

UNIVERZITET U BANJOJ LUCI  
FAKULTET: MEDICINSKI



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊА ЛУЦИ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ БАЊА ЛУКА

Примљено: 8. 11. 2021.	Образици - 3		
Орг. јед.	Број	Прилог	
	18/4.	20/21	

## IZVJEŠTAJ

*o ocjeni urađene doktorske disertacije*

### I PODACI O KOMISIJI

Na osnovu člana 141. Zakona o visokom obrazovanju ("Službeni glasnik Republike Srpske" broj: 67/20), člana 54. Statuta Univerziteta u Banjoj Luci i člana 18. Statuta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, Naučno-nastavno vijeće Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, na I redovnoj, elektronskoj sjednici održanoj 14.10.2021. godine, donijelo je odluku broj: 18/3.605/2021 o imenovanju Komisije za ocjenu urađene doktorske disertacije kandidata mr sc.med Edine Balta pod nazivom "Značaj neoadjuvantne terapije antraciklinima i taksanima u regresiji uznapredovalog karcinoma dojke", u sastavu:

1. Dr Safet Guska, vanredni profesor, uža naučna oblast Hirurgija, Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu, predsjednik,
2. Dr Radoslav Gajanin, redovni profesor, uža naučna oblast Patologija, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, član,
3. Dr Zdenka Gojković, redovni profesor, uža naučna oblast Onkologija i radioterapija, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, član,
4. Dr Ljiljana Amidžić, docent, uža naučna oblast Humana genetika, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, rezervni član.

### II PODACI O KANDIDATU

- 1) Edina (Muharem) Balta
- 2) 14.09.1966. godine, Bosanska Gradiška, Bosna i Hercegovina
- 3) Univerzitet u Sarajevu, Medicinski fakultet, Postdiplomski studij, stečeno zvanje magista medicinskih nauka
- 4) Medicinski fakultet Sarajevo, magistarska teza pod nazivom: "Korelacija metastaza limfonoda aksile duktalnog karcinoma dojke sa procjenom faze bolesti i terapijskom

šemom", odbranjena 28.11.2008.godine, Naučna oblast: Hirurgija

5) Naučna oblast: Hirurgija

### III UVODNI DIO OCJENE DOKTORSKE DISERTACIJE

1) Naslov doktorske disertacije mr sc.med Edine Balta je: "Značaj neoadjuvantne terapije antraciklinima i taksanima u regresiji uznapređovalog karcinoma dojke"

2) Tema doktorske disertacije je prihvaćena od strane Naučno-nastavnog vijeća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci Odlukom broj: 18/3.688/2015, dana 15.09.2015, a Senat Univerziteta u Banjoj Luci Odlukom broj: 02/04-3.2973-149/15, dana 12.10.2015, je dao saglasnost na Izvještaj o ocjeni podobnosti teme i kandidata za izradu doktorske disertacije na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci kandidata mr sc.med Edine Balta pod nazivom "Značaj neoadjuvantne terapije antraciklinima i taksanima u regresiji uznapređovalog karcinoma dojke".

3) Sadržaj doktorske disertacije je naveden u poglavljima:

1. Uvod doktorske disertacije je napisan na 16 strana
2. Ciljevi istraživanja su napisani na 2 strane
3. Hipoteza istraživanja je napisana na 1 strani
4. Metodologija - ispitanici i metode rada su napisane na 10 strana
5. Rezultati rada su napisani na 97 strana
6. Diskusija je napisana na 34 strane
7. Zaključci su napisani na 2 strane
8. Literatura korištena u radu je napisana na 22 strane
9. Skraćenice korištene u tekstu su napisane na 2 strane
10. Biografija je napisana na 1 strani
11. Prilozi su napisani na 9 strana

4) Doktorska disertacija kandidata mr sc.med Edine Balta je napisana latiničnim pismom, fontom Times New Roman, na 214 strana, formata A4. Na početku doktorske disertacije se nalazi 16 strana koje nisu numerisane, a odnose se na naslov disertacije (i na engleskom jeziku), ključne informacije o disertaciji, zahvalnicu, sažetak rada (i na engleskom jeziku) i sadržaj. Doktorska disertacija sadrži 81 tabelu i 55 slika. U poglavlju literatura su navedena 247 literaturna izvora koji su citirani u disertaciji. Na kraju doktorata se nalaze lista skraćenica koje su korištene u tekstu, biografija autora i prilozi sa popisom tabela i



slika. U priloge su uvrštene i 3 potpisane izjave; izjava o autorstvu, izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom i izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije. Doktorat sadrži 11 poglavlja.

#### IV UVOD I PREGLED LITERATURE

1) U prvom poglavlju doktorske disertacije (Uvod, str.1-16) istaknut je razlog zbog kog je ovo istraživanje provedeno. U uvodu su ukratko navedene definicija i osnovne epidemiološke karakteristike karcinoma dojke koji spada u najčešće dijagnosticirane tumore i jedan je od vodećih uzroka smrtnosti kod žena u svijetu. Detaljno je opisan problem i značaj karcinoma dojke kod žena, sa posebnim osvrtom na uznapredovale oblike oboljenja. Jasno je prikazan patomorfološki aspekt bolesti sa preglednom klasifikacijom i metodom određivanja stadija karcinoma dojke. Potom je detaljno objašnjena imunohistohemijska molekularna podtipizacija karcinoma dojke koja je bazirana na ER, PgR, HER2 i Ki-67. Jasno su opisane osobine karcinoma dojke koji su po molekularnoj tipizaciji svrstani u hormonalno pozitivnu i hormonalno negativnu grupu što je bila osnova za provedeno istraživanje. U dijelu uvoda koji je vezan za etiopatogenezu je naglašeno da je karcinom dojke heterogena bolest, a posebno su definisani lokalno uznapredovali karcinomi dojke koji su predmet istraživanja doktorske disertacije. Detaljno i pregledno su opisani najvažniji prognostički faktori kod karcinoma dojke sa posebnim osvrtom na Bcl-2 i CA-IX onkogene koji su, između ostalog, analizirani u disertaciji. Uvodni dio je obuhvatio i savremene smjernice u dijagnostici i terapiji karcinoma dojke, sa posebnim osvrtom na neoadjuvantnu hemoterapiju koja je u kombinaciji antraciklina i taksana predmet istraživanja doktorata. Neoadjuvantna hemoterapija je definisana kao sistemsko davanje medikamentozne terapije prije operacije kod karcinoma koji nemaju verifikiranih udaljenih metastaza. Posebno su opisane varijacije odgovora karcinoma na primarnu sistemsku terapiju sa naglaskom na kompletan histopatološki odgovor koji je analiziran u sklopu doktorske disertacije.

U drugom poglavlju doktorske disertacije (ciljevi istraživanja, str.17-18) precizno su definisani sekundarni ciljevi istraživanja da bi se utvrdilo koja molekularna podgrupa lokalno uznapredovalih karcinoma dojke, luminalni-hormonski pozitivni ili basal like-trostruko negativni, ima bolji odgovor na kombinovanu neoadjuvantnu hemoterapiju antraciklinima i taksanima. Da bi procjena bila precizija analizirao se stepen regresije karcinoma na hemoterapiju korištenjem Residual Cancer Burden Calculatora uz praćenje ekspresije markera Ki-67, Bcl-2 i CA-IX kao i ostalih kliničkih i histopatoloških



parametara tumora i regionalnih limfnih čvorova.

U trećem poglavlju doktorske disertacije (radna hipoteza, str.19) jasno je postavljena hipoteza istraživanja da će primjena kombinovane neoadjuvantne hemoterapije sa antraciklinima i taksanima kod uznapredovalog karcinoma dojke dovesti do snižavanja stadija tumora u većem obimu kod podgrupe trostruko negativnih karcinoma nego kod hormonski pozitivnih karcinoma.

2) Karcinom dojke je najčešći dijagnosticirani karcinom i jedan od vodećih uzroka smrtnosti kod žena u svijetu. Ukupno preživljavanje pacijenata sa karcinomom je lošije u zemljama u razvoju, uglavnom zbog kombinacije kasnog postavljanja dijagnoze bolesti i ograničenog pristupa kako standardnim tako i savremenim metodama liječenja. (1). Rast incidence karcinoma dojke u razvijenim zemljama se može objasniti dobrim skriningom i boljim tehničkim mogućnostima rane dijagnostike uz bolju opštu zdravstvenu edukaciju žena, a djelimično se može pripisati i negativnim uticajima savremenog načina života (2). Karcinom dojke je već godinama značajan problem u javnom zdravstvu razvijenih zemalja, a u nerazvijenim zemljama postaje sve veći problem, jer stopa obolijevanja raste za oko 5% na godišnjem nivou (3). Najčešći patohistološki tip raka dojke je invazivni duktalni karcinom, NST („no special type“, nespecifični tip, duktalni) koji čini oko 80% svih karcinoma dojke, a zatim po učestalosti slijede invazivni lobularni (10%) i medularni karcinom (5%). Obzirom na odnos karcinomskih stanica prema bazalnoj membrani karcinomi mogu biti neinvazivni (ne prelaze bazalnu membranu) ili invazivni (prelaze bazalnu membranu) (4). Lokalno uznapredovali karcinom dojke sadrži mnogo varijacija kliničkih scenarija nemetastatske bolesti. Lokalno uznapredovala bolest uključuje karcinome koji su veliki ili su prošireni na regionalne limfne čvorove, ali bez znakova udaljenih metastaza, svrstane u kliničke stadije III (A-C) i IIB (T3N0). Uprkos sve boljem skriningu malignih tumora dojke, približno 7% pacijenata ima lokalno uznapredovali stadij bolesti u momentu dijagnosticiranja. (5). Različiti tipovi karcinoma dojke pokazuju različite histopatološke i biološke karakteristike, različite kliničke rezultate i različite odgovore na sistemske intervencije (6). Osnova za klasifikaciju zloćudnih tumora prema njihovoj rasprostranjenosti je TNM sistem klasifikacije, AJCC 8th edition (American Joint Committee on Cancer), na osnovu veličine primarnog tumora (T0-T4), postojanja i veličine zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova (N0-N3) i postojanja udaljenih metastaza (M0-M1). Stadij tumora (engl. staging) je svrstavanje oboljelih od karcinoma dojke po stadijumima u 5 grupa (od 0-IV) na osnovu proširenosti bolesti koristeći TNM klasifikaciju. Ono je važno zbog liječenja, prognoze i upoređivanja rezultata različitih



