

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Jasmina M. Mladenović

**KORELACIJA BIOLOŠKIH MARKERA SA
ODGOVOROM NA PREOPERATIVNU
RADIOTERAPIJU LOKALNO ODMAKLOG
NEINFLAMATORNOG KARCINOMA
DOJKE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Jasmina M. Mladenović

**CORRELATION OF BIOLOGICAL
MARKERS WITH RESPONSE TO
PREOPERATIVE RADIOTHERAPY IN
LOCALLY ADVANCED
NONINFLAMMATORY BREAST CANCER**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017. godine

MENTOR: Prof. dr Vesna Plešinac Karapandžić, radiolog, vanredni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR: N.Sar. dr Snežana Šušnjar, internista-onkolog, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. dr Radan Džodić**, hirurg-onkolog, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu
2. **Doc. dr Marina Nikitović**, radiolog, docent na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu
3. **VNS dr Radmila Janković**, biohemičar, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

KORELACIJA BIOLOŠKIH MARKERA SA ODGOVOROM NA PREOPERATIVNU RADIOTERAPIJU LOKALNO ODMAKLOG NEINFLAMATORNOG KARCINOMA DOJKE

Rezime

Uvod: U terapiji lokalno odmaklog karcinoma dojke (LOKD) preoperativna radioterapija (PRT) je u današnje vreme indikovana nakon primarne (neoadjuvantne) hemioterapije (PHT) u slučaju da nije postignuta resektabilnost tumora. Pre uvođenja neoadjuvantne hemioterapije, PRT se mnogo češće koristila kao jedini neoadjuvantni pristup za inicijalno inoperabilne tumore, u cilju smanjenja tumorskog volumena i omogućavanja radikalne hirurgije. Cilj ove analize je evaluacija tumorskog odgovora i dugoročnog ishoda bolesti kod pacijenata tretiranih samo PRT, bez uticaja sistemske terapije, i procena povezanosti bioloških markera sa odgovorom na PRT.

Metod: U periodu od 1997-2000.godine 134 bolesnica sa neinflamatornim LOKD stadijuma IIIA i IIIB tretirano je preoperativnom RT. Tumorska doza je bila 45 Gy u 15 frakcija (3 Gy po frakciji) naizmenično svakog drugog dana na regiju dojke i regionalnih limfatika u toku 6 nedelja. Šest nedelja po završenoj RT, učinjena je radikalna mastektomija kod svih bolesnica i potom primenjena adjuvantna terapija (hemioterapija i/ili hormonska terapija) po tadašnjem protokolu. Ishod bolesti je procenjivan na osnovu ukupnog preživljavanja (OS) i preživljavanja bez znakova bolesti (DFS). Krive preživljavanja (OS i DFS) su procenjivane korišćenjem Kaplan-Meier metode i univarijantne statističke analize korišćenjem Log-Rank testa u cilju procene razlike između analiziranih grupa. Status hormonskih receptora ER i PgR, HER-2 status i Ki-67 su analizirani imunohistohemijskim metodama na uzorku biopsiranog tumora i uzorku na mastektomiji. Merenje genske ekspresije vršeno je iz parafinskih uzoraka tumorskog tkiva Microarray analizom.

Rezultati: Medijana praćenja iznosila je 74 meseca (ranga 4-216). Klinički odgovor tumora na PRT zabeležen je kod 77.6% bolesnica. Klinički kompletan odgovor tumora (cCR) postignut je kod 21.6% bolesnica, dok je patohistološki kompletan odgovor (pCR) u dojci registrovan kod 15% bolesnica. Od toga 10/134 (7.5%) je ostvario totalni pCR (bez invazivnog tumora u dojci i bez pozitivnih limfnih čvorova u aksili). Petogodišnje i 10-godišnje OS je bilo 55.1% i 37.8%, dok je 5-godišnje i 10-godišnje DFS bilo 39.2% i 27%. Bolesnice koje su postigle cCR su imale statistički duže OS u poredjenju sa onima sa cPR i cSD (Log-Rank test, $p=0.038$). Slično je i DFS bolesnica sa cCR bilo duže u odnosu na cPR i cSD, mada razlika nije bila statistički značajna. Analizom bioloških markera pokazano je da pacijenti sa luminal A tumorima imaju bolje preživljavanje u odnosu na ostale podtipove, dok trostruko negativni tumori imaju najbolji odgovor na PRT (40% pCR i pNCR). Analiza genske ekspresije primarnog tumora je pokazala da su tri gena (APOA1, MAP3K4 i MMPM) značajno različito eksprimirana između RT-rezistentnih i RT-responzivnih tumora.

