok gradus tumora (G3) tri puta povećavaju rizik za relaps bolesti [HR 2.8, (95%CI 1.3-6.0,  $p = 0.007$ ), odnosno HR 3.4 (95%CI 1.7-6.8,  $p = 0.007$ )].

Nakon deset godina praćenja [240] ažurirani podaci potvrđuju prve rezultate: u grupi nelečenih pacijenata visok nivo uPA/PAI-1 povezan je sa značajno nižom 10-god stopom ukupnog preživljavanja (79.1%) u poredjenju sa grupom sa tumorima sa niskim nivoima oba markera (89.8%). To znači da je rizik od relapsa bolesti bio skoro 2 puta veći kod visokih nivoa markera (HR 1.94; 95%CI=1.16–3.24;  $p = 0.01$ ). U multivarijantnoj analizi ponovo je gradus tumora bio nezavisni faktor prognoze sa 2.3 puta većim rizikom za relaps bolesti u grupi sa tumorima gradusa 3. Takođe,

pokazano je da u grupi sa visokim nivoima markera pacijentkinje lečene A-CMF imaju značajno manju 10-god stopu relapsa od nelečenih pacijentkinja: apsolutna razlika 10.8% [32.1% (95%CI 22.9–43.8%) prema 21.3% (95%CI=13.9–31.9%),  $p=0.019$ ]

Početakom 2000-ih objavljena je meta analiza koja je objedinila rezultate nekoliko baza podataka i uključila je preko 8000 pacijentkinja u analizu. U periodu praćenja od 6.5 godina relaps karcinoma dojke zabeležen je kod 35% pacijentkinja. Pored nodusnog statusa najznačajniji prognostički faktor loše prognoze bio je visok intratumorski nivo uPA i PAI-1, što može doprineti individualizovanju strategije adjuvantnog lečenja [234]. Jedan od zaključaka bio je da u nodus negativnoj grupi pacijentkinja nivo uPA i PAI-1 markera je koristan u planiranju terapijskog pristupa.

Što se tiče značaja intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 u predikciji odgovora na hemioterapiju, još je pre više godina potvrđeno da viši nivoi oba markera imaju prediktivni značaj u odgovoru na adjuvantnu hemioterapiju [162]. Urađena je analiza dve grupe pacijentkinja sa ranim karcinomima dojke (Minhenska i Roterdamska grupa), ukupno 3424 pacijentkinje. Pacijentkinje su lečene prema važećim protokolima u to vreme, najveći broj primenom CMF hemioterapije, a 20% iz obe grupe, primao je hemioterapiju koja sadrži antracikline. Takođe, posebno su posmatrane nodus negativna i nodus pozitivna podgrupa. Nakon 81 meseca praćenja, rezultati pokazuju da pacijentkinje sa visokim intratumorskim nivoima uPA i PAI-1 imaju dva puta veći rizik za relaps bolesti od pacijentkinja sa niskim nivoima oba biomarkera (HR 2.0, 95%CI 1.8–2.3, Cox multivariate analysis,  $p<0.001$ ). Isto tako, pacijentkinje sa visokim nivoima biomarkera imaju značajno veću korist od hemioterapije, odnosno rizik za relaps bolesti smanjen je za više od 30% (test za interakciju za celu grupu  $p<0.003$ , HR 0.68, 95% CI 0.53-0.88). To je pokazano posebno i za nodus negativnu i za nodus pozitivnu podgrupu. Intratumorski nivoi uPA i PAI-1 nisu bili prediktivni za odgovor na adjuvantnu hormonsku terapiju.

Kasnije su Borstnar i sar. [248] objavili rezultate retrospektivne analize u istoj kohorti pacijentkinja koje su bile izbalansirane po svim faktorima rizika osim prema vrsti adjuvantne hemioterapije koju su primale: jedna grupa lečena je A-CMF terapijom ( $n=100$ ), a druga antraciklinima (kombinacije koje uključuju doksorubicin ili epirubicin) ( $n=80$ ). Svaka terapijska grana bila je podeljena na dve podgrupe: na podgrupu sa visokim i podgrupu sa niskim nivoom uPA/PAI-1 biomarkera. U grani lečenoj A-CMF zabeleženo je značajno kraće preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) kod pacijentkinja sa niskim uPA i PAI-1 intratumorskim nivoima u poređenju sa pacijentkinjama sa visokim intratumorskim nivoima markera [87.1% vs. 77.0% (HR= 2.81, 95% CI = 0.98–8.04,  $p=0.044$ )]. U grani sa antraciklinskom terapijom nije zabeležena razlika u DFS između podgrupe sa niskim i podgrupe sa visokim intratumorskim nivoima uPA i PAI-1 biomarkera [85.2% vs. 81.8% (HR= 2.81, 95% CI = 0.98–8.04), NS]. Ovi rezultati ukazuju na značaj visokih nivoa uPA i PAI-1 u predikciji pozitivnog terapijskog odgovora na antraciklinsku hemioterapiju. Pacijentkinje sa niskim nivoima biomarkera imaju dobru prognozu bez obzira da li su primali A-CMF ili antracikline. Međutim, pacijentkinje sa visokim nivoima biomarkera koje su lečene antraciklinima imaju isti ishod lečenja kao pacijentkinje sa niskim nivoom markera, za razliku od pacijentkinja sa visokim nivoima biomarkera lečenih A-CMF terapijom koje imaju značajno lošiji ishod lečenja.

Poslednjih 15-ak godina u praksu su ušli testovi genskog profilisanja tumora sa ciljem preciznije procene rizika od pojave relapsa bolesti, naročito kod pacijentkinja dijagnostikovanih u ranijem stadijumu bolesti. *Oncotype DX* je bio prvi test koji je na osnovu ekspresije 21 gena u tumoru izračunavao tzv. *recurrence score* (RS), čije su vrednosti od 0 do 100, a na osnovu ovog bodovnog sistema pacijentkinje su podeljene u tri grupe prema 10-god stopi udaljenog relapsa bolesti na: a) grupu sa niskim [6.8 % (95% CI, 4.0 do 9.6)], b) grupu sa intermedijernim [14.3 % (95% CI 8.3 do 20.3)] i c) grupu sa visokim [30.5% (95% CI 23.6 do 37.4)] rizikom za relaps bolesti [164]. Ovaj test je razvijen i validiran na osnovu retrospektivne analize prospektivne NSABP B14 adjuvantne studije kod pacijentkinja sa nodus negativnim HR pozitivnim tumorima lečenih adjuvantnom primenom

tamoksifena [249]. Ova analiza je pokazala da su gradus tumora i RS nezavisni prediktivni faktori pojave udaljenih metastaza, bez obzira na veličinu tumora i životno doba.

U drugoj retrospektivnoj analizi prediktivne uloge *Oncotype DX* u odgovoru na hemioterapiju test je validiran na uzorku pacijentkinja sa nodus negativnim HR pozitivnim karcinomima dojke koje su bile uključene u NSABP B20 studiju [165]. Pacijentkinje su bile randomizovane na granu sa tamoksifenom (5 godina) i granu sa hemioterapijom (CMF ili MF – metotreksat, fluorouracil) i tamoksifenom. Rezultati pokazuju da je test za interakciju između veličine RS i odgovora na hemioterapiju značajan ( $P=0.038$ ). To znači da dodavanje hemioterapije hormonskoj terapiji kod pacijentkinja sa visokim RS ( $> 30$ ) smanjuje 10-godišnji rizik od udaljenog relapsa za 74% [*Relative Risk* (RR) 0.26; 95% CI, 0.13 do 0.53], dok apsolutnu korist ima 27.6% pacijentkinja. Za razliku od ovoga, pacijentkinje sa niskim RS ( $<18$ ) nemaju nikakvu korist od dodavanja hemioterapije hormonskoj terapiji (RR 1.31, 95% CI, 0.46 do 3.78;), dok apsolutna korist iznosi -1.1%, što znači da u grani sa hemioterapijom 1% žena više ima udaljeni relaps bolesti u odnosu na žene koje su primale samo hormonsku terapiju. Međutim, ova studija nije dala odgovor da li pacijentkinje sa RS 18-30 imaju koristi od dodavanja hemioterapije hormonskoj terapiji.

*OncotypeDX* je ispitivan i u prospektivnoj kliničkoj studiji (TAILORx) čiji su rezultati nedavno objavljeni, a čiji je primarni cilj bio da proceni da li pacijentkinje sa intermedijernim rizikom od udaljenog relapsa (RS 11-25) imaju dodatne koristi od dodavanja hemioterapije [168]. Uključene su žene sa nodus negativnim, HR pozitivnim/HER2 negativnim tumorima. Studija je dizajnirana da pokaže da hormonska terapija nije inferiorna u odnosu na kombinovanu hemio-hormonoterapiju kod pacijentkinja sa intermedijernim RS. Primarni cilj bio je preživljavanje bez invazivnog relapsa bolesti (engl. *Invasive disease-free survival – IDFS*) definisan kao pojava invazivnog relapsa karcinoma dojke, drugog primarnog tumora ili smrt bez relapsa bolesti. Rezultati pokazuju da pacijentkinje starije od 50 godina nemaju dodatne koristi od dodavanja hemioterapije hormonskoj terapiji. Međutim, studija je pokazala da bi neke žene mlađe od 50 godina sa RS 16-25 mogle imati dodatne koristi od dodavanja hemioterapije hormonskoj terapiji (apsolutna razlika u 9-god stopi IDFS iznosila je 6.5% u korist kombinovane adjuvantne terapije:  $93.4\% \pm 2.3\%$  prema  $86.9\% \pm 2.9\%$ ).

Kasnija analiza iste grupe pacijentkinja (mlađih od 50 godina) u TAILORx studiji je ispitivala uticaj kliničkog rizika na pojavu udaljenog relapsa bolesti u grupama sa intermedijernim RS [250]. Klinički rizik je definisan na osnovu veličine i gradusa tumora. Tako su ove pacijentkinje bile podeljene na dve podgrupe: a) podgrupa sa niskim kliničkim rizikom (tumor 20 mm – 30 mm gradusa 1, Tu 10 mm – 20 mm gradusa 2 ili tumor  $< 10$  mm gradusa 3) i b) podgrupu sa visokim rizikom (sve ostale kombinacije veličine i gradusa tumora). Rezultati su pokazali da pacijentkinje sa tumorima intermedijernog RS (11-25) i niskim kliničkim rizikom za relaps bolesti imaju 9-god stopu udaljenih metastaza manje 5%, bez obzira da li su primale adjuvantnu hormonsku ili kombinovanu hemio- i hormonsku terapiju ( $4.7\% \pm 1\%$  prema  $3.9\% \pm 1\%$ ). Međutim, u istoj RS grupi mlađih žena koje su imale visok klinički rizik, postojala je značajna razlika u 9-god stopi udaljenih metastaza između dve terapijske grane ( $12.3\% \pm 2.4\%$  prema  $6.1\% \pm 1.8\%$ ). Ovakav rezultat ukazuje na to da je tumorsko opterećenje u trenutku postavljanja dijagnoze ključno u prognozi bolesti, pre svega veličina tumora.