tretmana. (7) Molekularni podtipovi mogu obezbijediti klinički korisne informacije o biologiji tumora i njihovom kliničkom ponašanju što se može koristiti za određivanje strategije tretmana i praćenja U praksi se koristi St.Gallen „zamjenska“ klasifikacija iz 2011 godine za određivanje podtipova karcinoma dojke: Luminalni A, Luminalni B1, Luminalni B2, HER2 visokih vrijednosti, Basal like(8). Veličina tumora je važan parametar za određivanje kliničkog stadija bolesti. Spada u važnije prognostičke faktore kod karcinoma dojke posebno kod bolesnika koji nemaju metastaze u limfnim čvorovima. Kod multifokalnih i multicentričnih karcinoma prognoza je lošija bez obzira da li se mjerenje bazira na veličini najveće lezije ili na dimenziji zbira svih lezija (9,10). Postojanje metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima je najvažniji prognostički faktor kod karcinoma dojke. Ukupno preživljavanje direktno zavisi od broja zahvaćenih limfnih čvorova bez obzira na njihovu lokalizaciju. (9,10). Histološki ili nuklearni gradus opisuje stepen diferencijacije tumora. Najčešće se koristi stepenovanje po Nottingham metodi koje daje precizne kriterije za svaku od tri ocjenjivane morfološke osobine: stvaranje tubula, polimorfizam jezgara i broj mitoz. Tumori se svrstavaju u 3 grupe: G1(3-5), G2 (6-7), G3 (8-9). Veći gradus tumora govori o agresivnijoj formi bolesti (9,10,11). Gradus tumora se zajedno sa brojem zahvaćenih limfonoda i dimenzijama tumora koristi za izračunavanje Nottingham prognostičkog indeksa (NPI). Indeksom se procjenjuje procenat preživljavanja bolesnika nakon operativnog zahvata (10,11). U novije vrijeme se kompjuterski, korištenjem interneta može odrediti Nottingham gradus skor (NGS Adjuvant!) unoseći već navedene parametre (54). Kod karcinoma dojke imunohistohemijsko određivanje vrijednosti nuklearnog antigena Ki-67 je najraširenija metoda za procjenu proliferacije tumorskih stanica. Pokazao se kao važan biomarker kod karcinoma potvrđenih iglenom biopsijom prije neoadjuvantne sistemske terapije (21). Visoke vrijednosti Ki-67 poslije neoadjuvantne terapije u ostatnom tumoru sugerišu lošu prognozu, kratak period bez bolesti i kratko preživljavanje (22). Visoke vrijednosti Ki-67 poslije neoadjuvantne terapije ukazuju na potrebu promjene terapijske šeme (23). Visoke vrijednosti Ki-67 proliferacijskog indeksa su potvrđene kao važan prediktivni faktor za kompletni histopatološki odgovor u regresiji na neoadjuvantnu terapiju kod svih vrsta karcinoma, a posebno kod trostruko negativnog tipa. Visok proliferacijski indeks je generalno loš prognostički znak kod karcinoma dojke (39). Povećanje ili prevelika ekspresija HER2 onkogen je primjećena kod približno 20-30 % invazivnih karcinoma dojke što se smatra prognostičkim faktorom (43). Velika ekspresija HER2 je povezana sa drugim lošim prognostičkim faktorima kao što su pozitivni limfni čvorovi, veći tumori,



viši histološki gradus, viša stopa proliferacije i niska izraženost estrogenskih i progesteronskih receptora (14). Limfovaskularna invazija je važan prognostički faktor kod karcinoma dojke posebno kod pacijenata sa negativnim limfnim čvorovima i pokazatelj je agresivnije bolesti i veće mogućnosti pojave udaljenih metastaza. Kod karcinoma sa pozitivnim limfnim čvorovima limfovaskularna invazija je nepovoljan prognostički znak u smislu lošeg ukupnog preživljavanja (43). Bcl-2 marker je nezavisni pokazatelj povoljne prognoze za sve vrste karcinoma dojke u ranom stadiju bolesti. Predložen je za prognostički marker, ali se smatra da mu je efekat ograničen, jer je vezan za status estrogen receptora (24). Ekspresija BCL-2 proteina je paradoksalno povezana sa dobrom prognozom i preživljavanjem kod karcinoma dojke. Interesantno je da je ekspresija BCL-2 viša kod skriningom nađenih karcinoma dojke nego kod palpabilnih i simptomatskih (25). Ekspresija BCL-2 je dobar prediktivni faktor za osjetljivost karcinoma dojke na hemoterapiju. Pacijenti sa BCL-2 negativnim tumorom imaju bolji odgovor na hemoterapiju (26). Određivanje BCL-2 markera u kliničkoj praksi može dati i prognostičke i prediktivne informacije kod trostruko negativnih karcinoma dojke. Kod BCL-2 negativnih tumora pacijenti imaju koristi od hemoterapije antraciklinima (27). Hemoterapija bazirana na antraciklinima pokazuje efikasnost kod tretmana trostruko negativnog karcinoma dojke sa niskim vrijednostima BCL-2 i povezana je sa čestim kompletnim histopatološkim odgovorom tumora u regresiji (28). CA-IX je gen marker hipoksije, a pouzdan je zbog svoje stabilnosti i položaja na ćelijskoj membrani. Ekspresija je izrazitija kod visokog histološkog gradusa karcinoma i velikih tumora. Invazivni lobularni karcinom dojke uglavnom pokazuje niži nivo ekspresije CA-IX (29). Ranije studije su pokazale važnost pH regulacije kod ćelijske smrti zbog hipoksije. Ugljična anhidraza ima veliku ulogu u regulaciji pH vijednosti kod normalnog tkiva. Ciljani inhibitori propusnosti membrane mogu djelovati zajedno sa hemoterapeuticima aktivnije u kiseljoj sredini (30,31). Hipoksija ima važnu ulogu u progresiji tumora i hemorezistenciji određenih vrsta karcinoma. CA-IX ekspresija utvrđena iglenom biopsijom je u korelaciji sa patološkim odgovorom, metastazama u limfnim čvorovima i limfovaskularnom invazijom tumora. Visok CA-IX nakon neoadjuvantne hemoterapije ukazuje na lošu prognozu i preživljavanje. Multivarijantne analize su pokazale da je ekspresija CA-IX u tkivu tumora nakon iglene biopsije faktor za predviđanje osjetljivosti na hemoterapiju, a CA-IX ekspresija u reseciranom tumoru faktor za prognozu preživljavanja kod pacijenata sa karcinomom dojke u ranom stadijumu (32). Basal-like karcinomi dojke su 9 puta češće imali ekspresiju CA-IX od drugih podtipova. Ekspresija CA-IX je u pozitivnoj korelaciji



sa veličinom, histološkim gradusom i negativnim estrogen receptorima tumora. Pacijenti sa CA-IX pozitivnim tumorom iz basal-like grupe imaju lošiju prognozu nego CA-IX negativni tumori kada se tretiraju hemoterapijom (33). Luminalni karcinomi dojke su podtipovi koji su visoko hormonalno osjetljivi i dijele se u dvije grupe, luminal A i luminal B zavisno od ekspresije HER2 i Ki-67. Luminalni imunofenotip nije dovoljan za identifikaciju pacijenata koji neće imati koristi od neoadjuvantne hemoterapije. Kompletan histopatološki odgovor na hemoterapiju češće imaju estrogen negativni karcinomi nego estrogen pozitivni. Luminalni podtipovi sa niskim proliferacionim indeksom Ki-67 potencijalno bi mogli izbjeći hemoterapiju. Pacijenti sa karcinomima koji su hormonalno pozitivni imaju bolju prognozu i preživljavanje nego hormonalno negativni (34). Trostruko negativni karcinom dojke je tip tumora kojem nedostaju receptori za estrogen, progesteron i HER2, a javlja se kod 10-25% slučajeva. Ova podgrupa karcinoma dojke je udružena sa lošom prognozom, ali veći broj oboljelih (20-30%) ima kompletnu histopatološku regresiju na neoadjuvantnu hemoterapiju kombinacijom antraciklina i taksana u odnosu na ostale podgrupe karcinoma dojke. Kod pacijenata sa rezidualnim trostruko negativnim karcinomom prisutnost limfovaskularne invazije je značajno povezana sa kratkim periodom bez bolesti i lošom prognozom (40). Invazivni duktalni karcinom je najčešći tip tumora dojke koji čini ukupno 65-80% svih karcinoma. Do histološke dijagnoze se dolazi isključivanjem drugih histoloških tipova karcinoma pa se zbog toga sada i naziva nespecifični tip (engl. NOS - not otherwise specified) (10). Invazivni lobularni karcinom se javlja u 4-15% slučajeva. Odgovor na neoadjuvantnu hemoterapiju je slabiji kod lokalno uznapredovalih lobularnih karcinoma u poređenju sa duktalnim, dok je zahvaćenost aksilarnih limfnih čvorova ista. Međutim, dugoročna prognoza lobularnog karcinoma je bolja u odnosu na duktalni (35).

Liječenje karcinoma dojke provodi se prema protokolu, zavisno od histološkog tipa tumora, uznapredovalosti malignog procesa i opšteg stanja organizma. Od važnosti je multidisciplinarni pristup uz konzilijarno donošenje odluka o najoptimalnijem načinu liječenja, kako o vrsti tretmana tako i o redosljedu istog uz individualni pristup svakoj bolesnici. Liječenje karcinoma dojke po načinu djelovanja može biti lokoregionalno i sistemsko (9). Neoadjuvantna hemoterapija (preoperativna hemoterapija, indukciona hemoterapija, primarna sistemska hemoterapija) je sistemsko davanje medikamentozne terapije prije operacije kod karcinoma koji nemaju verifikiranih udaljenih metastaza (15). Neoadjuvantna hemoterapija može pretvoriti prethodno nereseptabilne, lokalno uznapredovale karcinome dojke u operabilne tumore, a kod primarno operabilnih tumora



19. Toi M, Benson JR, Winer EP, Forbes JF, von Minckwitz G, Golshan M, Robertson JF, Sasano BCL, Cole BF, Pegram MD, Han BCL, Huang CS, Ikeda T, Kanao S, Lee ES, Noguchi S, Ohno S, Partridge AH, Rouzier R, Tozaki M, Sugie T, Yamauchi A, Inamoto T. Preoperative systemic therapy in locoregional management of early breast cancer: highlights from the Kyoto Breast Cancer Consensus Conference. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Dec;136(3):919-26.
20. Criscitiello C, Azim HA Jr, Agbor-tarh D, de Azambuja E, Piccart M, Baselga J, Eidtmann BCL, Di Cosimo S, Bradbury I, Rubio IT. Factors associated with surgical management following neoadjuvant therapy in patients with primary HER2-positive breast cancer: results from the NeoALTTO phase III trial. *Ann Oncol.* 2013 Aug;24(8):1980-5.
21. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Nov;103(22):1656–1664.
22. von Minckwitz G, Schmitt BCL, Loibl S et al. Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19(16): 4521–4531.
23. Vasseur F, Baranzelli MC, Fournier C, Bonnetterre J. Ki67 in young patients with breast cancer. *Gynecol Obstet Fertil.* 2013 Jan;41(1):16-9.
24. Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, LeQuesne J, et al. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer.* 2010 Aug 24;103(5):668–675.
25. Redondo M. Bcl-2, an Antiapoptotic Gene Indicator of Good Prognosis in Breast Cancer: The Paradox. *J Carcinogene Mutagene* 2013; 4:1.
26. Dong Yang, Min-Bin Chen, Li-Qiang Wang, Lan Yang, Chao-Ying Li, Pei-Hua Lu. Bcl-2 expression predicts sensitivity to chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2013; 32:105.
27. Abdel-Fatah TM, Perry C, Dickinson P, Ball G, Moseley P, Madhusudan S, et al. Bcl2 is an independent prognostic marker of “triple” negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings. *Ann Oncol.* 2013;24(11):2801–2807.
28. Abdel-Fatah TMA, Dickinson PD, Moseley P, Reis-Filho JS, Green AR, Ellis IO, Chan S. Bcl2 as a surrogate prognostic and predictive marker in “triple”-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 1024).