Zaključak: Naši rezultati su pokazali da lokalna kontrola pacijenata sa LOKD tretiranih preoperativnom RT i radikalnom mastektomijom je komparabilna sa rezultatima prikazanim u literaturi. Kompletan patohistološki odgovor (pCR) na PRT izdvaja grupu bolesnica koje naginju ka boljem OS i DFS.

Ključne reči: Lokalno odmakli karcinom dojke, preoperativna radioterapija, biološki markeri

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Onkologija

CORRELATION OF BIOLOGICAL MARKERS WITH RESPONSE TO PREOPERATIVE RADIOTHERAPY IN LOCALLY ADVANCED NONINFLAMMATORY BREAST CANCER

Abstract

Introduction: In the treatment of locally advanced breast cancer (LABC) preoperative radiotherapy (PRT) today is indicated after primary (neoadjuvant) chemotherapy (PCT) if resectability of tumor was not achieved. Before the introduction of PCT in treatment strategy, PRT was more frequently used as the sole neoadjuvant approach for initially inoperable tumors, in order to reduce tumor volume and reach radical surgery. The purpose of this analysis was to evaluate the tumor response and long-term outcome at patients treated with only PRT, without influence of systemic therapy, and to assess the relationship of biological markers with response to PRT.

Method: Between 1997 and 2000, 134 patients with non-inflammatory LABC stage IIIA and IIIB were treated with PRT. The tumor dose was 45 Gy in 15 fractions (3 Gy per fraction) every second day to the breast and to regional lymph nodes over 6 weeks. Radical mastectomy was performed 6 weeks after PRT to all patients and adjuvant systemic therapy was administered as per protocol. The measure of disease outcome were overall survival (OS) and disease-free survival (DFS). Survival and DFS curves were estimated using the Kaplan-Meier method and univariate statistical analysis by Log rank test was used to assess the difference in time to event (OS/DFS) between the analyzed groups. The hormone receptor status of ER and PgR, HER-2 status and Ki-67 were assessed by immunohistochemistry on the biopsy and mastectomy specimens. Gene expression profiles were established using micro-array analysis in a formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples.

Results: Median follow-up was 74 months (range 4-216 months). An objective clinical tumor response after preoperative RT was observed in 77.6% of patients. Clinical complete tumor response (cCR) was achieved in 21.6% of patients. Pathological CR in the breast was achieved in 15% of patients. Among them 10/134 (7.5%) had total pCR (no invasive tumor in breast associated with no involved regional axillary lymph nodes). The 5 and 10-year OS were 55.1% and 37.8% respectively. The 5 and 10-year DFS were 39.2% and 27% respectively. Patients who achieved cCR had significantly longer OS in comparison with patients achieving cPR and cSD. Similarly, DFS of patients in cCR group was longer compared to patients with cPR and cSD, although it did not reach statistical significance. Analysis of biological markers has shown that patients with luminal A tumors had better OS than other subtypes, but triple-negative breast cancers (TNBC) had the best response to PRT (40% of pCR and pNCR). Gene expression analysis of primary tumor has shown that three genes (APOA1, MAP3K4 and MMPM) were significantly differentially expressed between RT-resistant and RT-responsive tumors.

Conclusion: Our results showed that local control in LABC patients achieved by primary PRT, followed by radical mastectomy was comparable with the results reported in literature. Complete pathologic response to PRT identified a subgroup of patients with a trend toward better DFS and OS.

Key words: locally advanced breast cancer, preoperative radiotherapy, biological markers

Scientific field: Medicine

Special scientific field: Oncology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiološki podaci lokalno odmaklog karcinoma dojke	1
1.2. Klinička prezentacija i dijagnostika lokalno odmaklog karcinoma dojke	1
1.3. Patohistologija i biologija lokalno odmaklog karcinoma dojke	4
1.4. Lečenje lokalno odmaklog karcinoma dojke	6
1.4.1. Sistemska terapija lokalno odmaklog karcinoma dojke	6
1.4.1.1. Neoadjuvantna hemioterapija	7
1.4.1.2. Neoadjuvantna biološka terapija	7
1.4.1.3. Neoadjuvantna hormonska terapija	8
1.4.2. Hirurgija lokalno odmaklog karcinoma dojke	8
1.4.3. Radioterapija lokalno odmaklog karcinoma dojka	10
1.4.3.1. Istorijat radioterapije lokalno odmaklog karcinoma dojke i preoperativna radioterapija	10
1.4.3.2. Savremena radioterapija lokalno odmaklog karcinoma dojke	11
1.4.3.3. Kombinovana neoadjuvantna hemio-radioterapija	12
1.4.3.4. Tehnike zračenja dojke	13
1.4.3.5. Neželjeni efekti zračne terapije	20
1.5. Prognostički i prediktivni faktori lokalno odmaklog karcinoma dojke	22
1.6. Biologija tumora i odgovor na neoadjuvantnu terapiju	24
1.7. Genska analiza	26
2. CILJEVI RADA	28
3. MATERIJAL I METODE	29
3.1. Pacijenti i način lečenja	29
3.2. Kriterijumi evaluacije odgovora na preoperativnu radioterapiju	30
3.2.1. Klinička procena	30