Drugi test genskog profilisanja koji se koristi u cilju identifikovanja pacijenata koji imaju dodatne koristi od hemioterapije je *MammaPrint*, test koji meri ekspresiju 70 gena. Prvi rezultati su pokazali da ovaj test može da napravi razliku između grupe sa niskim rizikom od grupe sa visokim rizikom za relaps bolesti (5-godišnja stopa udaljenih metastaza) među pacijentkinjama mlađim od 55 godina sa T1-T2 nodus negativnim tumorima dojke [251]. Kasnije je ovaj test bio validiran na nezavisnoj grupi od 307 pacijentkinja sa karcinomima dojke koje su praćene više od 13 godina [173]. Ova analiza je pokazala da *MammaPrint* predstavlja nezavisni prognostički faktor, odnosno doprinosi nezavisno prognostičkoj informaciji koja se dobija na osnovu kliničkopatoloških parametara u ranom karcinomu dojke.

Prospektivna studija MINDACT je ispitivala značaj *MammaPrint* eseja u identifikaciji onih pacijentkinja kojima nije potrebna adjuvantna hemioterapija [178]. Ova studija je uključila oko 6700 pacijentkinja sa ranim karcinomima dojke koje su bile podeljene na dve grupe prema riziku za relaps bolesti određenom na osnovu kliničkih parametara korišćenjem instrumenta “*Adjuvant!*” koji je u vreme dizajniranja studije bio u širokoj kliničkoj upotrebi. Svim uključenim pacijentkinjama je iz tumorskog tkiva bio određen *MammaPrint* skor na osnovu ekspresije 70 gena. Na osnovu združenog kliničkog i genomskog rizika pacijentkinje su potom bile podeljene u 4 podgrupe: nizak klinički i genomski rizik (lečene samo hormonskom terapijom), visok klinički i genomski rizik (lečene hemioterapijom i hormonskom terapijom) i 2 podgrupe sa diskordantnim rizicima: a) nizak klinički i visok genomski rizik i b) visok klinički i nizak genomski rizik. Pacijentkinje iz diskordantnih podgrupa bile su randomizovane na granu gde će na osnovu kliničkog rizika biti određeno da primaju hemioterapiju i granu gde će se na osnovu genomskog rizika odrediti da li će primati hemioterapiju. Suštinski, u svakoj grani pacijentkinje su bile podeljene u dve podgrupe: sa i bez hemioterapije, dok su sve pacijentkinje sa HR pozitivnim tumorima primale adjuvantnu hormonsku terapiju. Kriterijumi na osnovu kojih je određen klinički rizik za nodus negativne pacijentkinje sa ER pozitivnim tumorima bili su isti kao u podanalizi TAILORx studije [250], s tom razlikom da su u MINDACT studiju bile uključene i nodus pozitivne pacijentkinje sa 1-3 pozitivna limfna čvora (21%), pacijentkinje sa HR negativnim (11.6%) i HER2 pozitivnim tumorima (9.5%). Ova studija je potvrdila da pacijentkinje sa visokim kliničkim i niskim genomskim rizikom za relaps bolesti nemaju dodatne koristi od primene hemioterapije: 5-godišnja stopa relapsa bolesti sa pojavom udaljenih metastaza iznosila je 95.9% (95% CI, 94%-97.2%) kod pacijentkinja lečenih hemioterapijom, a kod onih bez iznosila je 94.4% (95% CI, 92.3%-95.9%). Nadalje, u grupi sa niskim kliničkim i visokim genomskim rizikom, nije bilo razlike u 5-godišnjoj stopi udaljenog relapsa bolesti između pacijentkinja koje su primale adjuvantnu hemioterapiju i pacijentkinja bez hemioterapije. Ažurirani podaci nakon 8.7 godina praćenja, potvrđuju kliničku korisnost i prognostičku vrednost *MammaPrint* testa, jer se pokazalo da je u diskordantnoj grupi sa klinički visokim i genomski niskim rizikom za relaps koje su lečene samo adjuvantnom hormonskom terapijom, 5-godišnja stopa udaljenog relapsa u trenutku kada je više od 90% pacijentkinja praćeno 5 godina, iznosila 95.1% (95% CI 93.1- 96.6%) [252].

Ovaj rezultat potvrđuje da je klinički rizik, odnosno malo opterećenje bolešću u trenutku postavljanja dijagnoze važan prognostički faktor. Postavlja se pitanje da li je bilo kakvo dodatno testiranje neophodno kod HR pozitivnih/HER2 negativnih tumora manjih od 10 mm u nodus negativnoj grupi pacijentkinja. Nedavno je objavljena analiza realnih podataka iz prakse gde je posmatran ishod bolesti (DFS i OS) u grupama T1a i T1b / N0 pacijentkinja koje su dijagnostikovane u jednom onkološkom centru u periodu između 2009. i 2018. godine [253]. Od oko 2300 pacijentkinja kod polovine je određen RS na osnovu *Oncotype DX* testiranja. U poređenju sa netestiranom, testirana podgrupa je imala značajno više pacijentkinja sa T1b tumorima (82.3% prema 54.7%), sa ER pozitivnim i PR pozitivnim tumorima (92.17% prema 88.43%), sa tumorima gradusa 2 i 3 (53.4%, prema 43.7%) i značajno veći broj primao je, kako adjuvantnu hemioterapiju (10% prema 3.6%), tako i adjuvantnu hormonsku terapiju (93.1% prema 78.2%). Nakon medijane praćenja od 43 meseca [interkvartilni (*IQR – interquartile*) opseg 22–67], nije bilo razlike u broju pacijentkinja sa pojavom relapsa bolesti (1.4% prema 2.3%), kao ni razlike u broju pacijentkinja sa udaljenim metastazama. Međutim, stopa mortaliteta je bila značajno manja u testiranoj u poređenju sa netestiranom podgrupom (2.1% prema 5.9%,  $p < 0.01$ ). Ono što je moglo da se očekuje kod malog tumorskog opterećenja, to je da je mali procenat ovih pacijentkinja imao  $RS > 31$  (4.4%), dok je  $RS < 18$  imalo 66.3% pacijentkinja. Značajno veći broj pacijentkinja sa visokim RS primao je adjuvantnu hemioterapiju u odnosu na ostale pacijentkinje. Multivarijantna analiza (*inverse probability of treatment weighting - IPW model*), koja je uzela u obzir životno doba, rasu, status hormonskih receptora, veličinu i gradus tumora, tip hirurške intervencije, primenu hemio- i hormonske terapije, pokazala je da testiranje nije udruženo sa produženim OS, ali jeste sa produženjem DFS za 16.5 meseci. Autori zaključuju da rezultati potvrđuju da treba raditi *Oncotype DX* test kod svih pacijentkinja sa tumorima  $\geq T1b$ .

U MINDACT studiji [178] svi tumori manji od 10 mm gradusa 1-3 bili svrstani u grupu sa klinički niskim rizikom, ali rezultati pokazuju da i u slučaju kada je genomski rizik visok (određen testom ekspresije 70 gena), to ne utiče na ishod bolesti ovih pacijentkinja. U našoj grupi ispitanica bilo je samo 3 pacijentkinje sa tumorima do 10 mm, tako da nije mogla da se uradi analiza da li intratumorski nivo uPA i PAI-1 utiče na ishod bolesti kod ovih pacijentkinja.

Danas postoje i testovi druge generacije koji mere ekspresiju gena, kao što su *Endopredict*, *PAM 50* ili *Breast cancer index* (BCI) koji su ispitivani u retrospektivnim analizama velikih prospektivnih adjuvantnih kliničkih studija u kojima je ispitivana efikasnost adjuvantne hormonske terapije i/ili hemioterapije). *Endopredict CS* (clinical score) pored ekspresije 12 gena uzima u obzir veličinu tumora i broj zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova u trenutku postavljanja dijagnoze [254]. Pored pokazanog prognostičkog značaja u pacijentkinja sa HR pozitivnim i HER2 negativnim tumorima, komparativna nerandomizovana analiza na uzorku pacijentkinja uključenih u adjuvantnu studiju GEICAM 2003-02/9906 pokazala je da *Endopredict CS* test može da identifikuje pacijentkinje koje bi imale dodatne koristi od primene hemioterapije, kao i da može da predvidi povišeni rizik od kasnog relapsa (posle 5 godina od operacije) i tako identifikuje sa većom preciznošću pacijentkinje kod kojih bi produžena adjuvantna hormonska terapija bila indikovana [255].

Poslednjih godina poredi se značaj uPA i PAI-1 sa testovima genske ekspresije tumora dojke. Jedna studija nemačkih autora [256], koji u rutinskoj praksi najviše koriste uPA i PAI-1 određivanje u tumoru i *Endopredict CS*, uporedili su ova dva testa u smislu uticaja na izbor terapije. Oni su ispitivali konkordancu između *Endopredict CS* i uPA i PAI-1 nivoa u 72 pacijentkinje sa karcinomima dojke i upoređivali su rezultate ovih testova sa gradusom tumora, molekularnim fenotipovima tumora i preporukama za primenu hemioterapije. Autori su našli da *Endopredict CS*, za razliku od uPA i PAI-1 testa, više korelira sa kliničkopatološkim parametrima i bio je značajno češće korišćen u odlukama za primenu hemioterapije. Međutim, autori još nisu uradili poređenje ishoda lečenja ovih pacijentkinja, što jeste u planu.