29. Adams A, van Brussel ASA, Vermeulen JF, Mali WPTHM, van der Wall E, van Diest PJ, Elias SG. The potential of hypoxia markers as target for breast molecular imaging – a systematic review and meta-analysis of human marker expression. *BMC Cancer* 2013; 13:538.
30. Potter C, Harris AL. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle*. 2004 Feb; 3(2):164-7.
31. Pastorekova S, Zatovicova M, Pastorek J. Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition. *Curr Pharm Des*. 2008; 14(7):685-98.
32. Aomatsu N, Yashiro M, Kashiwagi S, Kawajiri BCL, Takashima T, Ohsawa M, Wakasa K, Hirakawa K. Carbonic anhydrase 9 is associated with chemosensitivity and prognosis in breast cancer patients treated with taxane and anthracycline. *BMC Cancer*. 2014 Jun 4; 14:400.
33. Tan EY, Yan M, Campo L, Han C, Takano E, Turley BCL, Candiloro I, Pezzella F, Gatter KC, Millar EK, O'Toole SA, McNeil CM, Crea P, Segara D, Sutherland RL, Harris AL, Fox SB. The key hypoxia regulated gene CAIX is upregulated in basal-like breast tumours and is associated with resistance to chemotherapy. *Br J Cancer*. 2009 Jan 27; 100(2):405-11.
34. Alba E, Calvo L, Albanell J, De la Haba JR, Arcusa Lanza A, Chacon JI, Sanchez-Rovira P, Plazaola A, Lopez Garcia-Asenjo JA, Bermejo B, Carrasco E, Lluch A; GEICAM. Chemotherapy (CT) and hormonotherapy (HT) as neoadjuvant treatment in luminal breast cancer patients: results from the GEICAM/2006-03, a multicenter, randomized, phase-II study. *Ann Oncol*. 2012 Dec;23(12):3069-74.
35. Tubiana-Hulin M, Stevens D, Lasry S, Guinebretiere JM, Bouita L, Cohen-Solal C, Cherel P, Rouesse J. Response to neoadjuvant chemotherapy in lobular and ductal breast carcinomas: a retrospective study on 860 patients from one institution. *Ann Oncol*. 2006; 17:1228–1233.
36. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann. Onc.*, 2012; 23(suppl 10): 207 - 210.
37. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:5678–5685.
38. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann BCL, Fasching PA, Gerber B, Eiermann BCL, Hilfrich J, Huober J, Jackisch C, Kaufmann M, Konecny GE, Denkert C, Nekljudova V, Mehta K, Loibl S. Definition and Impact of Pathologic Complete Response on Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy in Various



- Intrinsic Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol*.2012 May; 20;30(15):1796-1804.
39. Darb-Esfahani S, Loibl S, Muller BM, Roller M, Denkert C, Komor M, Schluns K, Blohmer JU, Budczies J, Gerber B, Noske A, du Bois A, Weichert BCL, Jackisch C, Dietel M, Richter K, Kaufmann M, von Minckwitz G. Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2009;11(5):R69.
  40. Sakuma K, Kurosumi M, Oba BCL. Pathological tumor response to neoadjuvant chemotherapy using anthracycline and taxanes in patients with “triple”-negative breast cancer. *Exp Ther Med*. 2011; 2: 257–64.
  41. (43.) 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 sep; 14(3): 198-203
  42. (44.) Akay CL, Meric-Bernstam F, Hunt KK, et al. Evaluation of the MD Anderson Prognostic Index for local-regional recurrence after breast conserving therapy in patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2012;19:901–907.
  43. (54.) Mook S, Schmidt MK, Rutgers EJ, van de Velde AO, Visser O, Rutgers SM, Armstrong N, van't Veer LJ, Ravdin PM. Calibration and discriminatory accuracy of prognosis calculation for breast cancer with the online Adjuvant! program: a hospital-based retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2009;10:1070–1076.

### 3) Doprinostez u rješavanju izučavanog predmeta istraživanja

Uprkos sve boljem skriningu karcinoma dojke i dalje postoji određeni broj slučajeva koji se otkriju u lokalno uznapređenoj fazi bolesti sa velikim tumorom, bez znakova udaljenih metastaza, visokog histološkog gradusa i izrazitih aksilarnih metastaza ili sa inflamiranim (upalnim) karcinomom ili karcinomom koji je egzulcerirao. Postavlja se imperativ adekvatne resektabilnosti tumora u hirurškom terapijskom djelovanju, a da se pri tome ne djeluje negativno na dužinu preživljavanja. Pacijenti sa uznapređovanim karcinomom dojke imaju veći rizik za lokalni recidiv i udaljene metastaze i lošiju prognozu bolesti. Neoadjuvantna hemoterapija je sistemska aplikacija medikamentozne terapije prije operativne terapije kod karcinoma bez metastaza. Zbog multidisciplinarnog konzilijarnog pristupa bolesnicama sa karcinomom dojke, a uz napredovanje dijagnostičkih metoda i razvijanje hemoterapijskih lijekova te uz individualizaciju svakog slučaja, kod lokalno uznapređovanih tumora se često mijenja redosljed terapijskog



tretmana i primarno uključuje hemoterapija, najčešće na bazi antraciklina ili taksana, a to je i predmet istraživanja doktorske disertacije. Primarna hemoterapija može dovesti do mijenjanja kvaliteta tumora u smislu smanjivanja dimenzija što omogućava adekvatniju operativnu resektabilnost, a dugoročno gledano smanjuje mogućnost lokalnih recidiva. Kod karcinoma dojke sa izrazitim metastazama u aksilarne limfne čvorove postoji i visok rizik javljanja udaljenih organskih metastaza te se uključivanjem neoadjuvantne hemoterapije u određenom broju slučajeva blokira daljnja progresija bolesti. Usavršavanjem patohistološke dijagnostike uz uvođenje imunohistohemijskih metoda rutinski se pored histološkog tipa i gradusa tumora određuju hormonski receptori, HER2 onkogen, Ki-67 proliferativna frakcija tumora, prisutnost peritumoralne limfovaskularne invazije, pa se uvođenjem hemoterapije prije operacije može direktno pratiti reakcija tumora kao i promjene navedenih imunopatogenetskih markera i na osnovu toga eventualno postoperativno korigovati onkološka terapijska šema radi veće efikasnosti. Proučavanje potencijalnih patogenetskih markera karcinoma dojke je jedan od imperativa nauke i doprinosi jasnijem sagledavanju molekularnih obrazaca tumora sa mogućnostima uvođenja novih terapijskih djelovanja. U istraživanju su analizirani bcl-2 i CA-IX tumorski markeri kao nezavisni prediktivni i prognostički faktori sa ciljem stimulisanja novih sličnih studija u regionu i proširivanja dosadašnjih saznanja iz patofiziologije karcinoma dojke. Rezultati doktorske disertacije ukazuju na povezanost molekularnih osobina karcinoma dojke sa kliničkim i patološkim odgovorom na kombinovanu neoadjuvantnu terapiju sa antraciklinima i taksanima što podstiče dalja istraživanja sa motivom pronalaženja novih biomarkera koji određuju kliničke fenotipove bolesti i nove terapijske smjernice.

#### 4) Očekivani naučni i pragmatični doprinosi disertacije

Proučavanje efikasnosti sekvencijalne neoadjuvantne hemoterapije po šemi antraciklini + taksani, kod lokalno uznapredovalog karcinoma dojke koji je definisan molekularnom tipizacijom tumora, dovodi do boljeg razumjevanja patofizioloških mehanizama i kliničkih formi bolesti, a što daje poseban naučni doprinos analiziranju smjernica dijagnostičkog i terapijskog djelovanja. Na osnovu dobijenih rezultata se može realnije procijeniti uspješnost specifične neoadjuvantne hemoterapije procjenom rezidualne bolesti kod uznapredovalih karcinoma dojke u odnosu na zadate varijable i njihove kombinacije, čime se daje mogućnost za donošenje odgovarajućih, personaliziranih i ciljanih terapijskih odluka multidisciplinarnog onkološkog tima. Potencijalno se daju moguće smjernice da bi



hirurški tretman pacijentica sa uznapredovalim karcinomom dojke bio efikasniji i adekvatniji. Analiza povezanost biomarkera Ki-67, bcl-2 i CA-IX sa stepenom patološke regresije hormonski pozitivnih i trostruko negativnih karcinoma dojke djelovanjem sekvencijalne neoadjuvantne hemoterapije sa antraciklinima i taksanima, daje mogućnost procijene vrijednosti navedenih biomarkera kao nezavisnih prediktivnih i prognostičkih faktora. Izučavanje uloge CA-IX, gena markera hipoksije, do sada nije provedeno u našoj zemlji, što je ujedno i naučni doprinos disertaciji. Prema dostupnoj literaturi i dalje postoje dileme o mogućnostima korištenja bcl-2 i Ca-IX markera kao nezavisnih prognostičkih i prediktivnih faktora kod različitih molekularnih podtipova karcinoma dojke. Istraživanje je provedeno na relativno velikom uzorku pacijentica i kroz duži vremenski period što obezbjeđuje pouzdanije statističke analize rezultata. Pragmatičan doprinos doktorske disertacije se bazira na izolovanju analiziranih specifičnih kliničkih, histopatoloških i imunoloških parametara uznapredovalog karcinoma dojke kao prediktivnih faktora za procjenu težine kliničke slike bolesti i ishoda liječenja.

## V MATERIJALI I METOD RADA

### 1) Materijal i kriterijumi

Materijal i metode koji su korišteni u doktorskoj disertaciji su usklađeni sa postavljenim ciljevima i prikazani na 10 strana. Korišteni materijal i metode rada su omogućili analizu molekularnih osobina lokalno uznapredovalog karcinoma dojke i uticaj kombinovane neoadjuvantne hemoterapije antraciklinima i taksanima na promjene imunopatogeneze tumora. Dizajn studije, mjesto i period istraživanja, uzorak i selekcija ispitanika, faze istraživanja i metodologija rada jasno su opisani i odabrani u skladu sa važećim standardima za klinička istraživanja. Time je kandidat bio u mogućnosti na samo dati odgovor na postavljene ciljeve, nego i doprinijeti boljem razumijevanju etioloških i patogenetskih mehanizama, kao i kliničkih fenotipova bolesti.