3.2.2. Patohistološka procena posle neoadjuvantne terapije	30
3.3. Metodologija određivanja bioloških markera	31
3.3.1. Određivanje ER i PgR	31
3.3.2. Određivanje HER-2 status	32
3.3.3. Određivanje Ki-67	32
3.4. Metode merenja genske ekspresije u uzorcima inicijalnog tumora karcinoma dojke	32
3.4.1. Analiza microarray podataka	33
3.4.2. Analiza izmenjenih signalnih puteva	33
3.4.3. Validacija mRNK ekspresionih profila kvantitativnim Real – Time PCR-om (Q-RT-PCR)	33
3.5. Definicija ishoda bolesti	34
3.6. Statistička analiza	34
4. REZULTATI	36
4.1. Karakteristike pacijenata i tumora	36
4.2. Odgovor tumora na preoperativnu RT	37
4.3. Primenjena adjuvantna terapija	38
4.4. Analiza ishoda bolesti u celoj grupi	39
4.5. Analiza ishoda bolesti prema kliničkom odgovoru tumora u dojci na preoperativnu RT	42
4.6. Analiza ishoda bolesti prema patohistološkoj proceni odgovora tumora na preoperativnu RT	44
4.7. Analiza ishoda bolesti prema prognostičkim faktorima	54
4.7.1. Godine starosti	54
4.7.2. Menopauzni status	57
4.7.3. Broj pozitivnih limfnih čvorova u aksili nakon preoperativne RT i mastektomije	59
4.7.4. Veličina rezidualnog tumora u dojci nakon preoperativne RT	63
4.8. Analiza ishoda bolesti prema biološkoj klasifikaciji tumora	69
4.9. Ishod bolesti prema biološkim markerima u inicijalnom tumoru	74
4.9.1. Analiza ER u inicijalnom tumoru	74
4.9.2. Analiza PgR u inicijalnom tumoru	76

4.9.3. Analiza HER-2 statusa u inicijalnom tumoru	79
4.9.4. Analiza Ki-67 u inicijalnom tumoru	84
4.10. Analiza promene bioloških markera posle sprovedene preoperativne RT i uticaj na ishod bolesti	87
4.10.1. Analiza ER pre i posle PRT	87
4.10.2. Analiza PgR pre i posle PRT	92
4.10.3. Analiza HER-2 statusa pre i posle PRT	97
4.10.4. Analiza Ki-67 pre i posle PRT	101
4.11. Rezultati genske analize	105
4.11.1. Klaster analiza pre RT i post RT uzoraka tumora	106
4.11.2. Različito eksprimirani geni izmedju radio-senzitivnih i radio- rezistentnih tumora	106
4.11.3. Funkcionalna analiza radio-senzitivnog genskog zapisa	107
4.11.4. Validacija gena kandidata kvantitativnim Real-Time PCR-om (qRT PCR)	108
4.11.5. Eksterna validacija prediktivne vrednosti kandidat gena za odgovor na radioterapiju	109
5. DISKUSIJA	111
6. ZAKLJUČCI	127
7. LITERATURA	129

1. UVOD

1.1. EPIDEMIOLOŠKI PODACI LOKALNO ODMAKLOG KARCINOMA DOJKE

Karcinom dojke je najčešće maligno oboljenje kod žena i ujedno najčešći uzrok smrti žena obolelih od maligne bolesti. Godisnje se u svetu registuje oko 1,4 miliona novoobolelih slučajeva, i preko 450 000 smrtnih ishoda od ove bolesti, što čini 24% svih malignih bolesti ženske populacije odnosno 14% svih smrtnih ishoda zbog maligniteta.(1)

U Srbiji se svake godine otkrije oko 4 000 novih slučajeva karcinoma dojke, a umire oko 1600 bolesnica godišnje.(2)

Lokalno odmakli karcinom dojke (LOKD) predstavlja heterogenu grupu tumora različite kliničke manifestacije i biološkog ponašanja. Danas predstavlja veliki klinički izazov, zato što će određeni broj pacijenata sa LOKD doživeti relaps bolesti i eventualno umreti, uprkos agresivnom, multimodalitetnom lečenju.