Prošle godine objavljeni su rezultati retrospektivne analize koja je ispitivala uticaj intratumorskih nivoa uPA i PAI-1 i detekcije citokeratin 18 (CK18) pozitivnih tumorskih ćelija u aspiratu kosne srži na ishod lečenja [257]. Pokazano je da udruženost visokih nivoa oba biomarkera i prisustvo diseminovanih (u kosnoj srži) CK18 pozitivnih ćelija značajno utiče na ishod lečenja kod pacijentkinja sa nodus negativnim karcinomima dojke u odnosu na sve ostale kombinacije pozitivnosti markera. Najveća razlika je u ukupnom preživljavanju između podgrupa sa trostruko negativnim i trostruko pozitivnim biomarkerima: 127 meseci (95% CI: 116–138) prema 90 meseci (CI: 75–105). Iako to nije bio primarni cilj, autori su objavili rezultate vezane za prognostički značaj povišenih nivoa pojedinačno uPA i PAI-1 u nodus negativnoj podgrupi pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu hemioterapiju. Pacijentkinje sa povišenim nivoom uPA imale su značajno kraće OS (91 mes 95%CI: 78–103 mes) u odnosu na pacijentkinje sa niskim nivoom uPA (119 mes, 95% CI: 108–129, Log-rank test,  $p < 0.006$ ), kao i one sa visokim nivoom PAI-1 (94 mes 95% CI: 84–103) u odnosu na niske nivoe PAI-1 biomarkera (125 mes, 95% CI: 114–136) (Log-rank test,  $p < 0.004$ ). U nodus negativnoj grupi koja je lečena primenom adjuvantne hemioterapije, prognostički značaj biomarkera se gubi, što govori u prilog tome da pacijentkinje sa tumorima sa povišenim nivoima uPA i PAI-1 imaju korist od hemioterapije.

Prethodne studije, koje su za cilj imale da istraže uticaj genetičke varijabilnosti na sintezu PAI-1, ustanovile su da je 4G alel u promotorskoj regiji *PAI-1* u uskoj vezi sa visokim vrednostima PAI-1 u serumu ili u tumorskom tkivu [226,258]. Međutim, ovo nije potvrđeno u ostalim objavljenim radovima, tako da rezultati ostaju nekonzistentni [227,228]. Naše istraživanje nije pokazalo statistički značajnu asocijaciju između polimorfizma u promotorskoj regiji *PAI-1* i koncentracija PAI-1 u analiziranim kancerima dojke. Međutim, rastući trend koncentracije PAI-1 u tumorima koji imaju recesivni homozigotni genotip *PAI-1* (– 675 4G/4G) (Tabela 7), a koji je prikazan u našem istraživanju, ukazuje na to da bi proširenje veličine ispitivane grupe moglo da utiče na ovaj rezultat.

Pokazali smo značajnu korelaciju između recesivnog homozigotnog genotipa (– 675 4G/4G) *PAI-1* i više vrednosti uPA u tumorskom tkivu, što se nije očekivalo s obzirom na to da se pokazalo da je 4G



alel povezan sa višom ekspresijom *PAI-1*, pa shodno tome i nižim vrednostima uPA [225]. Postoji nekoliko mogućih objašnjenja za ovo neslaganje. Iako recesivni alel dovodi do više ekspresije *PAI-1* proteina, post-translaciona modifikacija i interakcija sa drugim proteinima može dovesti do njegove smanjene aktivnosti, što može uticati na njegov inhibitorski efekat na uPA. Drugo objašnjenje može biti postojanje drugih mehanizama koji utiču na uPA vrednosti i koji su dominantni u poređenju sa inhibicijom koja karakteriše delovanje *PAI-1*.

Takođe smo procenili moguću prognostičku vrednost – 675 4G/5G *PAI-1* varijanti gena. Ova analiza je pokazala da podgrupa pacijentkinja sa heterozigotnim/dominantnim homozigotnim genotipovima (– 675 4G/5G i – 675 5G/5G) ima značajno duži DFS, OS i EFS u odnosu na podgrupu pacijentkinja sa recesivnim homozigotnim genotipom (– 675 4G/4G). Ovi rezultati pokazuju značaj polimorfizma *PAI-1* gena kao prognostičkog biomarkera kod pacijentkinja sa luminalnim HER2-negativnim rakom dojke koji nije zahvatio limfne čvorove. Naši podaci su u saglasnosti sa rezultatima do kojih su došli Zhang i sar. Oni su ustanovili da pacijenti sa tumorom dojke sa homozigotnim 4G alelom *PAI-1* gena imaju značajno smanjen DFS i OS u odnosu na pacijente sa homozigotnim 5G alelom istog gena [229]. Suprotno ovim rezultatima, istraživanje koje su sprovedeli Lei i sar. pokazalo je da su pacijenti sa karcinomom dojke sa 5G/5G homozigotnim genotipom imali niži OS u odnosu na pacijente sa 4G/4G i 4G/5G *PAI-1* genotipovima [230]. Ove razlike se mogu objasniti specifičnim demografskim i molekularnim faktorima koji mogu promeniti efekte *PAI-1* [259].

Postoji više metoda određivanja intratumorskog nivoa uPA i *PAI-1* proteina. U našem radu mi smo koristili ELISA test [260], koji ima svoja ograničenja: potrebno je sveže ili sveže smrznuto tkivo tumora i to velika količina tkiva (minimalno 50 mg), što ograničava njihovo određivanje kod malih tumora (T1b-c) i što je zavisna od povrede tkiva. Biopsija tumora može naknadno na mestu oštećenja tkiva da poveća nivo uPA i *PAI-1* proteina, jer oni učestvuju u procesu zarastanja rana. Jedna analiza nemačkih autora pokazala je da je određivanje intratumorskog nivoa uPA i *PAI-1* u biopsijama tumora dojke konkordantna sa određivanjem ovih biomarkera u celom tumoru i da je potrebno 2-3 uzorka biopsata [260].

Ekspresija proteina može da se meri i IHH analizom koja predstavlja semikvantitativnu analizu prisustva ovih biomarkera na proteinskom nivou. Ova analiza je potencijalno jednostavnija za izvođenje i jeftinija, ali pati od svih nedostataka kao i sve ostale IHH analize (postojanje razlika u proceni između procenjivača i razlika u proceni kod istog procenjivača u različitom vremenskom periodu). Nedavno objavljeno istraživanje je pokazalo da ni uPA ni *PAI-1* vrednosti IHH ekspresije nemaju uticaj na ishod bolesti [261]. Korelacija između ELISA i IHH određivanja uPA i *PAI-1*, kao i značaj njihovog uticaja na ishod bolesti kod karcinoma dojke, nisu konzistentni [244,207- 212]. Iako bi IHH metod, koji se izvodi na parafinskim tumorskim blokovima, bio prihvatljiviji za rutinsku kliničku praksu, IHH određivanje vrednosti uPA i *PAI-1* se trenutno ne preporučuje za upotrebu u kliničkoj praksi [78], ali bi to trebalo da bude predmet budućeg istraživanja [78]. Stoga, ELISA za sada ostaje zlatni standard pri utvrđivanju uPA i *PAI-1* intratumorske koncentracije.

U literaturi postoje dve studije koje su dizajnirane da uporede prediktivni značaj uPA i *PAI-1* nivoa sa testovima genske ekspresije [262] ili kliničko-patološkim faktorima rizika za relaps bolesti [263]. Završni rezultati WSG Plan B trajala objavljeni su prošle godine [262]. Osnovno ispitivačko pitanje bilo je poređenje efikasnosti neantraciklinskog režima adjuvantne hemioterapije (TC – docetaxel i ciklofosfamid) sa antraciklinskim režimom [FEC (fluorouracil, epirubicin, ciklofosfamid) – docetaxel] u grupi pacijentkinja sa nodus negativnim tumorima visokog rizika i nodus pozitivnim tumorima. Rezultati studije su pokazali da neantraciklinska terapija nije inferiorna po efikasnosti od antraciklinske terapije. Ono što je interesantno za diskusiju jeste to što je u početku jedan od kriterijuma za uključivanje pacijenata u nodus negativnoj grupi bio visok intratumorski nivo uPA i *PAI-1*, ali je ubrzo došao amandman da se kod pacijenata radi gensko profilisanje *Oncotype DX* testom. Tako, u multivarijantnu analizu uticaja na ishod lečenja vrednosti uPA i *PAI-1* nisu uzete u obzir. Najavljeno poređenje prognostičkog uticaja uPA i *PAI-1* sa *Oncotype DX* RS za sada nije urađeno.

NNBC3-Europe studija [263] je uključila više od 4000 pacijentkinja sa nodus negativnim karcinomima dojke koja je imala dva cilja: 1) da uporedi dva režima adjuvantne hemioterapije: antraciklinski i kombinaciju antraciklina i taksana i 2) da uporedi ishod lečenja pacijentkinja sa niskim rizikom za relaps bolesti, koje nisu primale adjuvantnu hemioterapiju, a koje su bile podeljene u dve podgrupe prema tome koji su kriterijumi korišćeni za određivanje rizika za relaps bolesti: klinički (visok rizik - gradus tumora 3, < 35 godina, HER2 pozitivni status, PR negativni status) ili biološki kriterijumi kod gradus 2 tumora (intratumorski nivoi uPA i PAI-1). Rezultati ove studije još nisu objavljeni.

Naša analiza je potvrdila korisnost određivanja nivoa uPA i PAI-1 biomarkera pri proceni prognoze bolesti kod HR-pozitivnih/HER2-negativnih pacijentkinja u ranoj fazi karcinoma dojke koji nije zahvatio limfne čvorove, a kod kojih je primenjena adjuvantna endokrinska terapija [264]. Nedavno je objavljena još jedna analiza prognostičkog značaja uPA i PAI-1 intratumorskog nivoa kod pacijentkinja sa nodus negativnim HR pozitivnim tumorima gradusa 2 koje nisu lečene adjuvantnom terapijom [265]. U ovoj studiji pokazano je da pacijentkinje sa niskim nivoom PAI-1 imaju dobru prognozu bez obzira na veličinu tumora, kao i one pacijentkinje sa pT1 tumorima bez obzira na nivo PAI-1. I ovaj rad ukazuje na značaj određivanja uPA i PAI-1 u nodus negativnoj grupi sa HR- pozitivnim karcinomima dojke.

Prema najnovijim preporukama za primenu biomarkera u izboru lečenja pacijenata sa karcinomima dojke uPA i PAI-1, kao i svi testovi genskog profilisanja su preporučeni u pacijentkinja sa nodus negativnim ± nodus pozitivnim uglavnom HR pozitivnim tumorima dojke [78,231,145,266].