Istraživanje je provedeno kao retrospektivno-prospektivno, kliničko-manipulativno i deskriptivno-analitičko. Za istraživanje su korišteni podaci o bolesnicama sa primarno lokalno uznapredovalim karcinomom dojke, koje su operisane na Klinici za opštu i abdominalnu hirurgiju, na odjelu glandularne hirurgije, Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu u periodu od 2008 do 2018 godine. U studiju je uključeno 80 slučajeva koji su zadovoljili zadate kriterije i koji su svrstani u dvije grupe: Grupa 1. - hormonski pozitivni lokalno uznapredovali karcinomi dojke-luminal tip i Grupa 2. - trostruko negativni lokalno uznapredovali karcinomi dojke-basal like tip.



### Kriteriji za uključivanje u istraživanje

U istraživanju su korišteni podaci od bolesnica svih starosnih skupina, koje objektivnom dijagnostikom imaju utvrđeno postojanje karcinoma dojke i sa karakteristikama specifičnim za grupe:

#### Grupa 1.

- ultrazvučno i mamografski utvrđen je maligni tumor dojke dimenzija 5 cm i više ili prema TNM klasifikaciji svrstan u kliničke stadije bolesti III i IIb
- tumor je patohistološki potvrđen kao karcinom nakon urađene iglene biopsije
- patohistološkom obradom su utvrđeni: histološki tip i gradus tumora, limfovaskularna invazija, status estrogenskih (ER) i progesteronskih (PgR) hormonalnih receptora, status HER2, Ki-67, BCL-2 i CA-IX
- na osnovu imunohistohemijski verificiranih pozitivnih hormonalnih receptora tumor je svrstan u podgrupu hormonski pozitivnih-luminal grupa
- nakon konzilijarno donesene indikacije bolesnica je primila neoadjuvantnu hemoterapiju sa antraciklinima i taksanima po šemi FEC u trajanju od 3 ciklusa potom Taxotera 3 ciklusa
- pacijentici je hirurški tretman sekundaran u onkološkom tretmanu
- nakon operativnog tretmana je ponovo urađena patohistološka dijagnostika sa mjerenjem stvarnih dimenzija tumora i zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova, procjenom regresionog statusa (RCB - Residual Cancer Burden), utvrđivanjem histološkog tipa i gradusa tumora, limfovaskularne invazije, statusa hormonalnih receptora, HER2, Ki-67, BCL-2 i CA-IX

#### Grupa 2.

- Ultrazvučno i mamografski utvrđen je maligni tumor dojke dimenzija 5 cm i više ili prema TNM klasifikaciji svrstani u kliničke stadije bolesti III i IIb
- tumor je patohistološki potvrđen kao karcinom nakon urađene iglene biopsije
- patohistološkom obradom su utvrđeni: histološki tip i gradus tumora, limfovaskularna invazija, status estrogenskih (ER) i progesteronskih (PgR) hormonalnih receptora, status HER2, Ki-67, BCL-2 i CA-IX
- na osnovu imunohistohemijski verificiranih negativnih hormonalnih receptora i HER2 tumor je svrstan u podgrupu trostruko negativnih-basal-like grupa
- nakon konzilijarno donesene indikacije bolesnica je primila neoadjuvantnu



hemoterapiju sa antraciklinima i taksanima po šemi FEC u trajanju od 3 ciklusa potom Taxotera 3 ciklusa

- hirurški tretman je sekundaran u terapijskom tretmanu
- nakon operativnog tretmana je ponovo urađena patohistološka dijagnostika sa mjerenjem stvarnih dimenzija tumora i zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova, procjenom regresionog statusa (RCB - Residual Cancer Burden), utvrđivanjem histološkog tipa i gradusa tumora, limfovaskularne invazije, statusa hormonalnih receptora, HER2, Ki-67, BCL-2 i CA-IX

#### Kriteriji za isključivanje iz studije

- U istraživanju nisu korišteni podaci od pacijentica kod kojih nije dovršeno svih 6 ciklusa sekvencijalne neoadjuvantne hemoterapije antraciklinima i taksanima bez obzira na razlog (odustajanje od tretmana, progresija bolesti ili komplikacije).
- Iz studije su isključeni pacijenti muškarci sa patohistološki verificiranim lokalno uznapredovalim karcinomom dojke.
- Nisu korišteni rezultati operisanih bolesnica sa recidivirajućim malignim tumorima dojke.
- Pacijentice iz podgrupe sa HER2 pozitivnim i hormonski negativnim lokalno uznapredovalim karcinomom dojke nisu uključene u studiju.
- Isključeni iz studije su rezultati bolesnica koje su ranije primale hemoterapiju, hormonalnu terapiju, imunoterapiju ili iradijacionu terapiju zbog nekog drugog malignog oboljenja.
- Nisu korišteni rezultati pacijentica sa već potvrđenim udaljenim metastazama, a koje su palijativno operativno tretirane.
- Nisu korišteni rezultati bolesnica sa komorbiditetom malignog oboljenja nekog drugog organa.

#### 2) Kratak uvid u metod istraživanja

Ispitanice uključene u studiju su dijagnostički obrađene po protokolima za maligne tumore dojki: ultrazvuk, mamografija i magnetna rezonanca dojki po indikaciji uz mjerenje dimenzija primarnog tumora, ultrazvuk jetre, radiogram grudnog koša i pluća, laboratorijski nalazi i patohistološka verifikacija karcinoma iglenom biopsijom sa određivanjem histološkog i molekularnog tipa, gradusa, ER, PgR, HER2, Ki-67, BCL-2 i CA-IX. Kompletna dijagnostika je urađena na Klinici za radiologiju KCU Sarajevo.



Ultrazvučna dijagnostika dojki je rađena na aparatima Sonoline Adara (Siemens) i Voluson 730 PRO (General Electric). Korištene su linearne sonde od 12 MHz i gel za ultrazvuk. Ultrazvučna dijagnostika jetre je rađena na istim aparatima sa konveksnom sondom 3,5 MHz. Mamografija je rađena na aparatu Mamomat 3000 (Siemens), slikane su 4 projekcije po 2 CC (kraniokaudalno) i 2 MLO (mediolateralno), za svaku dojku po dvije različite projekcije, sa referentnim vrijednostima 26-32 KW i 40-150 mA zavisno od veličine dojke. MRI dojki je rađen na aparatima: Siona 1,5T (General Electric), Avanto 1,5T (Siemens) i Trio 3T (Siemens) uz upotrebu intravenoznog kontrasta na bazi gadoliniuma. Radiografija pluća i grudnog koša je rađena na aparatu Pulmo Multix CP Gen Polyphos (Siemens) za PA i profilni snimak sa referentnim vrijednostima od 63 KW, 6,3 mAS. Svi laboratorijski nalazi su obrađivani na Kliničkoj biohemiji sa imunologijom KCU Sarajevo. Igljena biopsija (needle core biopsy) je urađena kod svih pacijentica sa automatskim pištoljem Bard Magnum uz upotrebu igala širine 14G. Biopsija širokom iglom je izvođena u lokalnoj anesteziji primjenom lidokaina u kombinaciji s adrenalinom kako bi se spriječilo krvarenje i nastanak hematoma. Nakon učinjene incizije skalpelom, uvođena je igla pod kontrolom ultrazvuka i uzeti su uzorci, cilindri tkiva za patohistološku analizu. Uzeta su po dva do tri uzorka po pacijentici, zavisno od kvalitete i dužine uzorka, a zatim su svi uzorci potopljeni u 4% rastvor formalina i transportovani na patologiju radi histološke obrade. Svi patohistološki nalazi sa imunohistohemijskim analizama, poslije iglene biopsije i postoperativno, su urađeni na odjelu Klinička patologija, citologija i humana genetika KCU Sarajevo. Po protokolu za karcinome dojki određeni su histološki tip i gradus tumora, limfovaskularna proliferacija, status ER, PgR, HER2, Ki-67, BCL-2 i CA-IX markera u svim ispitivanim slučajevima. Uzorci (biopsije i hirurški resektati) su fiksirani u 10% formalinu (formaldehidu) na sobnoj temperaturi u trajanju do 24 sata (dužina fiksacije uzorka je bila direktno zavisna od vrste i debljine uzorka, po principu da formalin penetrira kroz tkivo brzinom od 0,5-1 mm na sat). Potom su uzorci podvrgnuti obradi kroz različite vrste alkohola (obično 70-100% alkohol i ksilen), a potom ukalupljeni u odgovarajuće parafinske blokove. Parafinski blokovi su rezani uz pomoć mikrotoma, na debljinu od 4-5 mikrona, a zatim bojeni standardnim hematoxylin - eosin (HE) bojenjem. Poslije HE bojenja, preparati su patohistološki pregledani. Uzorci koji su bili namijenjeni za dodatne analize u smislu imunohistohemije i in situ hibridizacije su obrađeni slijedećim postupcima:

1. Priprema neobojenih tkivnih rezova mikrotomom na debljinu od 4 mikrona
2. Sušenje preko noći na temperaturi od 60°C, deparafinizacija u xylenu i rehidracija



tkivnih rezova kroz gradirane alkohole i vodu

3. Prethodna obrada u svrhu demaskiranja odgovarajućeg epitopa (markera).

Toplotom-indukovani marker nadoknađen je kuhanjem rezova u EDTA puferu pH 8.9 u Electrolux mikrovalnoj pećnici na 1000W u ukupnom trajanju od 20 minuta i to 4x5 minuta. Poslije kuhanja, rezovi su hlađeni na sobnoj temperaturi 20 minuta, isprani vodom i potopljeni u Tris-pufer otopinu (TBS) u trajanju od 5 minuta. Endogene peroksidaze su blokirane sa Peroxidase Block otopinom u EnVison® kitu, u trajanju od 5 minuta, a zatim su rezovi oprani u TBS.

4. Imunohistohemijsko bojenje ili in situ hibridizacija (59,60).

Za imunohistohemijsku analizu su se rutinski koristili:

1 - Estrogenski receptor (ER, Clone 1D5, DAKO) i Progesteronski receptor (PR, Clone PgR636, DAKO) su evaluirani imunohistohemijski (IHC) na formalin-fiksiranom u parafin-ukalupljenom tkivu, koristeći ranije validiran esej (J Clin Oncol 1999;17:1474) i u skladu sa ASCO/CAP preporukama (Arch Pathol Lab Med 2010;134:907 i J Clin Oncol 2010;28:2784). Rezultati su bodovani i interpretirani koristeći procenat pozitivnih tumorskih stanica kao kriterij (Arch Pathol Lab Med 2010;134:907). Tumori se smatraju pozitivnima ako su ER i PR pozitivni u više od 1% tumorskih stanica (nuklearno bojenje), a hormonski negativni ako je pozitivno manje od 1% tumorskih stanica.