Široka rasprostranjenost skrininga dovela je do porasta incidence karcinoma dojke, ali sa druge strane, smanjila je broj novodijagnostikovanih lokalno uznapredovalih tumora. Generalno, LOKD se javlja u oko 20 % slučajeva svih karcinoma dojke, sa tendencijom pada u zemljama sa organizovanim skriningom, dok se u nerazvijenim zemljama može javiti u znatno većem procentu (do 60%). (3-5)

Prema podacima iz hospitalnog registra Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, u toku 2012. godine, LOKD je registrovan u 25% slučajeva svih novoregistrovanih pacijenata sa karcinomom dojke.

1.2. KLINIČKA PREZENTACIJA I DIJAGNOSTIKA LOKALNO ODMAKLOG KARCINOMA DOJKE

LOKD se obično definiše kao veliki operabilni tumor, veći od 5 cm (T3) ili tumor koji zahvata kožu ili zid grudnog koša (T4) i/ili tumor bilo koje veličine sa ekstenzivnom limfadenopatijom-fiksiranim limfnim čvorovima u pazušnoj jami (N2), uvećanim limfnim

čvorovima u infraklavikularnoj, supraklavikularnoj jami i duž unutrašnje mamarne arterije (a.mamaria interna) (N2, N3). (6-9) Posebnu formu LOKD čini inflamatorni karcinom dojke, koji predstavlja vrlo agresivnu bolest i manifestuje se crvenilom i edemom kože dojke, sa patohistološki potvrđenim tumorskim embolusima u dermalnim limfaticima.

Prema TNM klasifikaciji Medjunarodne unije za borbu protiv raka (7-mo izdanje), odnosno stadijumu bolesti, u LOKD spadaju pacijenti u IIIA stadijumu (T0-2, N2 i T3, N1-2), IIIB stadijumu (T4, N0-2) i IIIC stadijumu (bilo koji T, N3). (10) Pored toga u lokalno odmakle tumore se svrstavaju i pacijenti koji spadaju u deo IIB stadijuma (T3, N0). Tabela 1.

Tabela 1. TNM Klasifikacija lokalno odmaklog karcinoma dojke

STADIJUM	T	N	M
Stadijum IIB	T3	N0	M0
Stadijum IIIA	T3	N1	M0
	T0-3	N2	M0
Stadijum IIIB	T4	N0-2	M0
Stadijum IIIC	bilo koji T	N3	M0

Medjutim, većina eksperata smatra pacijente u stadijumu IIB i IIIA (T3,N0 i T3N1) kao velike operabilne tumore, za razliku od pravih inoperabilnih slučajeva sa inflamatornim karcinomom i/ili zahvatanjem kože (T4) i fiksiranom ili masivnom aksilarnom i/ili supraklavikularnom limfadenopatijom (N2,N3).

Sa aspekta biološkog potencijala i kliničkog ponašanja, LOKD predstavlja heterogenu grupu tumora počev od indolentnih, sporo rastućih tumora, niskog gradusa, sa pozitivnim steroidnim receptorima, pa do tumora sa brzom evolucijom i progresijom i negativnim nalazom steroidnih receptora.

Prema podacima Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER), 5-godišnja stopa preživljavanja pacijenata stadijuma IIIA i IIIB je 52% i 48%, dok medijana preživljavanja stadijuma III iznosi 4,9 godina. (11)

Dijagnostičke metode su važne u određivanju proširenosti primarnog tumora, zahvatanja regionalnih limfnih čvorova i postojanja eventualnih udaljenih metastaza.

Mamografija je obično prva i osnovna dijagnostička metoda koja se primenjuje posle kliničkog pregleda. Koristi se da bi se procenila veličina tumora, postojanje multicentričnih ili multifokalnih tumora, i identifikovale mikrokalifikacije u dojci, kao i eventualno postojanje tumora u drugoj dojci (7,9,12). Takođe, mamografija se može primeniti i u evaluaciji odgovora tumora na neoadjuvantnu hemioterapiju (HT).

Ultrazvučni pregled (UZ) dojki se koristi kao dopunska metoda mamografiji, a naročito ima važnu ulogu u evaluaciji regionalnih limfnih čvorova, posebno aksilarne i supra i infraklavikularne regije (13). Pored toga, UZ se može koristiti i prilikom biopsije uvećanih limfnih čvorova aksile (14).

Magnetna rezonanca (MR) dojki ima najveću senzitivnost za detekciju invazivnog karcinoma. Posebno je korisna u prikazivanju multicentričnosti i multifokalnosti tumora, u otkrivanju infiltracije zida grudnog koša, kao i otkrivanju tumora u kontralateralnoj dojci (15). MR se koristi i u evaluaciji odgovora na neoadjuvantnu hemioterapiju, odnosno vrlo je precizna metoda za procenu ekstenzije rezidualnog tumora nakon neoadjuvantne HT i vrste operativnog zahvata (poštedna operacija ili mastektomija) (16,17). Takođe, MR pregled može da bude koristan i u stažiranju regionalnih limfnih čvorova (limfatika uz a. mamariju int., infraklavikularne regije i dela aksilarne regije).