## 6. ZAKLJUČCI

1. Od svih ispitivanih klasičnih faktora prognoze (veličina i gradus tumora, procenat ER u tumorskim ćelijama i Ki67 indeks), samo je veličina tumora bila od prognostičkog značaja: pacijentkinje sa tumorima većim od 30 mm imale su značajno kraće DFS i EFS u odnosu na pacijentkinje sa tumorima do 20 mm ili manjim. Nivoi uPA i PAI-1 ne utiču na ovaj rezultat, budući da nije zabeležena udruženost između veličine tumora i nivoa uPA i PAI-1.
2. Rezultati naše studije su pokazali da postoji značajna udruženost intratumorskog nivoa uPA i PAI-1 i ekspresije Ki67: karcinomi sa  $Ki67 \geq 15\%$  imali su značajno više nivoa PAI-1 u odnosu na karcinome sa  $Ki67 < 15\%$ , ali nije bilo razlike u ishodu bolesti između pacijentkinja sa nižim i višim Ki67 indeksima.
3. Rezultati naše studije ukazuju na značaj prognostičke vrednosti intratumorskih nivoa uPA i PAI-1 kod pacijentkinja sa ranim HR pozitivnim / HER2 negativnim karcinomima dojke koje su primale adjuvantnu endokrinu terapiju. Pacijentkinje sa uPA > 3 ng/mg proteina imale su značajno kraće DFS i OS, dok su pacijentkinje sa PAI-1 > 14 ng/mg proteina imale značajno kraće OS.
4. U odnosu na standardne referentne granične vrednosti za uPA i PAI-1 (3 ng/mg proteina za uPA i 14 ng/mg proteina za PAI-1), ROC granične vrednosti (5.65 ng/mg za uPA i 27.10 ng/mg za PAI-1) imaju pouzdaniji diskriminativni potencijal da odvoje pacijentkinje u podgrupe sa boljim i lošijim ishodom bolesti. Naši rezultati sugerišu da podizanje standardnih uPA i PAI-1 graničnih vrednosti može doprineti boljem diskriminativnom učinku oba markera u prognozi bolesti u ispitivanoj grupi pacijentkinja.
5. Pacijentkinje sa tumorima koji imaju recesivni genotip inserciono/delecionog polimorfizma na poziciji -675 promotorske regije *PAI-1* gena (- 675 4G/4G) imaju značajno kraće DFS, OS i EFS u poređenju sa pacijentkinjama sa tumorima heterozigotnog (- 675 4G/5G) i dominantno homozigotnog genotipa (-675 5G/5G).

## LITERATURA

1. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2019 with focus on breast cancer. *Ann Oncol.* 2019;30(5):781-7.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
3. Registar za rak u centralnoj Srbiji. Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2015. Beograd: Institut za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“; izveštaj broj 17; 2017.
4. Youlden DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* 2012;36(3):237-48.
5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(1):10-29.
6. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2893–917.
7. 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(9801):1461–84.
8. Broeders M, Moss S, Nyström L, Njor S, Jonsson H, Paap E, Massat N, Duffy S, Lynge E, Paci E; EUROSCREEN Working Group. The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies. *J Med Screen.* 2012;19 (Suppl 1):14-25.
9. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 2012;13(8):790–801.
10. Pan H, Gray R, Braybrooke J, Davies C, Taylor C, McGale P, Peto R, Pritchard KI, Bergh J, Dowsett M, Hayes DF; EBCTCG. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *N Engl J Med.* 2017;377(19):1836-46.
11. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist.* 2004;9(6):606–16.
12. Gasparini G, Pozza F, Harris AL. Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85(15):1206-19.
13. Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat.* 1998;52(1-3):305-19.
14. Henry NL, Somerfield MR, Abramson VG, Allison KH, Anders CK, Chingos DT, Hurria A, Openshaw TH, Krop IE. 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. *J Clin Oncol.* 2016;34(19):2303-11.

15. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(7):e48-72.
16. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(1):18-43.
17. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR (editors). *AJCC Cancer Staging Manual.* 8<sup>th</sup> Edition. Springer International Publishing; 2017.
18. Washbrook E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Health Med.* 2006;3(1):8-14.
19. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet.* 1997; 350(9804):1047-59.
20. Fowble BL, Schultz DJ, Overmoyer B, Solin LJ, Fox K, Jardines L, Orel S, Glick JH. The influence of young age on outcome in early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994;30(1):23-33.
21. Hakama M, Riihimaki H. End results of breast cancer patients in Finland 1953-1968. *Ann Clin Res.* 1974;6(2):115-21.
22. 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(2):123-32.
23. 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(2):916-23.
24. Hibberd AD, Horwood LJ, Wells JE. Long term prognosis of women with breast cancer in New Zealand: study of survival to 30 years. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1983;286(6380):1777-9.
25. Keegan TH, DeRouen MC, Press DJ, Kurian AW, Clarke CA. Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. *Breast Cancer Res.* 2012;14(2):R55.
26. Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One.* 2009;4(11):e7695.
27. Azim HA Jr, Michiels S, Bedard PL, Singhal SK, Criscitiello C, Ignatiadis M, Haibe-Kains B, Piccart MJ, Sotiriou C, Loi S. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clin Cancer Res.* 2012;18(5):1341-51.

28. Eheman CR, Shaw KM, Ryerson AB, Miller JW, Ajani UA, White MC. The changing incidence of *in situ* and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(6):1763-9.
29. Dossus L, Benusiglio PR. Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Res.* 2015;17:37.
30. Berg JW, Hutter RV. Breast cancer. *Cancer.* 1995;75(1 Suppl):257-69.
31. Carstens PH, Greenberg RA, Francis D, Lyon H. Tubular carcinoma of the breast. A long term followup. *Histopathology.* 1985;9(3):271-80.
32. Jaso J, Malhotra R. Adenoid cystic carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(4):511-5.
33. 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.
34. 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.
35. Treatment of Early-Stage Breast Cancer. NIH Consens Statement. 1990;8(6):1-19.
36. Donegan WL. Prognostic factors. Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer.* 1992;70(6 Suppl):1755-64.
37. Ferno M. Prognostic factors in breast cancer: a brief review. *Anticancer Res.* 1998;18(3C):2167-71.
38. 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.
39. Fisher ER, Costantino J, Fisher B, Redmond C. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol 4). Discriminants for 15-year survival. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators. *Cancer.* 1993;71(6 Suppl):2141-50.
40. Fung F, Cornacchi SD, Vanniyasingam T, Dao D, Thabane L, Simunovic M, Hodgson N, O'Brien MA, Reid S, Heller B, Lovrics PJ. Predictors of 5-year local, regional, and distant recurrent events in a population-based cohort of breast cancer patients. *Am J Surg.* 2017;213(2):418-25.
41. Andea A, Bouwman D, Wallis T, Visscher W. Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer.* 2004;100(1):20-7.
42. Hermanek P, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH (editors). International Union Against Cancer. TNM supplement 1993. A commentary on uniform use. Berlin: Springer; 1993.
43. 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.
44. 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.
45. 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.

46. Metzger Filho O, Ignatiadis M, Sotiriou C. Genomic Grade Index: An important tool for assessing breast cancer tumor grade and prognosis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;77(1):20-9.
47. Blamey RW, Ellis IO, Pinder SE, Lee AH, Macmillan RD, Morgan DA, Robertson JF, Mitchell MJ, Ball GR, Haybittle JL, Elston CW. Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990-1999. *Eur J Cancer*. 2007;43(10):1548-55.
48. Elston W, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*.1991;19(5):403-10.
49. Ryu YJ, Kang SJ, Cho JS, Yoon JH, Park MH. Lymphovascular invasion can be better than pathologic complete response to predict prognosis in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(30):e11647.
50. Elston CW, Ellis IO, Goulding H. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. In: Elston CW, Ellis IO, editors. *The Breast*. London:Churchill Livingstone; 1998; p.385-433.
51. Ejlersen B, Jensen MB, Rank F, Rasmussen BB, Christiansen P, Kroman N, Kvistgaard ME, Overgaard M, Toftdahl DB, Mouridsen HT; Danish Breast Cancer Cooperative Group. Population-based study of peritumoral lymphovascular invasion and outcome among patients with operable breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):729-35.
52. 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.
53. Lee AH, Pinder SE, Macmillan RD, Mitchell M, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer*. 2006;42(3):357-62.
54. Song YJ, Shin SH, Cho JS, Park MH, Yoon JH, Jegal YJ. The role of lymphovascular invasion as a prognostic factor in patients with lymph node-positive operable invasive breast cancer. *J Breast Cancer*. 2011;14(3):198-203.
55. Schnitt SJ. Traditional and newer pathologic factors. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001;(30):22-6.
56. Fisher ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers (protocol no. 4). X. Discriminants for tenth year treatment failure. *Cancer*. 1984;53(3 Suppl):712-23.
57. 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.
58. Ries LAG, 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.
59. 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(12):2917-24.

60. Goldhirsch A, Glick H, Gelber D, Coates S, Senn J. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19(18):3817-27.
61. Rosen PP, Saigo PE, Braun DW. Prognosis in stage II (T1N1M0) breast cancer. *Ann Surg.* 1981; 194(5):576-84.
62. 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.
63. Paoletti C, Hayes DF. Molecular testing in breast cancer. *Annu Rev Med.* 2014;65:95-110.
64. Dekker TJ, Smit VT, Hooijer GK, Van de Vijver MJ, Mesker WE, Tollenaar RA, Nortier JW, Kroep JR. Reliability of core needle biopsy for determining ER and HER2 status in breast cancer. *Ann Oncol.* 2013;24(4):931-7.
65. Dekker TJA, ter Borg S, Hooijer GKJ, Meijer SL, Wesseling J, Boers JE, Schuurung E, Bart J, van Gorp J, Bult P, Riemersma SA, van Deurzen CHM, Sleddens HFBM, Mesker WE, Kroep JR, Smit VTHBM, van de Vijver MJ. Quality assessment of estrogen receptor and progesterone receptor testing in breast cancer using a tissue microarray-based approach. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;152(2):247-52.
66. Noordhoek I, de Groot AF, Cohen D, Liefers GJ, Portielje JEA, Kroep JR. Higher ER load is not associated with better outcome in stage 1-3 breast cancer: a descriptive overview of quantitative HR analysis in operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;176(1):27-36.
67. Allred DC, Brown P, Medina D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004;6(6):240-5.
68. Louie MC, Sevigny MB. Steroid hormone receptors as prognostic markers in breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2017;7(8):1617-36.
69. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2007;9(1):R6.
70. Johnston SR, Sacconi-Jotti G, Smith IE, Salter J, Newby J, Coppen M, Ebbs SR, Dowsett M. Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer. *Cancer Res.* 1995;55(15):3331-8.
71. Horwitz KB, McGuire WL. Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. *Science.* 1975;189(4204):726-7.
72. Nordenskjöld A, Fohlin H, Fornander T, Löfdahl B, Skoog L, Stål O. Progesterone receptor positivity is a predictor of long-term benefit from adjuvant tamoxifen treatment of estrogen receptor 35 positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;160(2):313-22.
73. Stendahl M, Rydén L, Nordenskjöld B, Jönsson PE, Landberg G, Jirstrom K. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2006;12(15):4614-8.
74. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol.* 2003;21(10):1973-9.
75. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2011;378(9793):771-84.