2 - Her-2/neu protein ekspresija je urađena prema validiranom eseju proizvođača (HercepTest, DAKO), a rezultati su interpretirani prema važećim preporukama ASCO/CAP (J Clin Oncol 2013). Za Her-2/neu pozitivnost se koristio scoring sistem:

- score 0 (negativan): nema membranskog bojenja ili u manje od 10% tumorskih ćelija

- score 1+ (negativan): slabo/jedva vidljivo membransko bojenje u više od 10% tumorskih ćelija (djelomično obojene membrane)

- score 2+ (borderline): umjereno, kompletno membransko bojenje u više od 10% tumorskih ćelija; neophodno je uraditi in situ hibridizaciju radi provjere statusa gena

- score 3+ (pozitivan): kompletno, intenzivno membransko bojenje u više od 10% tumorskih ćelija

Kod granične vrijednosti ekspresije (skor 2+) HER2 rađena je in situ hibridizacija (ISH) radi provjere statusa gena. Korišteni su: hromogena in situ hibridizacija (CISH) i silver in situ hibridizacija (SISH). CISH dualna proba je provođena korištenjem DAKO Dual CISH™ (SK108). Interpretacija rezultata se vršila prema preporuci proizvođača. SISH dualna metoda je provođena korištenjem Coctail Assay (proizvođač Roche Ventana).



Interpretacija rezultata se vršila prema validiranom eseju proizvođača i ASCO/CAP vodiču (referenca: Wolff AC et al. Arch Pathol Lab Med 2014;138:241-56).

Kao tačka koja označava graničnu vrijednost za definisanje HER2 amplifikacije prihvaćeno je šest ili više kopija.

- U slučajevima sa visokom amplifikacijom gena ubrajaju se oni sa deset i više kopija po ćeliji, u više od 50% tumorskih ćelija.
- Slabom amplifikacijom smatraju se oni sa 6-9 kopija po ćeliji u više od 50% tumorskih ćelija.
- Bez amplifikacije su oni sa 1-5 kopija po ćeliji u više od 50% tumorskih ćelija.

Granična vrijednosti za HER2 kod ISH je 2,0. Normalne vrijednosti su manje od 2, a visoke vrijednosti su preko 2.

3 - Za određivanje procenta proliferacije je korišten Ki-67 marker (MIB1 antitijelo), a cutoff je 14% prema St.Gallen 2013 (Ann Oncol 2013). Proliferacioni faktor je nizak kada je Ki-67  $\leq 14\%$ , intermedijarni kada je Ki-67 u rasponu 15% - 30%, a visok kada je  $>30\%$ .

4 - Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia 2 protein) ekspresija je urađena prema validiranom eseju proizvođača sa anti-Bcl-2 (1:20, klon bcl-2/100/D5, Novocastra Laboratories, Newcastle na Tyne, UK) inkubiran u trajanju od 30 minuta, a rezultati su prezentirani prema važećim preporukama određivanjem procenta pozitivnih ćelija u odnosu na intenzitet bojenja (0-3):

0 - odsustvo bojenja- negativno

1+ - slaba obojenost- slabo pozitivno

2+ - umjerena obojenost- srednje pozitivno

3+ - prebojenost citoplazme izrazitog intenziteta- jako pozitivno

Cutoff vrijednost je 10% za razlikovanje pozitivne i negativne ekspresije.

5 - Za Carbonic anhydrase CAIX, endogeni marker tumorske hipoksije, ekspresija je urađena prema validiranom eseju proizvođača, rabbit polyclonal primary antibodies raised against CAIX (ab15086, AbCam, Cambridge, UK, diluted 1:2000) na streptavidin-biotin-peroxidase complex principu (Ultravision Detection System Anti-polyvalent, HRP, Lab Vision Corporation, Fremont, CA). Za CAIX pozitivnost je korišten kvantitativni bodovni sistem određivanjem stepena bojenja plazmatske membrane:

score 0: 0% - nema membranskog bojenja

score 1:  $<5\%$  - membransko bojenje u manje od 5% tumorskih ćelija

score 2: 5-50% - membransko bojenje u do 50% tumorskih ćelija

score 3:  $>50\%$  - membransko bojenje u više od 50% tumorskih ćelija



Korišten je i kvalitativni bodovni sistem određivanja stepena bojenja plazmatske membrane:

score 0: negativno

score 1: slabo membransko bojenje

score 2: srednje jako membransko bojenje

score 3: jako membransko bojenje

Krajnji rezultat je dobijen sabiranjem oba parametra (procentualna proširenost bojenja i intenzitet bojenja) svrstavanjem u 2 grupe: negativna ekspresija (score 0-2) i pozitivna ekspresija (score 3-6).

6- Korišteno je histološko stepenovanje po Nottingham-skoj metodi (modifikacija Scarff-Bloom-Richardson metode po Elstonu i Ellisu) koja daje precizne kriterije za svaku od tri ocjenjivane morfološke osobine: stvaranje tubula, polimorfizam jezgara i broj mitoz. Svaka od te tri osobine ocjenjuje se sa 1-3 boda, a gradus se određuje sabiranjem bodova:

- gradus 1 (dobro diferencirani tumori): 3-5 bodova

- gradus 2 (srednje diferencirani tumori): 6-7 bodova

- gradus 3 (slabo diferencirani tumori): 8-9 bodova

Kriteriji za ocjenjivanje morfoloških osobina su:

- Stvaranje tubula: 1 bod- >75% tumorske mase; 2 boda- 10-75% tumorske mase; 3 boda- <10% tumorske mase.

- Polimorfizam jezgre: 1 bod- blag; 2 boda- umjeren; 3 boda- izražen.

- Broj mitoz (u promjeru vidnog polja 0,44 mm): 1 bod- 0-5; 2 boda- 6-10; 3 boda- >11.

Sa navedenim nalazima sve pacijentice su prezentirane na onkološkom konziliju za tumore dojki gdje je određena vrsta neoadjuvantne hemoterapije. Neoadjuvantnu hemoterapiju sve pacijentice su primale na Klinici za onkologiju KCU Sarajevo. U studiji je korištena sekvencijalna neoadjuvantna hemoterapija po šemi FEC x 3 → Taksotera x 3 ( na 3 sedmice):

- FEC/CEF: 5-FU 500-600mg/m<sup>2</sup> i.v.; Epirubicin 50-100mg/m<sup>2</sup> i.v.; Cyclophosamide 500-600mg/m<sup>2</sup> i.v. ponavljati svake 3 sedmice (ili svake 2 sedmice sa G-CSF)

- Taxotera 75 mg/m<sup>2</sup> i.v. ponavljati svake 3 sedmice.

Prije svakog ciklusa hemoterapije rađena je klinička procjena terapijskog odgovora: pacijenti sa povoljnim ranim terapijskim odgovorom na antracikline (parcijalan ili kompletan klinički odgovor) nastavljaju sa hemoterapijom do ukupno 6 ciklusa sekvencijalnim režimom sa agensima neukrštene rezistencije iz grupe taksana. Sve pacijentice su poslije hemoterapije hirurški tretirane na Klinici za opštu i abdominalnu



hirurgiju, na odjeljenju glandularne hirurgije, KCU Sarajevo, u smislu radikalnog ili poštednog operativnog zahvata uz obaveznu disekciju limfnih čvorova istostrane aksile.

U postoperativnoj patohistološkoj obradi tumora uz određivanje histološkog tipa i gradusa tumora, limfovaskularne invazije, statusa ER i PgR, HER2, Ki-67, bcl-2 i CAIX markera, urađena je i procjena regresionog statusa bolesti (procjena odgovora primarnog tumora na hemoterapiju):

1. Kompletan odgovor (pCR)
2. Približno kompletan odgovor (pNCR)
3. Parcijalni odgovor (pPR)
4. Nema odgovora (pNC)

Procjena regresije je izvršena na osnovu dva osnovna parametra, rezidualnog tumora i statusa limfnih čvorova. Kod tumora su mjereni dimenzije (dvije najveće), celularnost i prisustvo karcinoma in situ, a kod limfnih čvorova broj pozitivnih i dijametar najveće metastaze. (Residual Cancer Burden (RCB), MD Anderson Cancer Center).

RCB sistem je definisan:

RCB-0 -	nema karcinoma u dojci i limfnim čvorovima - odgovara pCR
RCB-I -	minimalni rezidualni karcinom (minimal) - odgovara pNCR
RCB-II -	umjeren rezidualni karcinom (moderate) - odgovara pPR
RCB-III -	veliki rezidualni karcinom (extensive) - odgovara pNC

Unaprijed određene granične vrijednosti kod ostatnog karcinoma su 1,36 i 3,28 bodova.

Celularnost tumora je histološka procjena prosječnog broja ćelija karcinoma i in situ karcinoma u ležištu ostatnog tumora izražena u postocima (1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%). Celularnost je mjerena na 5 uzoraka iz najvećeg prečnika ležišta karcinoma. Celularnost se određuje na najbliže 10%, sa dodatim vrijednostima 1% i 5% za vrlo mali broj karcinomskih ćelija.

Patohistološki nalazi dojke sa tumorom i aksilarnih limfonoda, kao i raniji nalazi svih operisanih bolesnica su ponovo predstavljeni na onkološkom konziliju za tumore dojki gdje su upoređene histološke i molekularne karakteristike tumora prije hemoterapije i poslije operacije uz procjenu rezidualne bolesti, te određene dalje terapijske smjernice.

Sistem ocjenjivanja je dizajniran za potrebe istraživanja. Nije bilo promjena u odnosu na plan istraživanja predstavljen u prijavi ove doktorske disertacije. Ispitivani parametri i korištene metode daju dovoljno elemenata da ovo istraživanje učine kvalitetnim.



Statistička obrada podataka je bila egzaktna i adekvatna. U skladu sa postavljenim hipotezama i ciljevima ovoga istraživanja pacijenti su podijeljeni u odgovarajuće grupe što je omogućilo kvalitetno istraživanje, kompariranje i obradu zadatih varijabli. Rezultati su prikazani deskriptivno, numerički, tabelarno i grafički. Analiza je provedena korištenjem statističkog paketa IBM Statistics SPSS (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) uz prethodnu pripremu podataka, te izradu završnih tabela korištenjem programskog paketa Microsoft Office 2016 (Redmond, Washington, USA). Provedene su univarijante i multivarijantne analize zadatih varijabli u odnosu na njihov mogući uticaj na uspješnost neoadjuvantne hemoterapije procjenom rezidualne bolesti (procjenom kompletnog patološkog odgovora), poređenjem parametara prije hemoterapije i postoperativno pojedinačno i po ispitivanim grupama. Parametrijski podaci su obrađeni prikazom apsolutnih vrijednosti, izračunavanjem procentualnih vrijednosti, aritmetičkih sredina uz računanje standardne devijacije, te putem t-Student testa (dvostrani, neupareni, uz izračunavanje varijance koja će dodatno odrediti vrstu neophodnog testa). Neparametrijski podaci su takođe prikazani u apsolutnim i procentualnim vrijednostima. Apsolutne vrijednosti neparametrijskih podataka su obrađene  $X^2$  testom (po metodi malih, odnosno velikih, nezavisnih ili zavisnih uzoraka u zavisnosti od broja ispitanika i zadatih varijabli). Postojanje korelacije između istraživanih varijabli i rezultata primjene neoadjuvantne hemoterapije je provjeravano testom po Spearman-u ili Pearson-u. Identifikacija nezavisnih prediktivnih faktora je izvršena korištenjem multivarijantne logističke regresione analize. Rezultati svih navedenih testova su smatrani statistički signifikantnim na nivou pouzdanosti od 95% ili uz  $p < 0,05$ . Utvrđeni su vlastiti rezultati i izvršena komparacija sa podacima relevantnih istraživanja prezentiranih u savremenoj referentnoj literaturi uz prezentaciju diskusije i komentara.