Imajući u vidu da LOKD ima veliku verovatnoću postojanja udaljenih metastaza, potrebne su i dodatne dijagnostičke procedure kao što su scintigrafija ili radiografija skeleta, CT pregled grudnog koša i gornjeg abdomena, a u pojedinim slučajevima se može primeniti i PET-CT (pozitron emisiona tomografija), naročito u identifikaciji udaljenih metastaza koje se ne mogu videti konvencionalnim metodama (9).

1.3. PATOHISTOLOGIJA I BIOLOGIJA LOKALNO ODMAKLOG KARCINOMA DOJKE

Danas je, prema WHO klasifikaciji, poznat veliki broj posebnih histopatoloških formi karcinoma dojke. Neke od njih pokazuju povoljniju prognozu, kao što su tubularni ili medularni karcinomi, ili nepovoljnu prognozu (metaplastični ili nediferentovani karcinomi) (18).

Histologija LOKD je relativno slična kao i kod ranog karcinoma. Najčešće su zastupljeni duktalni i lobularni invazivni karcinomi. Redje se mogu naći tubularni, mucinozni i medularni karcinomi koji se javljaju kod sporo-rastućih tumora, gde se tumor sporo razvija i prisutan je jedan duži period do postavljanja dijagnoze (19).

LOKD biološki predstavlja bolest sa različitim spektrom osobina. Uznapredovali tumor, koji se javlja naglo i brzo progredira, je obično ER-negativan, visokog gradusa i visokog proliferativnog indeksa. Suprotno tome, lokalno ekstenzivna bolest koja traje godinama i koja se sporo razvija, najčešće je ER-pozitivna, niskog gradusa i proliferativnog indeksa.

Analiza genske ekspresije dovela je do otkrića posebnih molekularnih podtipova karcinoma dojke koji su odgovorni za različit ishod bolesti LOKD (DFS i OS) kao i različit odgovor na terapiju (19,20).

Molekularni podtipovi uključuju:

1. dva luminalna podtipa (luminal A i B) koji obuhvataju većinu ER-pozitivnih karcinoma dojke i karakterišu se visokom ekspresijom hormon receptor (HR)-gena.
2. "basal-like" podtip koji se karakteriše visokom ekspresijom posebne „basal“ signature koja uključuje gene uobičajene za mioepitelne ćelije dojke, visoku ekspresiju proliferativnih gena i nisku ekspresiju ER i HER-2 signature.
3. HER-2 obogaćen podtip koji se karakteriše visokom ekspresijom HER-2 gena, a niskom ekspresijom HR gena.
4. "normal breast-like" podtip koji ima gensku ekspresiju sličnu normalnom tkivu dojke.

Kako nije uvek izvodljivo dobiti analizu genske ekspresije, prihvaćena je surogat definicija genskih podtipova karcinoma dojke koja koristi imunohistohemijsko (IHH) određivanje estrogen i progesteron receptora (ER i PgR), ekspresiju i/ili amplifikaciju HER-2 i Ki-67 kao markera proliferacije (21,22). Tabela 2.

Tabela 2. Surogat definicije bioloških podtipova karcinoma dojke

Prirodni podtip	kliničko-patohistološka definicija
Luminal A	Luminal A ER i/ili PgR pozitivan HER-2 negativan Ki-67 nizak (<14%)
Luminal B	Luminal B (HER/2 negativan) ER i/ili PgR pozitivan HER-2 negativan Ki-67 visok Luminal B (HER-2 pozitivan) Er i/ili PgR pozitivan HER-2 pojačana ekspresija ili amplifikacija Bilo koji Ki-67
Erb-B2 pojačana ekspresija	HER-2 pozitivan (non luminal) HER-2 pojačana ekspresija ili amplifikacija Er i PgR odsutni
„Basal-like“	Trostruko negativni (duktalni) ER i PgR odsutni HER-2 negativni

Pokazano je da pacijenti sa trostruko negativnim i HER-2 pozitivnim karcinomom dojke imaju lošiju prognozu, kraće vreme do progresije bolesti i ukupno preživljavanje. Luminalni podtipovi su najheterogeniji što se tiče biologije i prognoze. Pacijenti koji pripadaju luminal A podtipu, imaju značajno bolju prognozu u odnosu na sve druge podtipove, dok luminal B podtip ima lošiju prognozu u odnosu na luminal A (19).