76. Dowsett M, Houghton J, Iden C, Salter J, Farndon J, A'Hern R, Sainsbury R, Baum M. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol.* 2006;17(5):818-26.
77. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, Hammond EH, Kuderer NM, Liu MC, Mennel RG, Van Poznak C, Bast RC, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology. 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. *J Clin Oncol.* 2016;34(10):1134-50.
78. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, Cardoso F. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer.* 2017;75:284-98.
79. Nicolini A, Ferrari P, Duffy MJ. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Semin Cancer Biol.* 2018;52(Pt 1):56-73.
80. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 1998;351(9114):1451-67.
81. 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.
82. American Cancer Society. Targeted Therapy for Breast Cancer. Available at URL <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/targeted-therapy-for-breast-cancer.html>.
83. Rimawi MF, Schiff R, Osborne CK. Targeting HER2 for the treatment of breast cancer. *Annu Rev Med.* 2015;66:111-28.
84. Chung I, Reichelt M, Shao L, Akita RW, Koeppen H, Rangell L, Schaefer G, Mellman I, Sliwkowski MX. High cell-surface density of HER2 deforms cell membranes. *Nat Commun.* 2016;7:12742.
85. Anderson WF, Rosenberg PS, Katki HA. Tracking and evaluating molecular tumor markers with cancer registry data: HER2 and breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(5):dju093.
86. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (editors). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2017/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/), based on November 2019 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2020.)
87. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, Bilous M, Ellis IO, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, McShane LM, Dowsett M. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol.* 2018;36(20):2105-22.
88. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987; 235(4785):177-82.
89. Prati R, Apple SK, He J, Gornbein JA, Chang HR. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. *Breast J.* 2005;11(6):433-9.

90. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Fernö M, Fuqua SA, Killander D, McGuire WL. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.* 1990; 50(14):4332-7.
91. Martin M, López-Tarruella S. Emerging therapeutic options for HER2-positive breast cancer. *emerging therapeutic options for HER2-positive breast cancer. Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2016;35:e64-70.
92. Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;153(3):477-91.
93. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, Ortman O. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(2):539-52.
94. Keshgegian A, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol.* 1995;104(1):42-9.
95. Leung SCY, Nielsen TO, Zabaglo L, Arun I, Badve SS, Bane AL, Bartlett JMS, Borgquist S, Chang MC, Dodson A, Enos RA, Fineberg S, Focke CM, Gao D, Gown AM, Grabau D, Gutierrez C, Hugh JC, Kos Z, Lænkholm AV, Lin MG, Mastropasqua MG, Moriya T, Nofech-Mozes S, Osborne CK, Penault-Llorca FM, Piper T, Sakatani T, Salgado R, Starczynski J, Viale G, Hayes DF, McShane LM, Dowsett M. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration. *NPJ Breast Cancer.* 2016;2:16014.
96. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin P, Hayes M, Gelmon K. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):174-83.
97. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Aksten LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
98. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011 ;22(8):1736-47.
99. Schwartz GF, Veronesi U, Clough KB, Dixon JM, Fentiman IS, Heywang-Köbrunner SH, Holland R, Hughes KS, Mansel RE, Margolese R, Mendelson EB, Olivotto IA, Palazzo JP, Solin LJ; Consensus Conference Committee. Consensus conference on breast conservation. *J Am Coll Surg.* 2006;203(2):198-207.
100. McCahill LE, Single RM, Aiello Bowles EJ, Feigelson HS, James TA, Barney T, Engel JM, Onitilo AA. Variability in reexcision following breast conservation surgery. *JAMA.* 2012;307(5):467-75.
101. Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, Dixon JM, Irwig L, Brennan ME, Solin LJ. Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur J Cancer.* 2010;46(18):3219-32.

102. Moran MS, Schnitt SJ, Giuliano AE, Harris JR, Khan SA, Horton J, Klimberg S, Chavez-MacGregor M, Freedman G, Houssami N, Johnson PL, Morrow M. Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(3):704-16.
103. Bellon JR, Harris EE, Arthur DW, Bailey L, Carey L, Goyal S, Halyard MY, Horst KC, Moran MS, MacDonald SM, Haffty BG; American College of Radiology. ACR Appropriateness Criteria<sup>®</sup> conservative surgery and radiation-stage I and II breast carcinoma: expert panel on radiation oncology: breast. *Breast J*. 2011;17(5):448-55.
104. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB 3rd, Bodurka DC, Burstein HJ, Cochran AJ, Cody HS 3rd, Edge SB, Galper S, Hayman JA, Kim TY, Perkins CL, Podoloff DA, Sivasubramaniam VH, Turner RR, Wahl R, Weaver DL, Wolff AC, Winer EP; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7703-20.
105. Lyman GH, Temin S, Edge SB, Newman LA, Turner RR, Weaver DL, Benson AB 3rd, Bosserman LD, Burstein HJ, Cody H 3rd, Hayman J, Perkins CL, Podoloff DA, Giuliano AE; American Society of Clinical Oncology Clinical Practice. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2014;32(13):1365-83.
106. Kim T, Giuliano AE, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma: a metaanalysis. *Cancer*. 2006;106(1):4-16.
107. Overgaard M, Hansen PS, Overgaard J, Rose C, Andersson M, Bach F, Kjaer M, Gadeberg CC, Mouridsen HT, Jensen MB, Zedeler K. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. *N Engl J Med*. 1997;337(14):949-55.
108. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9804):1707-16.
109. Velikova G, Williams LJ, Willis S, Dixon JM, Loncaster J, Hatton M, Clarke J, Kunkler IH, Russell NS; MRC SUPREMO trial UK investigators. Quality of life after postmastectomy radiotherapy in patients with intermediate-risk breast cancer (SUPREMO): 2-year follow-up results of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(11):1516-29.
110. Flatley MJ, Dodwell DJ. Adjuvant treatment for breast cancer. *Surgery (Oxford)* 2019; 37(3): 176-80.
111. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME, Meijnen P, van de Velde CJ, Mansel RE, Cataliotti L, Westenberg AH, Klinkenbijn JH, Orzalesi L, Bouma WH, van der Mijle HC, Nieuwenhuijzen GA, Veltkamp SC, Slaets L, Duez NJ, de Graaf PW, van Dalen T, Marinelli A, Rijna H, Snoj M, Bundred NJ, Merkus JW, Belkacemi Y, Petignat P, Schinagl DA, Coens C, Messina CG, Bogaerts J, Rutgers EJ. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):1303-10.
112. Pondé NF, Zardavas D, Piccart M. Progress in adjuvant systemic therapy for breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(1):27-44.

113. Ravdin PM, Siminoff LA, Davis GJ, Mercer MB, Hewlett J, Gerson N, Parker HL. Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(4):980-91.
114. Wishart GC, Bajdik CD, Azzato EM, Dicks E, Greenberg DC, Rashbass J, Caldas C, Pharoah PD. A population-based validation of the prognostic model PREDICT for early breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2011;37(5):411-7.
115. Michaelson JS, Chen LL, Bush D, Fong A, Smith B, Younger J. Improved web-based calculators for predicting breast carcinoma outcomes. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;128(3):827-35.
116. Lundin J, Lundin M, Isola J, Joensuu H. A web-based system for individualised survival estimation in breast cancer. *BMJ*. 2003;326(7379):29.
117. Fisher B, Ravdin RG, Ausman RK, Slack NH, Moore GE, Noer RJ. Surgical adjuvant chemotherapy in cancer of the breast: results of a decade of cooperative investigation. *Ann Surg*. 1968;168(3):337-56.
118. Fisher B, Carbone P, Economou SG, Frelick R, Glass A, Lerner H, Redmond C, Zelen M, Band P, Katrych DL, Wolmark N, Fisher ER. 1-Phenylalanine mustard (L-PAM) in the management of primary breast cancer. A report of early findings. *N Engl J Med*. 1975;292(3):117-22.
119. Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnatelli L, Brambilla C, De Lena M, Tancini G, Bajetta E, Musumeci R, Veronesi U. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med*. 1976;294(8):405-10.
120. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-717.
121. Anampa J, Makower D, Sparano JA. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. *BMC Med*. 2015;13:195.
122. Hortobágyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*. 1997;54 (Suppl 4):1-7.
123. Tan C, Etcubanas E, Wollner N, Rosen G, Gilladoga A, Showel J, Murphy ML, Krakoff IH. Adriamycin-an antitumor antibiotic in the treatment of neoplastic diseases. *Cancer*. 1973;32(1):9-17.
124. Sparano JA. Use of dexrazoxane and other strategies to prevent cardiomyopathy associated with doxorubicin-taxane combinations. *Semin Oncol*. 1998;25(4 Suppl 10):66-71.
125. Torti FM, Bristow MM, Lum BL, Carter SK, Howes AE, Aston DA, Brown BW Jr, Hannigan JF Jr, Meyers FJ, Mitchell EP, Billingham ME. Cardiotoxicity of epirubicin and doxorubicin: assessment by endomyocardial biopsy. *Cancer Res*. 1986;46(7):3722-7.
126. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*. 1971;93(9):2325-7.
127. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature*. 1979;277(5698):665-7.
128. Horwitz SB. Personal recollections on the early development of taxol. *J Nat Prod*. 2004;67(2):136-8.

129. Ringel I, Horwitz SB. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83(4):288–91.
130. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med.* 1995;332(15):1004–14.
131. Schrijvers D, Wanders J, Dirix L, Prove A, Vonck I, van Oosterom A, Kaye S. Coping with toxicities of docetaxel (Taxotere). *Ann Oncol.* 1993;4(7):610-1.
132. Sommer S, Fuqua SA. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 2001;11(5):339–52.
133. Jordan VC. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1994;31(1):41–52.
134. Clemons M, Danson S, Howell A. Tamoxifen (“Nolvadex”): a review. *Cancer Treat Rev.* 2002;28(4):165–80.
135. Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(7):527-37.
136. Bland KI, Copeland EM. *The Breast E-Book: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases.* Philadelphia: Elsevier Inc Saunders; 2009.
137. Lønning PE, Bajetta E, Murray R, Tubiana-Hulin M, Eisenberg PD, Mickiewicz E, Celio L, Pitt P, Mita M, Aaronson NK, Fowst C, Arkhipov A, di Salle E, Polli A, Massimini G. Activity of exemestane in metastatic breast cancer after failure of nonsteroidal aromatase inhibitors: a phase II trial. *J Clin Oncol.* 2000;18(11):2234-44.
138. Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, Forbes JF; ATAC/LATTE investigators. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(12):1135-41.
139. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist.* 2003;8(4):307-25.
140. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Grotzer T, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1659–72.
141. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1673-84.
142. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, Goldhirsch A, Untch M, Mariani G, Baselga J, Kaufmann M, Cameron D, Bell R, Bergh J, Coleman R, Wardley A, Harbeck N, Lopez RI, Mallmann P, Gelmon K, Wilcken N, Wist E, Sánchez Rovira P, Piccart-Gebhart MJ; HERA study team. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007; 369(9555):29-36.

143. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkanen M, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkiö S, Flander M, Helle L, Ingalsuo S, Johansson K, Jääskeläinen AS, Pajunen M, Rauhala M, Kaleva-Kerola J, Salminen T, Leinonen M, Elomaa I, Isola J; FinHer Study Investigators. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;354(8):809-20.
144. Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, Murphy M, Stewart SJ, Keefe D. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol.* 2002;20(5):1215–21.
145. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, Zackrisson S, Senkus E; ESMO Guidelines Committee. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 2019;30(8):1194-220.
146. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-23.
147. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* 2015;5(10):2929-43.
148. Lohrisch C, Paltiel C, Gelmon K, Speers C, Taylor S, Barnett J, Olivotto IA. Impact on survival of time from definitive surgery to initiation of adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(30):4888-94.
149. Bliss JM, Kilburn LS, Coleman RE, Forbes JF, Coates AS, Jones SE, Jassem J, Delozier T, Andersen J, Paridaens R, van de Velde CJ, Lønning PE, Morden J, Reise J, Cisar L, Menschik T, Coombes RC. Disease-related outcomes with long-term follow-up: an updated analysis of the intergroup exemestane study. *J Clin Oncol.* 2012;30(7):709-17.
150. Regan MM, Neven P, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Ejlertsen B, Mauriac L, Forbes JF, Smith I, Láng I, Wardley A, Rabaglio M, Price KN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B; BIG 1-98 Collaborative Group; International Breast Cancer Study Group (IBCSG). Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomised clinical trial at 8·1 years median follow-up. *Lancet Oncol.* 2011;12(12):1101-8.
151. Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group, Thürlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Rabaglio M, Smith I, Wardley A, Price KN, Goldhirsch A. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(26):2747-57.
152. Goss PE, Ingle JN, Pater JL, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, Castiglione M, Shepherd LE, Pritchard KI, Livingston RB, Davidson NE, Norton L, Perez EA, Abrams JS, Cameron DA, Palmer MJ, Tu D. Late extended adjuvant treatment with letrozole improves outcome in women with early-stage breast cancer who complete 5 years of tamoxifen. *J Clin Oncol.* 2008;26(12):1948-55.
153. Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Malin J, Mamounas EP, Rowden D, Solky AJ, Sowers MR, Stearns V, Winer EP, Somerfield MR, Griggs JJ; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(23):3784-96.

154. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, Coates A, Forbes J, Bliss J, Buyse M, Baum M, Buzdar A, Colleoni M, Coombes C, Snowdon C, Gnant M, Jakesz R, Kaufmann M, Boccardo F, Godwin J, Davies C, Peto R. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J Clin Oncol*. 2010;28(3):509-18.
155. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsy P, Gnant M, Poortmans P, Colleoni M, Denkert C, Piccart-Gebhart M, Regan M, Senn HJ, Winer EP, Thurlimann B; Members of the St. Gallen International Consensus Panel on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2019. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann Oncol*. 2019;30(10):1541-57.
156. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M, Medeiros Alencar VH, Badran A, Bonfill X, Bradbury J, Clarke M, Collins R, Davis SR, Delmestri A, Forbes JF, Haddad P, Hou MF, Inbar M, Khaled H, Kielanowska J, Kwan WH, Mathew BS, Mittra I, Müller B, Nicolucci A, Peralta O, Pernas F, Petruzelka L, Pienkowski T, Radhika R, Rajan B, Rubach MT, Tort S, Urrútia G, Valentini M, Wang Y, Peto R; Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter (ATLAS) Collaborative Group. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*. 2013;381(9869):805-16.
157. Bartlett JMS, SgROI DC, Treuner K, Zhang Y, Ahmed I, Piper T, Salunga R, Brachtel EF, Pirrie SJ, Schnabel CA, Rea DW. Breast Cancer Index and prediction of benefit from extended endocrine therapy in breast cancer patients treated in the Adjuvant Tamoxifen-To Offer More? (aTTom) trial. *Ann Oncol*. 2019;30(11):1776-83.
158. Berry DA, Cirrincione C, Henderson IC, Citron ML, Budman DR, Goldstein LJ, Martino S, Perez EA, Muss HB, Norton L, Hudis C, Winer EP. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA*. 2006;295(14):1658-67.
159. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Clarke M, Coates AS, Darby SC, Davies C, Gelber RD, Godwin J, Goldhirsch A, Gray R, Peto R, Pritchard KI, Wood WC. Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2008;371(9606):29-40.
160. Shao N, Wang S, Yao C, Xu X, Zhang Y, Zhang Y, Lin Y. Sequential versus concurrent anthracyclines and taxanes as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of phase III randomized control trials. *Breast*. 2012;21(3):389-93.
161. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Taylor C, Wang YC, Bergh J, Di Leo A, Albain K, Swain S, Piccart M, Pritchard K. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*. 2012;379(9814):432-44.
162. Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JG, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res*. 2002;62(16):4617-22.

163. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, Colleoni M, Regan MM, Piccart-Gebhart M, Senn HJ, Thürlimann B; St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017, André F, Baselga J, Bergh J, Bonnefoi H, Brucker SY, Cardoso F, Carey L, Ciruelos E, Cuzick J, Denkert C, Di Leo A, Ejlersen B, Francis P, Galimberti V, Garber J, Gulluoglu B, Goodwin P, Harbeck N, Hayes DF, Huang CS, Huober J, Hussein K, Jassem J, Jiang Z, Karlsson P, Morrow M, Orecchia R, Osborne KC, Pagni O, Partridge AH, Pritchard K, Ro J, Rutgers EJT, Sedlmayer F, Semiglazov V, Shao Z, Smith I, Toi M, Tutt A, Viale G, Watanabe T, Whelan TJ, Xu B. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol.* 2017;28(8):1700-12.
164. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(27):2817-26.
165. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE Jr, Wickerham DL, Wolmark N. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(23):3726-34.
166. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, Ravdin P, Bugarini R, Baehner FL, Davidson NE, Sledge GW, Winer EP, Hudis C, Ingle JN, Perez EA, Pritchard KI, Shepherd L, Gralow JR, Yoshizawa C, Allred DC, Osborne CK, Hayes DF; Breast Cancer Intergroup of North America. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(1):55-65.
167. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, Geyer CE Jr, Dees EC, Perez EA, Olson JA Jr, Zujewski J, Lively T, Badve SS, Saphner TJ, Wagner LI, Whelan TJ, Ellis MJ, Paik S, Wood WC, Ravdin P, Keane MM, Gomez Moreno HL, Reddy PS, Goggins TF, Mayer IA, Brufsky AM, Toppmeyer DL, Kaklamani VG, Atkins JN, Berenberg JL, Sledge GW. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(21):2005-14.
168. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, Geyer CE Jr, Dees EC, Goetz MP, Olson JA Jr, Lively T, Badve SS, Saphner TJ, Wagner LI, Whelan TJ, Ellis MJ, Paik S, Wood WC, Ravdin PM, Keane MM, Gomez Moreno HL, Reddy PS, Goggins TF, Mayer IA, Brufsky AM, Toppmeyer DL, Kaklamani VG, Berenberg JL, Abrams J, Sledge GW Jr. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(2):111-21.
169. Rouzier R, Pronzato P, Chéreau E, Carlson J, Hunt B, Valentine WJ. Multigene assays and molecular markers in breast cancer: systematic review of health economic analyses. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(3):621-37.
170. Albanell J, Svedman C, Gligorov J, Holt SD, Bertelli G, Blohmer JU, Rouzier R, Lluch A, Eiermann W. Pooled analysis of prospective European studies assessing the impact of using the 21-gene Recurrence Score assay on clinical decision making in women with oestrogen receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative early-stage breast cancer. *Eur J Cancer.* 2016;66:104-13.



171. Andre F, Ismaila N, Stearns V. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update Summary. *J Oncol Pract.* 2019;15(9):495-7.
172. Henry NL, Somerfield MR, Abramson VG, Ismaila N, Allison KH, Anders CK, Chingos DT, Eisen A, Ferrari BL, Openshaw TH, Spears PA, Vikas P, Stearns V. Role of Patient and Disease Factors in Adjuvant Systemic Therapy Decision Making for Early-Stage, Operable Breast Cancer: Update of the ASCO Endorsement of the Cancer Care Ontario Guideline. *J Clin Oncol.* 2019;37(22):1965-77.
173. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, d'Assignies MS, Bergh J, Lidereau R, Ellis P, Harris A, Bogaerts J, Therasse P, Floore A, Amakrane M, Piette F, Rutgers E, Sotiriou C, Cardoso F, Piccart MJ; TRANSBIG Consortium. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(17):1183-92.
174. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, Glas AM, Bogaerts J, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ, Rutgers ET, Van't Veer LJ; TRANSBIG Consortium. The 70-gene prognosis signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;116(2):295-302.
175. Drukker CA, Bueno-de-Mesquita JM, Retèl VP, van Harten WH, van Tinteren H, Wesseling J, Roumen RM, Knauer M, van 't Veer LJ, Sonke GS, Rutgers EJ, van de Vijver MJ, Linn SC. A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study. *Int J Cancer.* 2013;133(4):929-36.
176. Knauer M, Mook S, Rutgers EJ, Bender RA, Hauptmann M, van de Vijver MJ, Koornstra RH, Bueno-de-Mesquita JM, Linn SC, van 't Veer LJ. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120(3):655-61.
177. Brandão M, Pondé N, Piccart-Gebhart M. Mammaprint™: a comprehensive review. *Future Oncol.* 2019;15(2):207-24.
178. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, Pierga JY, Brain E, Causeret S, DeLorenzi M, Glas AM, Golfinopoulos V, Goulioti T, Knox S, Matos E, Meulemans B, Neijenhuis PA, Nitz U, Passalacqua R, Ravdin P, Rubio IT, Saghatchian M, Smilde TJ, Sotiriou C, Stork L, Straehle C, Thomas G, Thompson AM, van der Hoeven JM, Vuylsteke P, Bernardis R, Tryfonidis K, Rutgers E, Piccart M; MINDACT Investigators. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(8):717-29.
179. Pohl H, Kotze MJ, Grant KA, van der Merwe L, Pienaar FM, Apffelstaedt JP, Myburgh EJ. Impact of MammaPrint on Clinical Decision-Making in South African Patients with Early-Stage Breast Cancer. *Breast J.* 2016;22(4):442-6.
180. Kuijter A, Straver M, den Dekker B, van Bommel ACM, Elias SG, Smorenburg CH, Wesseling J, Linn SC, Rutgers EJT, Siesling S, van Dalen T. Impact of 70-Gene Signature Use on Adjuvant Chemotherapy Decisions in Patients With Estrogen Receptor-Positive Early Breast Cancer: Results of a Prospective Cohort Study. *J Clin Oncol.* 2017;35(24):2814-19.
181. Huang HY, Jiang ZF, Li QX, Liu JY, Wang T, Zhang R, Zhao J, Xu YM, Bao W, Zhang Y, Jia LT, Yang AG. Inhibition of human breast cancer cell invasion by siRNA against urokinase-type plasminogen activator. *Cancer Invest.* 2010;28(7):689-97.

182. Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, Peters HA, Bontenbal M, Jänicke F, Klijn JG. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res.* 1992;52(21):6101-5.
183. Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Saekar FH. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev.* 2008;34(2):122–36.
184. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(1):25–40.
185. Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* 2005;93(4):647-54.
186. Miles LA, Parmer RJ. Plasminogen Receptors: The First Quarter Century. *Semin Thromb Hemost.* 2013; 39(4): 329-37.
187. Law RH, Abu-Ssaydeh D, Whisstock JC. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Curr Opin Struct Biol.* 2013;23(6):836-41.
188. Preissner KT, Kanse SM, May AE. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(5):621-8.
189. Ploug M, Gårdsvoll H, Jørgensen TJ, Lønborg Hansen L, Danø K. Structural analysis of the interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor: a potential target for anti-invasive cancer therapy. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(2):177-83.
190. Llinas P, Le Du MH, Gårdsvoll H, Danø K, Ploug M, Gilquin B, Stura EA, Ménez A. Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *EMBO J.* 2005;24(9):1655-63.
191. Blasi F, Sidenius N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett.* 2010;584(9):1923–30.
192. Laufs S, Schumacher J, Allgayer H. Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle.* 2006;5(16):1760-71.
193. Balsara RD, Ploplis VA. Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis. *Thromb Haemost.* 2008;100(6):1029-36.
194. Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther.* 2010;28(5):e72-91.
195. Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* 2001;108(6):779-84.
196. Mondino A, Blasi F. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol.* 2004;25(8):450-5.
197. Blasi F, Vassalli JD, Danø K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J Cell Biol.* 1987;104(4):801-4.
198. Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer.* 1997;72(1): 1–22.
199. Fisher JL, Mackie PS, Howard ML, Zhou H, Choong PF. The expression of the urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma: an *in vivo* mouse model. *Clin Cancer Res.* 2001;7(6):1654-60.

200. Farias-Eisner R, Vician L, Silver A, Reddy S, Rabbani SA, Herschman HR. The urokinase plasminogen activator receptor (UPAR) is preferentially induced by nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells and is required for NGF-driven differentiation. *J Neurosci.* 2000;20(1):230-9.
201. Paschos KA, Canovas D, Bird NC. Enzymatic function of multiple origins regulates the progression of colorectal cancer and the development of metastases. *Hippokratia.* 2009;13(1):23–31.
202. Hollas W, Blasi F, Boyd D. Role of the urokinase receptor in facilitating extracellular matrix invasion by cultured colon cancer. *Cancer Res.* 1991;51(14):3690–5.
203. Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem.* 2002;48(8):1194-7.
204. Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Höfler H, Jänicke F, Graeff H. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost.* 1997;78(1):285–96.
205. Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ. Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer.* 1988;62(3):531-3.
206. 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.
207. Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, Peters HA, Kramer MD, Jänicke F, Klijn JG. Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 1994;12(8):1648–58.
208. Fernö M, Bendahl PO, Borg A, Brundell J, Hirschberg L, Olsson H, Killander D. 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(5):793–801.
209. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M; German N0 study group. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(12):913–20.
210. Bouchet C, Spyrtos F, Martin PM, Hacène K, Gentile A, Oglobine J. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinomas. *Br J Cancer.* 1994;69(2):398–405.
211. Knoop A, Andreassen PA, Andersen JA, Hansen S, Laenkholm AV, Simonsen AC, Andersen J, Overgaard J, Rose C. Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. *Br J Cancer.* 1998;77(6):932-40.
212. Harbeck N, Kates RE, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol.* 2002;20(4):1000-7.

213. Jänicke F, Pache L, Schmitt M, Ulm K, Thomssen C, Prechtl A, Graeff H. Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissues are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1. *Cancer Res.* 1994; 54(10):2527–30.
214. Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates R, Höfler H, Jänicke F, Graeff H, Schmitt M. Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up. *Br J Cancer.* 1999;80(3-4):419-26.
215. Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost.* 2004;91(3):450-6.
216. Foekens JA, Look MP, Peters HA, van Putten WL, Portengen H, Klijn JG. 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(10):751-6.
217. McMahon B, Kwaan HC. The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2008;36(3-4):184-94.
218. Stegnar M, Uhrin P, Peternel P, Mavri A, Salobir-Pajnic B, Stare J, Binder BR. The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor-1 (*PAI-1*) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 1998;79(5):975-9.
219. Zorio E, Gilabert-Estellés J, España F, Ramón LA, Cosín R, Estellés A. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Curr Med Chem.* 2008;15(9):923-9.
220. Sartori MT, Vettor R, De Pergola G, De Mitrio V, Saggiorato G, Della Mea P, Patrassi GM, Lombardi AM, Fabris R, Girolami A. Role of the 4G/5G polymorphism of PaI-1 gene promoter on PaI-1 levels in obese patients: influence of fat distribution and insulin-resistance. *Thromb Haemost.* 2001;86(5):1161-9.
221. Burzotta F, Di Castelnuovo A, Amore C, D'Orazio A, Di Bitondo R, Donati MB, Iacoviello L. 4G/5G promoter *PAI-1* gene polymorphism is associated with plasmatic PAI-1 activity in Italians: a model of gene-environment interaction. *Thromb Haemost.* 1998;79(2):354-8.
222. CDC (Centers for Disease Control and Prevention): Available at URL :<https://www.cdc.gov/genomics/population/genvar/frequencies/serpine1.htm>.
223. Đorđević V, Gvozdenov M, Pruner I, Tomić B, Kovač M, Antonijević N, Radojković D. The prevalence of *PAI-1* 4G/5G gene variant in Serbian population. *Medicinski Glasnik Specijalne Bolnice za Bolesti Štitaste Žlezde i Bolesti Metabolizma "Zlatibor"* 2013;18(49),28-41. DOI: <https://doi.org/10.5937/medgla1349028D>
224. Akhter MS, Biswas A, Ranjan R, Meena A, Yadav BK, Sharma A, Saxena R. Plasminogen activator inhibitor-1 (*PAI-1*) gene 4G/5G promoter polymorphism is seen in higher frequency in the Indian patients with deep vein thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2010;16(2):184-8.
225. Eriksson P, Kallin B, van 't Hooft FM, Båvenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(6):1851-5.
226. Castelló R, España F, Vázquez C, Fuster C, Almenar SM, Aznar J, Estellés A. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in breast cancer patients and its association with tissue PAI-1 levels and tumor severity. *Thromb Res.* 2006;117(5):487–92.

227. Smolarz B, Blasiak J, Kulig A, Romanowicz-Makowska H, Dziki A, Ulanska J, Pander B, Szweczyk T. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) levels and gene promoter polymorphisms in subjects with colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001;20(2):247–52.
228. Alvarez-Millán JJ, Bocos C, Ferrín V, Lucas AR, Ruibal A, Schneider J. PAI-1 promoter polymorphism modulates uPA-PAI complex accumulation by breast cancer cells. *Oncology.* 2002;62(3):286–90.
229. Zhang X, Shu XO, Cai Q, Ruan Z, Gao YT, Zheng W. Functional plasminogen activator inhibitor-1 gene variants and breast cancer survival. *Clin Cancer Res.* 2006;12(20 Pt 1):6037–42.
230. Lei H, Hemminki K, Johansson R, Altieri A, Enquist K, Henriksson R, Lenner P, Försti A. PAI-1 -675 4G/5G polymorphism as a prognostic biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;109(1):165–75.
231. Andre F, Ismaila N, Henry NL, Somerfield MR, Bast RC, Barlow W, Collyar DE, Hammond ME, Kuderer NM, Liu MC, Van Poznak C, Wolff AC, Stearns V. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update-Integration of Results From TAILORx. *J Clin Oncol.* 2019;37(22):1956–64.
232. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998;11(2):155–68.
233. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, Isola J. Chromogenic *in situ* hybridization: a practical alternative for fluorescence *in situ* hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1467–72.
234. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brüner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broët P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(2):116–28.
235. Mekkawy AH, Pourgholami MH, Morris DL. Involvement of urokinase-type plasminogen activator system in cancer: an overview. *Med Res Rev.* 2014;34(5):918–56.
236. Kwaan HC, McMahon B. The role of plasminogen-plasmin system in cancer. *Cancer Treat Res.* 2009;148:43–66.
237. Placencio VR, DeClerck YA. Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cancer: Rationale and Insight for Future Therapeutic Testing. *Cancer Res.* 2015;75(15):2969–74.
238. Palumbo JS, Degen JL. Mechanisms linking tumor cell-associated procoagulant function to tumor metastasis. *Thromb Res.* 2007;120 Suppl 2:S22–8.
239. De Cremoux P, Grandin L, Diéras V, Savignoni A, Degeorges A, Salmon R, Bollet MA, Reyat F, Sigal-Zafrani B, Vincent-Salomon A, Sastre-Garau X, Magdelénat H, Mignot L, Fourquet A; Breast Cancer study Group of the Institut Curie. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen- activator-inhibitor type 1 predict metastases in good prognosis breast cancer patients. *Anticancer Res.* 2009;29(5):1475–82.

240. Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, Sweep CG, Lisboa BW, Lux MP, Beck T, Hasmmüller S, Kiechle M, Jänicke F, Thomssen C; Chemo-N 0 Study Group. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 2013;49(8):1825-35.
241. Dovnik NF, Takac I. Prognostic significance of uPA/PAI-1 level, HER2 status, and traditional histologic factors for survival in node-negative breast cancer patients. *Radiol Oncol*. 2017;51(1):65–73.
242. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; 10th St. Gallen conference. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol*. 2007;18(7):1133-44.
243. Li Y, Yang D, Yin X, Zhang X, Huang J, Wu Y, Wang M, Yi Z, Li H, Li H, Ren G. Clinicopathological Characteristics and Breast Cancer-Specific Survival of Patients With Single Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *JAMA Netw Open*. 2020;3(1):e1918160.
244. Spyrtos F, Martin PM, Hacène K, Romain S, Andrieu C, Ferrero-Poüs M, Deytieux S, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Brunet M. Multiparametric prognostic evaluation of biological factors in primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84(16):1266–72.
245. Lampelj M, Arko D, Cas-Sikosek N, Kavalari R, Ravnik M, Jezersek-Novakovic B, Dobnik S, Dovnik NF, Takac I. Urokinase plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in breast cancer – correlation with traditional prognostic factors. *Radiol Oncol*. 2015;49(4):357–64.
246. Jürgen Dittmer. Assessment of presurgical core needle biopsy specimen as an alternative source for determining the uPA and PAI-1 status in breast cancer. In: von Ursula Katharina Bauerfeind: Einfluss von Biopsie-, Aufarbeitungs- und Asservierungsbedingungen auf den Nachweis von urokinase type plasminogen activator (uPA) und plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) beim Mammakarzinom. Dissertation. der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2009 (In German).
247. Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Henselmann B, Kuhn W, Ulm K, Jänicke F, Höfler H, Graeff H, Schmitt M. Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node-negative breast cancer. *Anticancer Res*. 1998;18(3C):2187-97.
248. Borstnar S, Sadikov A, Mozina B, Cufer T. High levels of uPA and PAI-1 predict a good response to anthracyclines. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;121(3):615-24.
249. Fisher B, Jeong JH, Bryant J, Anderson S, Dignam J, Fisher ER, Wolmark N; National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet*. 2004;364(9437):858-68.
250. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, Geyer CE Jr, Dees EC, Goetz MP, Olson JA Jr, Lively T, Badve SS, Saphner TJ, Wagner LI, Whelan TJ, Ellis MJ, Paik S, Wood WC, Keane MM, Gomez Moreno HL, Reddy PS, Goggins TF, Mayer IA, Brufsky AM, Toppmeyer DL, Kaklamani VG, Berenberg JL, Abrams J, Sledge GW Jr. Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(25):2395-2405.

251. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
252. Cardoso F, van 't Veer L, Poncet C, Lopes Cardozo J, Delaloge S, Pierga JY, Vuylsteke P, Etienne Brain E, Viale G, Kuemmel S, Rubio IT, Zoppoli G, Thompson AM, Matos E, Zaman K, Hilbers F, Dudek-Perić A, Meulemans B, Piccart-Gebhart MJ, Rutgers EJ. MINDACT: Long-term results of the large prospective trial testing the 70-gene signature MammaPrint as guidance for adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2020; 38 (Suppl. 15):506-506.
253. Pomponio M, Keele L, Hilt E, Burkbauer L, Goldbach M, Nazarian S, Fox K, Tchou J. Impact of 21-Gene Expression Assay on Clinical Outcomes in Node-Negative  $\leq$  T1b Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2020;27(5):1671-8.
254. Dubsy P, Filipits M, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, Dietze O, Luisser I, Klug E, Sedivy R, Bachner M, Mayr D, Schmidt M, Gehrman MC, Petry C, Weber KE, Kronenwett R, Brase JC, Gnant M; Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (ABCSSG). EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(3):640-7.
255. Sestak I, Martín M, Dubsy P, Kronenwett R, Rojo F, Cuzick J, Filipits M, Ruiz A, Gradishar W, Soliman H, Schwartzberg L, Buus R, Hlauschek D, Rodríguez-Lescure A, Gnant M. Prediction of chemotherapy benefit by EndoPredict in patients with breast cancer who received adjuvant endocrine therapy plus chemotherapy or endocrine therapy alone. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;176(2):377-86.
256. Jakubowicz E, Martin B, Hoffmann R, Kröncke T, Jung T, Steierl R, Steinfeld D, Schenkirsch G, Kriegsmann J, Märkl B. EndoPredict versus uPA/PAI-1 in breast cancer: Comparison of markers and association with clinicopathological parameters. *Breast J*. 2019;25(3):450-4.
257. Märkl B, Kazik M, Harbeck N, Jakubowicz E, Hoffmann R, Jung T, Steinfeld D, Schenkirsch G, Schlimok G, Oruzio D. Impact of uPA/PAI-1 and disseminated cytokeratin-positive cells in breast cancer. *BMC Cancer*. 2019;19(1):692.
258. Diamanti-Kandarakis E, Palioniko G, Alexandraki K, Bergiele A, Koutsouba T, Bartzis M. The prevalence of 4G5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 (*PAI-1*) gene in polycystic ovarian syndrome and its association with plasma PAI-1 levels. *Eur J Endocrinol*. 2004;150(6):793–8.
259. Sternlicht MD, Dunning AM, Moore DH, Pharoah PD, Ginzinger DG, Chin K, Gray JW, Waldman FM, Ponder BA, Werb Z. Prognostic value of PAI1 in invasive breast cancer: evidence that tumor-specific factors are more important than genetic variation in regulating PAI1 expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(11):2107-14.
260. Thomssen C, Harbeck N, Dittmer J, Abraha-Spaeth SR, Papendick N, Paradiso A, Lisboa B, Jaenicke F, Schmitt M, Vetter M. Feasibility of measuring the prognostic factors uPA and PAI-1 in core needle biopsy breast cancer specimens. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(14):1028-9.
261. Kim EY, Do SI, Hyun K, Park YL, Kim DH, Chae SW, Sohn JH, Park CH. High expression of Urokinase-type plasminogen activator is associated with lymph node metastasis of invasive ductal carcinoma of the breast. *J Breast Cancer*. 2016;19(2):156–62.

262. Nitz U, Gluz O, Clemens M, Malter W, Reimer T, Nuding B, Aktas B, Stefek A, Pollmanns A, Lorenz-Salehi F, Uleer C, Krabisch P, Kuemmel S, Liedtke C, Shak S, Wuerstlein R, Christgen M, Kates RE, Kreipe HH, Harbeck N; West German Study Group PlanB Investigators. West German Study PlanB Trial: Adjuvant Four Cycles of Epirubicin and Cyclophosphamide Plus Docetaxel Versus Six Cycles of Docetaxel and Cyclophosphamide in HER2-Negative Early Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37(10):799-808.
263. Kantelhardt EJ, Vetter M, Schmidt M, Veyret C, Augustin D, Hanf V, Meisner C, Paepke D, Schmitt M, Sweep F, von Minckwitz G, Martin PM, Jaenicke F, Thomssen C, Harbeck N. Prospective evaluation of prognostic factors uPA/PAI-1 in node-negative breast cancer: phase III NNBC3-Europe trial (AGO, GBG, EORTC-PBG) comparing 6×FEC versus 3×FEC/3×Docetaxel. *BMC Cancer*. 2011;11:140.
264. Jevrić M, Matić IZ, Krivokuća A, Đorđić Crnogorac M, Besu I, Damjanović A, Branković-Magić M, Milovanović Z, Gavrilović D, Susnjar S, Kisić Tepavčević D, Stanojković T. Association of uPA and PAI-1 tumor levels and 4G/5G variants of PAI-1 gene with disease outcome in luminal HER2-negative node-negative breast cancer patients treated with adjuvant endocrine therapy. *BMC Cancer*. 2019;19(1):71.
265. Buta M, Džodić R, Đurišić I, Marković I, Vujasinović T, Markićević M, Nikolić-Vukosavljević D. Potential clinical relevance of uPA and PAI-1 levels in node-negative, postmenopausal breast cancer patients bearing histological grade II tumors with ER/PR expression, during an early follow-up. *Tumour Biol*. 2015;36(10):8193-200.
266. Guidelines of the AGO Breast Committee. Diagnosis and Treatment of Patients with Early and Advanced Breast Cancer. v 1.2019. Available at: <https://www.ago-online.de>.



## **Biografija**

Jevrić (Radenka) Marko, rođen je 21. Jula 1977. Godine u Leskovcu. Osnovnu i Srednju Medicinski školu završio je u Leskovcu odličnim uspehom i Vukovom diplomom. Zvanje doktora medicine stekao je na Medicinskom fakultetu u Nišu 2003.godine sa prosečnom ocenom 9,62. Tokom studija stipendista ambasade kraljevine Norveške. Zaposlen je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije kao specijalista opšte hirurgije od 2005 godine. Bavi se hirurškim lečenjem raka dojke , raka štitaste žlezde, melanoma i sarkoma u kontinuitetu od 2005.godine. Oktobra 2013.godine je položio specijalistički ispit iz opšte hirurgije na Medicinskom fakultetu u Beogradu, odličnim uspehom. Aprila 2019.godine je izabran u zvanje kliničkog asistenta na Katedri za hirurgiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Autor je i koautor većeg broja radova objavljenih u celini u domaćim i internacionalnim časopisima. Član je ESSO (Evropsko udruženje onkoloških hirurga), UOHS (Udruženje onkoloških hirurga Srbije), kao i Kancerološke i Hirurške Sekcije Srpskog lekarskog društva.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Marko Jevrić

broj indeksa EP-01/14

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Ispitivanje prediktivne vrednosti molekularnih biomarkera u proceni toka i ishoda bolesti kod pacijentkinja sa HER2 negativnim i nodus negativnim karcinomom dojke”

- 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 doktoranda**

U Beogradu, 03.12.2020. godine



---

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Marko Jevrić

Broj indeksa EP-01/14

Studijski program Epidemiologija

Naslov rada „Ispitivanje prediktivne vrednosti molekularnih biomarkera u proceni toka i ishoda bolesti kod pacijentkinja sa HER2 negativnim i nodus negativnim karcinomom dojke”

Mentor Prof. dr Darija Kisić Tepavčević

Potpisani/a Marko Jevrić

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 doktoranda**

U Beogradu, 03.12.2020. godine



### Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

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

„Ispitivanje prediktivne vrednosti molekularnih biomarkera u proceni toka i ishoda bolesti kod pacijentkinja sa HER2 negativnim i nodus negativnim karcinomom dojke”

koja je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

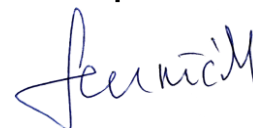
5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

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

U Beogradu, 03.12.2020. godine

**Potpis doktoranda**



---