Analizirajući obrađeni materijal, opisane metode i materijal istraživanja, a imajući u vidu dosadašnja iskustva i dostignuća u ovoj oblasti, komisija konstatuje da su primjenjene metode adekvatne, a ispitivani parametri dovoljno obrađeni i objektivno tumačeni.

## VI REZULTATI I NAUČNI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

1) Dobijeni rezultati doktorske disertacije su prikazani na 97 strana, a analizirani su kroz diskusiju na 34 strane.

Analiza dobi ispitanica pokazuje da ne postoji statistički signifikatna razlika između promatranih grupa. U obje grupe češće je karcinomom bila zahvaćena lijeva dojka



bez statistički značajne razlike. Analiza između ispitivanih grupa ne pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na histološki tip karcinoma, češći je bio duktalni nego lobularni karcinom. U obje posmatrane grupe češće je rađena mastektomija nego pošteditni operativni zahvati. Prije i poslije neoadjuvantne hemoterapije dimenzije tumora se statistički ne razlikuju značajno između grupa uz registovanu izrazitu regresiju veličine. U kompletnom uzorku i pojedinačno po grupama postoji značajna statistička razlika u dimenzijama tumora prije i poslije hemoterapije. Prema zadatim parametrima analiza ukazuje da postoji statistički značajna razlika po molekularnom tipu između grupa prije i poslije hemoterapije. U hormonalno pozitivnoj grupi poslije hemoterapije je u jednom slučaju došlo do zamjene molekularne grupe iz luminal A u B1, bez statistički značajne razlike. Kod trostruko negativne grupe je poslije hemoterapije došlo do promjene molekularnog tipa kod 5,0% slučajeva u luminal A i 20,0% u luminal B1 uz značajnu razliku. Posmatrano na kompletnom uzorku analiza nije pokazala značajnu razliku u molekularnom statusu tumora prije i poslije terapije. Statistička analiza je pokazala da ne postoji značajna razlika u statusu limfonoda aksile prije i poslije hemoterapije između posmatranih grupa, prije tretmana su u obje grupe bili visoko procentualno pozitivni na metastaze, a poslije je nešto bolja regresija bila kod trostruko negativnih tumora. Posmatrano na kompletnom uzorku poslije hemoterapije je verificiran porast broja ispitanica sa negativnim limfonodima sa 16,3% na 45,0%. Postoji statistički značajna razlika u statusu limfonoda aksile prije i poslije hemoterapije kako kod ukupnog uzorka tako i po grupama. Prije i poslije neoadjuvantne hemoterapije je zabilježena statistički značajna razlika između grupa u Nottingham histološkom skoru. Prije terapije, 65,0% hormonalno pozitivnih karcinoma su bili srednje diferencirani, a 75,0% trostruko negativnih su bili slabo diferencirani. Poslije hemoterapije je u obje grupe verificirano postojanje histološki dobro diferenciranih karcinoma, kojih nije bilo prije terapije. U kompletnom uzorku i po grupama postoji značajna razlika u histološkom skoru prije i poslije hemoterapije. Prije hemoterapije, prema zadatom kriteriju za formiranje grupa, svi karcinomi u hormonalno pozitivnoj grupi su imali pozitivan ER, a svi u trostruko negativnoj su imali negativan ER. Prema ekspresiji estrogena u tumoru nakon terapije u hormonalno pozitivnoj grupi svi imaju pozitivan receptor, a u trostruko negativnoj grupi kod 27,5% slučajeva uz statistički značajnu razliku. Postoji signifikantna razlika u statusu ER kod trostruko negativnih karcinoma prije i poslije hemoterapije, ali ne i na kompletnom ispitivanom uzorku. Između grupa i u trostruko negativnoj grupi postoji statistički značajna razlika prema statusu progesteron receptora prije i nakon hemoterapije. U hormonalno pozitivnoj grupi nije zabilježena značajna



razlika u PgR pod uticajem hemoterapije. Statistička analiza ukazuje na postojanje značajne razlike u HER2 statusu karcinoma između grupa prije i poslije hemoterapije. U hormonalno pozitivnoj grupi je poslije neoadjuvantne hemoterapije došlo do smanjivanja broja HER2 pozitivnih karcinoma, a u hormonalno pozitivnoj do porasta broja ali bez statistički značajne razlike. Biopsijom verificirana ekspresija Ki-67 u karcinomu između grupa je bila značajno različita, dok poslije hemoterapije nije bilo razlike uz izrazito snižavanje vrijednosti. Analizom je zabilježena statistički značajna razlika u vrijednostima Ki-67 u tumoru kod kompletnog uzorka i pojedinačno po grupama, prije i poslije hemoterapije. Prije neoadjuvantne hemoterapije postoji statistički značajna razlika između grupa prema statusu BCL-2 ekspresije u karcinomu, a razlika je zabilježena i u trostruko negativnoj grupi uz smanjivanje broja BCL-2 negativnih sa 80,0% na 50,0%. Analizom kompletnog uzorka nema značajne promjene BCL-2 ekspresije u tumoru pod uticajem hemoterapije. Značajno više vrijednosti CA-IX ekspresije su zabilježene u trostruko negativnom karcinomu prije hemoterapije, dok se razlika između grupa izgubila poslije terapije. Iako su hormonalno negativni karcinomi imali izrazitiju promjenu CA-IX ekspresije djelovanjem hemoterapije niti u jednoj grupi razlika nije bila statistički značajna. Nakon neoadjuvantne hemoterapije kod hormonalno pozitivnih karcinoma prisutnost in situ komponente u tumoru je značajno progredirala sa 27,5% na 52,5%. Verificirana je i statistički relevantna razlika između grupa. Mikrokalcfikati u karcinomu su značajno češće bili prisutni u hormonalno pozitivnoj grupi kod 35,0% slučajeva u odnosu na 15,0% slučajeva u trostruko negativnoj grupi. Nije zapažena značajnija razlika u limfovaskularnoj invaziji (LVI) karcinoma iako je u hormonalno pozitivnoj grupi bila izrazitija. Resekcione margine poslije operacije su bile nesignifikantno češće pozitivne kod trostruko negativnih karcinoma. Ispitanice u trostruko negativnoj grupi su imale neznatno manju celularnost tumora sa prosjekom od  $33,8 \pm 30,2$  % (raspon 1-90 %) u odnosu na ispitanice u hormonalno pozitivnoj grupi sa prosjekom celularnosti tumora od  $34,2 \pm 3,6$  % (raspon 1-80 %). Postoji statistički značajna razlika u stadiju tumora posmatrano na kompletnom ispitivanom uzorku i pojedinačno, po grupama, prije i poslije hemoterapije. Prije neoadjuvantne hemoterapije 2B stadij karcinoma je bio najniži kako je i zadato u parametrima studije, a stadij 3C je bio najzastupljeniji u obje grupe. Poslije terapije zabilježeni su slučajevi u svim stadijima karcinoma.

Kompletna patološki odgovor na neoadjuvantnu hemoterapiju je bio kod 20,0% ispitanica iz "triple" negativne grupe, a kod 12,5% ispitanica iz hormonalno pozitivne grupe. Analizom ne postoji statistički značajna razlika između grupa u odgovoru na



neoadjuvantnu hemoterapiju, iako su nešto bolji odgovor imali trostruko negativni karcinomi. Kompletan odgovor na neoadjuvantnu hemoterapiju u ukupnom uzorku je bio kod 16,3% slučajeva, sve sa duktalnim karcinomom, izrazitije kod trostruko negativnih karcinoma ali bez statistički značajne razlike. Analiza podataka pokazuje značajno bolji odgovor na hemoterapiju kod karcinoma manjih dimenzija. Veličina tumora se pokazala kao važan faktor za procjenu odgovora na hemoterapiju u ispitivanim grupama. Redukcija u dimenzijama karcinoma pod uticajem hemoterapije je zabilježena kod 62,5% ispitanica. Statistička analiza podataka pokazuje da postoji značajna razlika u kompletnom uzorku i po grupama u odnosu odgovora na neoadjuvantnu hemoterapiju i statusa limfnih čvorova u aksili. Redukcija u broju zahvaćenih limfnih čvorova aksile pod uticajem neoadjuvantne hemoterapije je zabilježena kod 47,5% ispitanica. Histološki skor karcinoma značajno utiče na odgovor tumora na hemoterapiju kod obje grupe, nešto izrazitije kod trostruko negativnih karcinoma. Smanjivanje vrijednosti u histološkom skoru karcinoma pod uticajem neoadjuvantne hemoterapije je zabilježeno kod 32,5% (26/80) ispitanica. Ekspresija ER nema statistički važan uticaj na odgovor tumora na hemoterapiju osim u hormonalno pozitivnoj grupi gdje je bilo 45,0% hemorezistentnih karcinoma. Kompletan patološki odgovor i ukupno bolji odgovor karcinoma na neoadjuvantnu hemoterapiju su češće imali ER negativni tumori. Nepromjenjenu ekspresiju ER u karcinomu nakon provedene neoadjuvantne hemoterapije je imalo 86,3% ispitanica. Gledano po grupama ekspresija PgR nema značajan uticaj na odgovor tumora na hemoterapiju, a nešto bolji odgovor su imali progesteron negativni karcinomi. Nepromjenjenu ekspresiju PgR u karcinomu nakon provedene neoadjuvantne hemoterapije su imale 91,2% ispitanica. Ekspresija HER2 nema statistički značajnog uticaja na odgovor karcinoma na hemoterapiju antraciklinima i taksanima iako su nešto bolji odgovor imali HER2 negativni tumori. Nepromjenjenu ekspresiju HER2 u karcinomu nakon provedene neoadjuvantne hemoterapije su imale 96,2% ispitanica. Niske vrijednosti Ki-67 poslije neoadjuvantne hemoterapije je imalo 57,5% pacijentica. Statističkom analizom je nađeno da ekspresija Ki-67 ima značajan uticaj na odgovor karcinoma na hemoterapiju. Na ukupnom uzorku smanjena ekspresija Ki-67 u karcinomu je nađena kod 60,0% (48/80) ispitanica, a povećana kod samo 2,5% (2/80) slučajeva, oba kod hemorezistentnih tumora. Povećana ekspresija BCL-2 u karcinomu nakon hemoterapije je nađena kod 86,2% ispitanica, a snižena kod 5,0% slučajeva. Statističkom analizom promjena ekspresije BCL-2 nema značajnog uticaja na odgovor karcinoma na hemoterapiju, a nešto bolji odgovor su imali bcl-2 negativni tumori. Smanjena ekspresija CA-IX u karcinomu poslije neoadjuvantne