1.4. LEČENJE LOKALNO ODMAKLOG KARCINOMA DOJKE

Već unazad 20 godina postignut je konsenzus o multidisciplinarnom lečenju LOKD, tako da savremena terapija podrazumeva prvo primenu sistemske neoadjuvantne terapije (hemioterapije sa ili bez biološke terapije ili hormonske terapije), nakon čega sledi lokoregionalna terapija – hirurgija i/ili radioterapija. (3,4,6-8,11,23,24)

Prvi korak u lečenju je biopsija tumora i patohistološka verifikacija, prilikom koje se pored patohistološkog tipa i gradusa tumora, određuju i biomarkeri: ER i PR, HER 2 i indeks proliferacije Ki67, koji daju bitne informacije pri izboru vrste sistemske neoadjuvantne terapije.

U poredjenju sa pacijentima sa ranim karcinomom dojke, pacijenti sa lokalno odmaklim tumorom imaju znatno lošiju prognozu, što podrazumeva veću verovatnoću pojave lokalnog recidiva i udaljenih metastaza, kao i kraće ukupno preživljavanje.

Literaturni podaci ukazuju da pacijenti sa nelečenim karcinomom dojke imaju prosečno preživljavanje 2,7 godina, a da je medijana 5-godišnjeg preživljavanja 18%. (7)

Do 70-tih godina prošlog veka, pacijentkinje sa lokalno odmaklim karcinomima dojke su bili lečeni samo lokalnom terapijom: hirurgijom ili radioterapijom, ili njihovom kombinacijom uz nezadovoljavajuću lokalnu kontrolu i vrlo loše ukupno preživljavanje (23,24). Prema tadašnjim podacima lokalna kontrola kod radikalne zračne terapije, kao jedinog modaliteta lečenja, se kretala u rasponu od 28-75% (u zavisnosti od date tumorske doze), dok je 5-godišnje preživljavanje bilo 10-30 %. (24) Rezultai sprovođenja preoperativne zračne terapije u kombinaciji sa hirurgijom su pokazali nešto bolju lokalnu kontrolu, ali ne i preživljavanje. Međutim, uvođenjem sistemske hemioterapije u lečenju karcinoma dojke, tretman ovih pacijenata se značajno promenio. Stoga je u današnje vreme primarna (neoadjuvantna) hemioterapija praćena lokoregionalnom terapijom, u vidu hirurgije i/ili radioterapije, postala standard u lečenju lokalno odmaklog karcinoma dojke. (25,26)

1.4.1. SISTEMSKA TERAPIJA LOKALNO ODMAKLOG KARCINOMA DOJKE

Neoadjuvantna (preoperativna, primarna sistemska, indukciona) terapija u lečenju LOKD primenjuje se sa ciljem da smanji veličinu primarnog tumora i da inoperabilne slučajeve prevede u operabilne, kao i da dovede do eradikacije subkliničkih udaljenih mikrometastaza.

U poslednje vreme se neoadjuvantna terapija sve više primenjuje i kod primarno operabilnih

tumora, a da bi se omogućio pošten hirurški zahvat, kao i in vivo procena odgovora na primenjenu terapiju. (11,27-29)

Tip sistemske terapije je sličan onome koji se koristi u adjuvantnom pristupu, što uključuje primenu antraciklina i taksana, kao osnovne inicijalne hemioterapije. U slučaju HER2 pozitivne bolesti dodaje se trastuzumab, konkomitantno sa taksanima. Kod pacijenata sa pozitivnim steroidnim receptorima, može se u neoadjuvantnom pristupu primeniti i hormonska terapija, a ukoliko postoje kontraindikacije za primenu hemioterapije.

1.4.1.1. NEOADJUVANTNA HEMIOTERAPIJA

Prvi izveštaj o primeni neoadjuvantne hemioterapije (HT) u lečenju LOKD je publikovan krajem 70-tih godina prošlog veka (23), a nakon objavljivanja rezultata dve velike studije o neoadjuvantnoj hemioterapiji NSABP B18 i B27 (30), postaje standard u inicijalnoj terapiji LOKD.

Neoadjuvantna sistemska hemioterapija se primenjuje u lečenju lokalno odmaklog operabilnog, primarno inoperabilnog i inflamatornog karcinoma dojke.

U ranijim studijama neoadjuvantne HT za LOKD se pokazalo da je primena antraciklinskih režima poboljšala 10-godišnju stopu preživljavanja do 25% u odnosu na primenu samo lokalne terapije (29). Dodavanje taksana antraciklinima je dovelo do još većeg postizanja patohistološkog kompletnog odgovora (pCR) i samim tim većeg procenta mogućnosti poštodne operacije i poboljšanja preživljavanja (30).

Prema sadašnjim preporukama antraciklini i taksani su savremeni standard neoadjuvantne HT za LOKD (3,11,27,29).

Lečenje se započinje antraciklinima (doksorubicin ili epirubicin) u kombinaciji sa ciklofosfamidom i 5-fluorouracilom, a potom se u sekvencijalnom pristupu dodaju taksani (paclitaxel ili docetaxel) (4,27).

Optimalno trajanje neoadjuvantne HT je još uvek nije precizno definisano, ali se obično preporučuje 6-8 ciklusa HT (4,11,28).

1.4.1.2. NEOADJUVANTNA BIOLOŠKA TERAPIJA

Povećana ekspresija ili amplifikacija HER2 nadjena je kod oko 35% pacijenata sa LOKD, i udružena je sa agresivnim tokom bolesti i lošom prognozom.

Trastuzumab je monoklonsko antitelo koje se vezuje za HER2 receptor i na taj način ga blokira. Dodavanje trastuzumaba neoadjuvantnoj HT, dovelo je do većeg odgovora na primenjenu terapiju (pCR) i značajno je poboljšalo preživljavanje u odnosu na pacijente

lečene samo hemioterapijom (31-34). U literaturi se pominje da se pCR postiže u čak 65% slučajeva primenom trastuzumaba (11).

Lapatinib je inhibitor tirozin kinaze i može se primeniti zajedno sa trastuzumabom kao dvojna HER2 blokada, sa postignutim pCR od 51% (35).

Drugi pristup u dvojnjoj HER2 blokadi je kombinacija trastuzumaba i pertuzumaba (monoklonsko antitelo koje blokira HER1 i HER2), koji dat u kombinaciji sa HT dovodi do pCR u 42% slučajeva (rangirano od 26% kod ER- pozitivnih tumora do 63% kod ER- negativnih tumora) (36).

1.4.1.3. NEOADJUVANTNA HORMONSKA TERAPIJA

Neoadjuvantna hormonska terapija se može primenjivati kod steroid receptor pozitivnih postmenopauzних pacijenata sa LOKD. Obično je alternativa hemioterapiji, kod pacijenata starije životne dobi ili sa prisutnim komorbiditetima, koji isključuju primenu neoadjuvantne HT(4,11). S obzirom da se odgovor na neoadj. hormonsku terapiju postiže sporije, osnovni cilj je postizanje povoljnog kliničkog odgovora (a ne patohistološkog) (37). Preporučuje se primena tokom najmanje 3-4 meseca, a optimalno je da se produži do 6-8 meseci u slučaju postizanja inicijalnog povoljnog odgovora (38). Prema današnjim preporukama, u neoadjuvantnom pristupu primenjuju se inhibitori aromataze (22) ali se može primeniti i tamoksifen. Pokazano je da je primena tamoksifena dovela do kliničkog odgovora na terapiju u 50% pacijenata sa LOKD (37). Lekovi iz grupe inhibitora aromataze su pokazali bolju efikasnost od tamoksifena, kao i veću stopu pošteđnih operativnih zahvata (39,40).

1.4.2. HIRURGIJA LOKALNO ODMAKLOG KARCINOMA DOJKE

Istorijski gledano, radikalna mastektomija je u prošlosti bila osnovni i jedini vid lečenja LOKD. Haagensen i Stout su još 40-tih godina prošlog veka objavili rezultate radikalne mastektomije u lečenju LOKD i opisali 5-godišnju stopu pojave lokalnog recidiva (LR) u 46% pacijenata, dok je 5-godišnje preživljavanje bilo samo 6% (41). Time je pokazano da mastektomija nema efekta u lečenju inoperabilnog karcinoma dojke, kao što su slučajevi sa ulceracijama na koži, eritemom i edemom kože, satelitskim nodusima i fiksiranim tumorima za zid grudnog koša. Izveštaji objavljeni kasnijih godina su takodje pokazali da je

mastektomija kao jedini vid terapije LOKD imala visoku 5-godišnju stopu lokalnog recidiva (20-50%), dok je 5-godišnje preživljavanje bilo od 30-40% (42).

Kombinacija hirurgije i radioterapije povećala je lokalnu kontrolu i preživljavanje, ali je dugoročni ishod bolesti i dalje bio nezadovoljavajući (27).

Danas se u okviru kombinovanog pristupa u tretmanu LOKD hirurgija najčešće sprovodi nakon neoadjuvantne HT, a pre radioterapije.

Indikacije za hirurško lečenje LOKD posle neoadjuvantne terapije su slične kao i za primarni pristup u novodijagnostikovanih tumora. Izbor hirurške procedure treba da se bazira na proširenosti bolesti pre otpočinjanja neoadjuvantne sistemske terapije i na stanje nakon terapije, odnosno odgovora na primenjenu terapiju (11,28,42).

Hirurgija LOKD tradicionalno podrazumeva radikalnu mastektomiju, ali kako se primenom neoadjuvantne sistemske terapije u odredjenom broju pacijenata postiže značajno smanjenje primarnog tumora, poštedna operacija takodje može biti opcija lečenja kod takvih pacijenata.