hemoterapije je nađena kod 20,0% ispitanica i statistički nema značajnog uticaja na odgovor tumora na terapiju kako po grupama tako i na ukupnom uzorku. Nešto bolji odgovor na terapiju su imali CA-IX pozitivni karcinomi. In situ komponenta u karcinomu, posmatrano na ukupnom uzorku, ima značajan uticaj na odgovor tumora na hemoterapiju. Bolji je odgovor tumora bez in situ karcinoma jer je od 16,3% slučajeva sa kompletnim odgovorom na terapiju kod 15,0% je bio negativan in situ karcinom. Nakon provedene neoadjuvantne hemoterapije na kompletnom uzorku je nađeno da bazal like karcinom pokazuje bolji odgovor na hemoterapiju, ali bez statistički značajne razlike. Najlošiji odgovor na hemoterapiju je bio kod luminal B1 tipa karcinoma. Mikrokalcifikati u karcinomu su procentualno bili češće prisutni u hormonalno pozitivnoj grupi uz izražen slabiji odgovor na neoadjuvantnu terapiju. Limfovaskularna invazija u karcinomu poslije neoadjuvantne hemoterapije je bila prisutna kod 57,5% slučajeva, od kojih je 33,8% imalo hemorezistentni karcinom, a niti jedan nije imao kompletan odgovor na terapiju. Karcinomi sa limfovaskularnom invazijom su imali značajno slabiji odgovor na hemoterapiju po grupama i na ukupnom uzorku. Poslije neoadjuvantne hemoterapije u ispitivanom uzorku je najviše bilo karcinoma stadija 2A kod 18,8% slučajeva, a najmanje stadija 3C kod 7,5% slučajeva. Karcinomi višeg stadija bolesti su imali slabiji odgovor na hemoterapiju kako po grupama tako i na ukupnom uzorku, a statističkom analizom je zabilježena značajna razlika. Poslije hemoterapije najviše je bilo hormonalno pozitivnih karcinoma stadija 2A kod 25,0% slučajeva, a trostruko negativnih karcinoma stadija TisN0 kod 20,0% slučajeva. Na kompletnom ispitivanom uzorku i pojedinačno po grupama, analiza varijance ANOVA pokazuje da postoji statistički značajna povezanost između celularnosti karcinoma i procjene odgovora na neoadjuvantnu hemoterapiju. Veća celularnost karcinoma je i veći RCB tj. lošiji odgovor tumora na neoadjuvantnu hemoterapiju. Prosječno veća celularnost je kod karcinoma koji su imali slabiji odgovor na hemoterapiju, a što je pokazano i putem Pearson-ovog koeficijenta korelacije. U odnosu sa RCB procjenom odgovora na neoadjuvantnu hemoterapiju Ki-67, BCL-2 i CA-IX nemaju statistički značajnu povezanost i ne mogu se smatrati nezavisnim prediktivnim faktorom. Nottingham histološki skor, celularnost tumora i resekcione margine su varijable koje pokazuju značajan uticaj na odgovor karcinoma na hemoterapiju u ukupnom uzorku. Limfonodi aksila imaju graničnu p vrijednost, a celularnost tumora pokazuje značajan uticaj na odgovor hormonalno pozitivnog karcinoma, dok celularnost i resekcione margine pokazuju značajan uticaj na odgovor hormonalno negativnog karcinoma na hemoterapiju.

Na osnovu dobijenih vrijednosti u istraživanju kandidat je izveo sljedeće rezultate:



- Patohistološka procjena regresionog statusa bolesti poslije operativnog tretmana je dokazala bolji odgovor na kombinovanu hemoterapiju antraciklinima i taksanima kod trostruko hormonski negativnih nego kod hormonski pozitivnih lokalno uznapredovalih karcinoma dojke.
- Histološki tip i imunohistohemijski profil uznapredovalog karcinoma dojke je značajno uticao na efikasnost kombinovane neoadjuvantne hemoterapije antraciklinima i taksanima.
- Promjena nivoa ekspresije markera tumorske proliferacije Ki-67 nakon kombinovane neoadjuvantne hemoterapije antraciklinima i taksanima je u većem broju slučajeva pokazala gubitak ekspresije kod trostruko negativnog karcinoma nego kod hormonski pozitivnog uznapredovalog karcinoma dojke.
- Utvrđeno je da je visoka ekspresija BCL-2 markera izraženija kod hormonskih pozitivnih karcinoma dojke nego kod trostruko negativnih karcinoma, a vezana je za slabiju regresiju tumora na neoadjuvantnu hemoterapiju antraciklinima i taksanima.
- Dokazano je da je odsutnost ekspresije BCL-2 u tumoru nakon iglene biopsije koristan faktor za predviđanje osjetljivosti na hemoterapiju sa antraciklinima i taksanima, BCL-2 negativni tumori su imali bolji odgovor na hemoterapiju nego BCL-2 pozitivni.
- Utvrđeno je da je gubitak ekspresije markera ćelijske hipoksije CA-IX u tumoru pokazatelj dobre regresije na kombinovanu neoadjuvantnu hemoterapiju antraciklinima i taksanima, a izrazitije je kod trostruko negativnih uznapredovalih karcinoma dojke.
- Ustanovljeno je da su trostruko negativni karcinomi dojke češće imali ekspresiju CA-IX nego hormonalno pozitivni karcinomi dojke.
- Dokazano je da je ekspresija CA-IX u tkivu tumora nakon iglene biopsije koristan faktor za predviđanje osjetljivosti na kombinovanu hemoterapiju, a CA-IX ekspresija u reseciranom tumoru je koristan faktor za prognozu preživljavanja.
- Potvrđena je učestalost javljanja viših histoloških gradusa primarnog tumora kod obje grupe pacijentica, posebno kod inflamiranog karcinoma.
- Dokazano je da je neoadjuvantna hemoterapija u kombinaciji antraciklina i taksana terapijski standard u onkološkom tretmanu kod lokalno uznapredovalih trostruko



negativnih karcinoma dojke, a efikasnost ove terapije se kod ostalih molekularnih tipova karcinoma dojke poboljšava kombinacijom sa drugim lijekovima.

- Vrijednost BCL-2 i CA-IX markera kao faktora za procjenu odgovora tumora na neoadjuvantnu hemoterapiju na ispitivanom uzorku nije statistički potvrđena.

## 2) Kritičnost i korektnost tumačenja rezultata

Rezultati istraživanja su jasno prikazani, pregledno prezentirani i objektivno tumačeni. Kandidat je u doktorskoj disertaciji pokazao objektivan i kritički stav u analizi rezultata, posebno u dijelu koji se odnosi na komparaciju rezultata sa rezultatima dosadašnjih istraživanja, a koja su provedena u ovoj naučnoj oblasti. Diskusija rezultata pokazuje sposobnost kandidata u prikupljanju, analizi i preglednoj prezentaciji rezultata, kao i da na jasan i sveobuhvatan način pristupi komparaciji prikazanih rezultata sa literaturnim podacima.

## 3) Teorijski i praktični doprinos disertacije i novi istraživački zadaci

Rezultati ove doktorske disertacije doprinose i proširuju postojeća saznanja o lokalno uznapredovalim karcinomima dojke kao i o efikasnosti kombinovane neoadjuvantne hemoterapije antraciklinima i taksanima na malignu bolest. Istražujući uticaj specifične sekvencijalne sistemske terapije na određene molekularne tipove karcinoma dokazan je bolji potološki odgovor na regresiju kod trostruko negativnih tumora što u perspektivi može dati neke smjernice za adekvatnija terapijska djelovanja. U istraživanju je dat poseban osvrt na imunopatološka dešavanja u tumoru, molekularni status karcinoma i promjene koje se javljaju nakon sistemske terapije. Uzevši u obzir ove rezultate, naučni doprinos doktorske disertacije se zasniva na pružanju dokaza o postojanju tumorskih, imunoloških markera koji određuju kliničke i patohistološke osobine oboljenja. Naučni doprinos disertacije odražavaju i rezultati u istraživanju koji nisu u potpunosti u skladu sa podacima u literaturi, a oni dokazuju da su u osnovi etiopatogenetskih mehanizama lokalno uznapredovalog karcinoma dojke složeni i dinamički procesi koji rezultiraju promjenjivim modelom tkivne reakcije i samo su djelimično podudarni sa kliničkom slikom oboljenja.

Osnovni praktični doprinos doktorske disertacije je u procjeni odgovora tumora na neoadjuvantnu hemoterapiju determinisanjem njegovih molekularnih osobina kao prediktivnih faktora, a uz imperativ adekvatne resektabilnosti tumora u hirurškom terapijskom djelovanju i da se pri tome ne djeluje negativno na dužinu preživljavanja. Aplikiranje hemoterapije prije operacije omogućava direktno praćenje reakcije tumora kao i promjene specifičnih imunopatogenetskih markera i na osnovu toga se može



postoperativno korigovati onkološka terapijska šema radi veće efikasnosti. Rezultati ove disertacije ukazuju na moguće prediktorne karakteristike bcl-2 i CA-IX tumorskih markera za procjenu odgovora na hemoterapiju određenih molekularnih tipova karcinoma, a samim tim bi mogli imati kliničku vrijednost kao prediktori uspješnosti liječenja i odabir terapijskih modaliteta.

Ova doktorska disertacija daje odgovore na postavljeni problem ali usmjerava i dalja istraživanja u pogledu patofiziologije lokalno uznapređovalog karcinoma dojke i terapijskih šema u neoadjuvantom protokolu, posebno kombinacijom antraciklina i taksana. Na osnovu dobijenih rezultata se može procijeniti efikasnost specifične neoadjuvantne hemoterapije procjenom rezidualne bolesti u odnosu na zadate varijable čime se daje mogućnost za donošenje odgovarajućih, personaliziranih i ciljanih terapija. Prema rezultatima ovog istraživanja biomarkeri bcl-2 i CA-IX imaju potencijal kao nezavisni prognostički i prediktivni faktori kod specifičnih molekularnih tipova karcinoma dojke. Osnovni pravci daljih istraživanja trebaju biti usmjereni na dostupne i efikasne metode detekcije opserviranih imunoloških markera koji su obuhvaćeni ovim istraživanjem.

## VII ZAKLJUČAK I PRIJEDLOG

Doktorska disertacija mr sc.med Edine Balta pod nazivom "Značaj neoadjuvantne terapije antraciklinima i taksanima u regresiji uznapređovalog karcinoma dojke" izrađena je u skladu sa obrazloženjem koje je kandidat priložio prilikom prijave teme. Doktorska disertacija je urađena prema pravilima i principima naučno-istraživačkog rada i rezultat je originalnog naučnog rada kandidata. Rezultati ovog istraživanja pokazuju uticaj sekvencijalne neoadjuvantne hemoterapije antraciklinima i taksanima na specifične molekularne tipove lokalno uznapređovalog karcinoma dojke, na promjene koje se dešavaju u patofiziologiji oboljenja, a što u nastavku konzervativnog onkološkog tretmana daje smjernice daljnjeg terapijskog djelovanja. Na osnovu dobijenih rezultata se može realnije procijeniti uspješnost specifične neoadjuvantne hemoterapije procjenom rezidualne bolesti kod uznapređovalih karcinoma u odnosu na zadate varijable i njihove kombinacije. Zatim, rezultati ove disertacije su analizom povezanosti biomarkera Ki-67, bcl-2 i CA-IX sa stepenom patološke regresije kod hormonalno pozitivnih i negativnih karcinoma dojke djelovanjem hemoterapije omogućili procjenu vrijednosti navedenih tumorskih markera kao nezavisnih prediktivnih i prognostičkih faktora. Kandidat je doktorskoj disertaciji dao okvir za



povećati stopu (7-12%) pošteđnih operativnih zahvata dojke (12). Petogodišnja stopa preživljavanja se pomjerila sa 10-20% uz samo lokalnu terapiju, na 30-60% terapijskim multidisciplinarnim pristupom (13). Prednost neoadjuvantne hemoterapije je i zbog ranog davanja sistemskog lijeka uz "in vivo" praćenje odgovora i mogućnost proučavanja bioloških efekata terapije, kao i mogućnost promjene terapije kod neadekvatnog odgovora (14). Za smanjenje pojave lokalnih recidiva zaslužni su poboljšani standardi u hirurgiji, patologiji i onkologiji (15). Primarna hemoterapija nakon koje slijedi operativni zahvat omogućava procjenu histopatološkog odgovora karcinoma. Kod samo 3 - 27% pacijenata vidljiv je kompletan patološki odgovor u smislu potpune regresije tumora (15). Utvrđeno je da, kad pacijenti imaju kompletan histopatološki odgovor ili imaju minimalan ostatni tumor nakon neoadjuvantne hemoterapije imaju bolju prognozu. Uz dostupnost sve više vrsta i kombinacija hemoterapije i ciljane terapije postizanje kompletnog histopatološkog odgovora tumora je cilj neoadjuvantne sistemske terapije (15,16). Primjena neoadjuvantne hemoterapije rezultira potpunim ili djelimičnim gubitkom standardnih patoloških prognostičkih pokazatelja za procjenu regresije bolesti kao što su veličina tumora i broj zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova. Magnetna rezonanca je najpouzdaniji način praćenja kliničke regresije tumora (kliničke procjene rezidualne bolesti) (16,17). U mnogim studijama su poređene neoadjuvantna sa adjuvantnom hemoterapijom i dobijene su slične stope perioda bez bolesti i ukupnog preživljavanja. Neoadjuvantna hemoterapija ima prednost u poboljšanju hirurških opcija (18). Preoperativna sistemska terapija može optimizirati hirurški tretman iskorištavanjem informacija o stepenovanju tumora, terapijskoj osjetljivosti i promjenama u biološkim karakteristikama tumora prije i poslije hemoterapije (19). Nakon neoadjuvantne sistemske terapije hirurški tretman će biti određen zavisno od podtipa karcinoma, veličine i proširenosti tumora, terapijskog odgovora i želje pacijenta (20). Za procjenu mogućnosti pošteđne hirurgije i da bi se smanjila vjerovatnoća pojave lokalnog recidiva karcinoma služi MD Anderson prognostic index (MDAPI). Porede se varijable: limfonodi N2 i N3 grupe, rezidualni tumor veličine preko 2 cm, multifokalni rezidualni karcinom i limfovaskularna invazija. Sve varijable nose po 1 bod, a u zbiru: nizak rizik do 1, srednji rizik 2, a visok rizik 3-4 (44). Za pacijente sa ER pozitivnom i HER2 negativnom bolešću kombinacija hemoterapije se procjenjuje u odnosu na veličinu tumora, gradus i proliferativnu frakciju (Ki-67 antigen), prisustvo peritumoralne vaskularne invazije i status limfnih čvorova (36). Starost manja od 50 godina i estrogen negativan tumor su nezavisne varijable udružene sa većom vjerovatnoćom patološkog kompletnog odgovora. Za pacijente sa metastazama u limfnim



čvorovima, veći broj zahvaćenih čvorova i viši stadij imaju lošiju prognozu. Pacijenti sa većim karcinomima imaju lošiju stopu preživljavanja. Uloga statusa hormonskih receptora tumora kao prognostičkog faktora je manje jasna, ali neke studije navode da je njihova pozitivnost vezana sa boljim preživljavanjem (37). Iako neoadjuvantna hemoterapija može unaprijediti operabilnost kod lokalno uznapredovalog karcinoma dojke, postoperativna adjuvantna hemoterapija je klinički standard liječenja za većinu pacijenata koji zahtijevaju hemoterapiju. Neoadjuvantna hemoterapija ne utiče značajno na poboljšanje ukupnog preživljavanja oboljelih od karcinoma dojke (12).

Kompletan patološki odgovor (pCR) se definiše kao potpuna regresija tumora bez invazivnog ili in situ karcinoma u dojci i limfnim čvorovima i može služiti kao jedan od najboljih prognostičkih faktora. (38). Kompletan histopatološki odgovor na neoadjuvantnu terapiju je zamjenski marker vezan za preživljavanje i dug period bez bolesti. Kod slabo proliferirajućih tumora pCR nije povezan sa prognozom, dok kod izrazito proliferirajućih tumora pCR može napraviti razliku između bolesnika sa dobrom i lošom prognozom. Prognostička važnost kompletnog patološkog odgovora tumora na neoadjuvantnu terapiju nije izrazita za luminal A i luminal B sa HER2 pozitivnim tipom karcinoma. Stadij tumora nakon neoadjuvantne hemoterapije značajno je povezan sa prognozom (38).

#### Citirana literatura u tekstu:

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011; 61(2): 69–90.
2. Colditz GA. Epidemiology and Prevention of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2005; 14: 768-772.
3. Anderson BO, Shyyan R, Eniu A, Smith RA, Yip C-BCL, Bese NS, Chow LWC, Masood Ramsey SD, Carlson RW. Breast Cancer in Limited-Resource Countries: An Overview of the Breast Health Global Initiative 2005 Guidelines. *The Breast Journal*. 2006; 12: 3–15.
4. Edge SB. Advances in breast surgery, 2002-2012. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013 Jan;11(1):53-9.
5. Giordano SH. Update on locally advanced breast cancer. *The Oncologist*. 2003; 8: 521-530.
6. Gonzalez-Angulo AM, Iwamoto T, Liu S, Chen BCL, Do K-A, Hortobagyi GN, Mills GB, Meric-Bernstam F, Symmans WF, Pusztai L. Gene Expression, Molecular Class Changes, and Pathway Analysis after Neoadjuvant Systemic Therapy for Breast Cancer. *Clin. Cancer Res*. 2012; 18(4):1109-1119.



7. AJCC Cancer Staging Manual. 8 th Edition. Springer International Publishin. 2017; 145-150.
8. A. Goldhirsch, W. C. Wood, A. S. Coates, R. D. Gelber, B. Thürlimann, H.-J. Senn, and 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 Aug; 22(8): 1736–1747.
9. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Feb; 107(3): 309–330.
10. Bešlija S, Vrbanec D. Medicinsaka/internistička onkologija. Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu. 2014; 227-231.
11. Serrero G, Hawkins DM, Bejarano PA, Ioffe O, Tkaczuk KR, Elliott RE, Head JF, Phillips J, Godwin AK, Weaver J, Hicks D, Yue B. Determination of GB88 (progranulin) expression in breast tumor biopsies improves the risk predictive value of the Nottingham Prognostic Index. *Diagn Pathol.* 2016; 11: 71.
12. Schott AF, Hayes D F. Defining the Benefits of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 30, No 15. 2012: 1747-1749.
13. Moon BCL, Rha SY, Jeung HC, Yang WI, Suh CO, Chung HC. Neoadjuvant chemotherapy with infusional 5-fluorouracil, adriamycin and cyclophosphamide (iFAC) in locally advanced breast cancer: an early response predicts good prognosis. *Ann Oncol.* 2005; 16(11):1778-1785.
14. Guiu S, Mouret Reynier MA, Toure M, Coudert B. Predictive Factors of Response in HER2-Positive Breast Cancer Treated by Neoadjuvant Therapy. *J Oncol.* 2013;2:854-8.
15. Avril N, Sassen S, Roylance R. Response to therapy in breast cancer. *J Nucl Med.* 2009; 50 (suppl 1):55–63.
16. Chen JH, Bahri S, Mehta RS, Kuzucan A, Yu HJ, Carpenter PM, Feig SA, Lin M, Hsiang DJ, Lane KT, Butler JA, Nalcioglu O, Su MY. Breast Cancer: Evaluation of Response to Neoadjuvant Chemotherapy with 3.0-T MR Imaging. *Radiology.* December 2011; Volume 261: 735-743.
17. Ho A, Morrow M. The Evolution of the Locoregional Therapy of Breast Cancer. *The Oncologist.* 2011; 16:1367–1379
18. Wardley A. Capecitabine: Expanding Options for the Treatment of Patients with Early or Locally Advanced Breast Cancer. *The Oncologist.* 2006;11(suppl 1): 20–26.

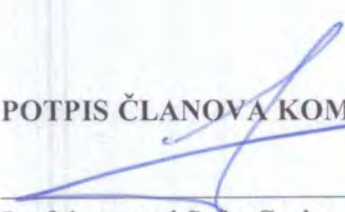
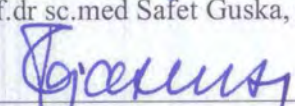
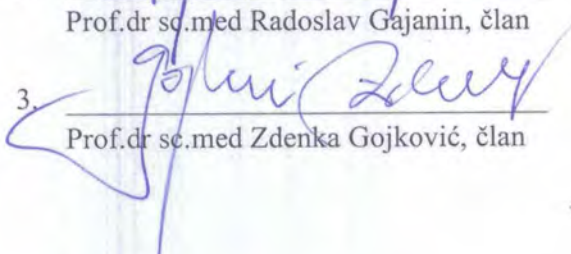


buduća istraživanja. Predložena tema je precizno i logički analizirana, a podaci su dovedeni u vezu sa postavljenim ciljevima. Kandidat je temu ove doktorske disertacije učinio korisnom za istraživače, ali i za hirurge koji rade operacije dojki kao i onkologe u njihovom praktičnom radu. Disertacija predstavlja originalni doprinos medicinskoj nauci jer proširuje znanja o značaju ispitivanih imunohistohemijskih parametara u patofiziologiji karcinoma dojke kao i o značaju neoadjuvantne hemoterapije i kombinacije hemoterapeutika u unapređenju terapijskih tretmana oboljenja.

Članovi komisije na osnovu ukupne ocjene doktorske disertacije jednoglasno daju pozitivnu ocjenu o završenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom "Značaj neoadjuvantne terapije antraciklinima i taksanima u regresiji uznapredovalog karcinoma dojke" mr sc.med Edine Balta i predlaže članovima Naučno-nastavnog vijeća Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci i Senatu Univerziteta u Banjoj Luci da prihvate ovaj Izvještaj i omoguće kandidatu da svoju doktorsku disertaciju javno odbrani.

Datum: 03.11.2021.godine

**POTPIS ČLANOVA KOMISIJE**

1.   
Prof.dr sc.med Safet Guska, predsjednik
2.   
Prof.dr sc.med Radoslav Gajanin, član
3.   
Prof.dr sc.med Zdenka Gojković, član