Velika prednost preoperativne sistemske terapije je što je omogućeno da se sve više pacijenata sa velikim tumorima mogu da tretiraju poštednom operacijom (43,44). Većina neoadjuvantnih hemioterapijskih i endokrinih studija, kao što su NSABP B18 i B27, EORTC10902 i Fem-024 su pokazale povećanje procenta pacijenata koji mogu biti tretirani poštednom operacijom (45-47). Podaci pokazuju da oko 10-30% pacijenata koji su inicijalno bili kandidati za mastektomiju, nakon neoadjuvantne terapije mogu biti tretirani poštednom operacijom (28).

Savremene tehnike onkoplastične hirurgije omogućavaju široke ekscizije tumora sa jednako bezbednim ishodom i zadovoljavajućim kozmetskim rezultatima (48,49). U slučaju da se radi mastektomija, količina kože koja treba da se odstrani zavisi od udaljenosti zaostalog tumora, tako da skin-sparing mastektomija može bezbedno da se primeni u slučajevima dobrog odgovora na neoadjuvantnu terapiju odnosno kada nema znakova zahvatanja kože ili bradavice i areole (50). Tretman aksile standardno podrazumeva disekciju aksile, ali se sve više razvija ka biopsiji stražarskog limfnog čvora (SLNB) kod pacijenata sa klinički negativnim aksilarnim limfnim čvorovima (51).

1.4.3. RADIOTERAPIJA LOKALNO ODMAKLOG KARCINOMA DOJKE

Radioterapija (RT) kao jedan od tri glavna modaliteta lečenja karcinoma dojke, danas se standardno sprovodi kod skoro svih pacijenata nakon poštodne operacije dojke, kao i kod pacijenata sa povećanim rizikom za relaps bolesti nakon učinjene radikalne mastektomije (tumori veći od 5 cm, više od 4 pozitivna limfna čvora u aksili) (22,38). Takođe, radioterapija ima svoje mesto i u lečenju lokalno odmakle bolesti u kombinaciji sa hemioterapijom i hirurgijom. U slučaju izostanka odgovora na indukcionu HT, može se primeniti nakon HT a pre hirurgije, u vidu preoperativne RT, ili kod definitivno inoperabilnog tumora, nakon indukcione HT, kao jedini vid lokoregionalnog lečenja-radikalna RT. Medjutim, danas se u najvećem broju slučajeva LOKD primenjuje RT posle neoadjuvantne HT i operacije, kao adjuvantna odnosno postoperativna RT (52).

Poznato je da je cilj radioterapije postizanje bolje lokalne kontrole bolesti, bilo da se primenjuje kao postoperativna RT kod ranog i operabilnog karcinoma dojke, bilo kao preoperativna RT, kod lokalno odmakle bolesti. Ali isto tako je pokazano da postoperativna RT pored toga što smanjuje verovatnoću pojave lokalnog recidiva, ima uticaja i na poboljšanje ukupnog preživljavanja (53-55).

1.4.3.1. ISTORIJAT RADIOTERAPIJE LOKALNO ODMAKLOG KARCINOMA DOJKE I PREOPERATIVNA RADIOTERAPIJA

Radioterapija u lečenju karcinoma dojke počela je da se primenjuje praktično početkom prošlog veka. Krajem dvadesetih godina u literaturi su prvi put opisana tangencijalna polja u tretmanu karcinoma dojke. Tretirane su inoperabilne lezije u dojci, sa efektom regresije, što je tada pobudilo veliko interesovanje naučne javnosti (56). Francuski radiolog Baclesse je prvi istraživao upotrebu transkutane RT kao jedinog vida lečenja karcinoma dojke. Doza zračenja koja je data na velike tumorske mase u dojci iznosila je 7000-9000 R i bila je primenjena u periodu od 16 nedelja (56). Kasniji podaci su pokazali da je RT kao jedini modalitet lečenja pacijenata sa LOKD, dozom od 60 Gy dovela do stope lokalnog relapsa od 25-70%, i 5-godišnjeg preživljavanja od 10-40% (42). Veće doze zračenja (preko 70 Gy) su povećale lokalnu kontrolu bolesti, ali takođe i lokalnu toksičnost (57-59). U literaturi su bili opisivani podaci da je sa dozom od 90-100 Gy 5-godišnja lokalna kontrola iznosila 70-100% (60). Medjutim, sa veoma visokim dozama i lokalna toksičnost je bila povećana, a javljala se u vidu nekroze kože sa ulceracijama, nekroze rebara, fibroze grudnog koša, limfedema ruke i

oštećenja brahijalnog pleksusa. Zbog toga je RT počela da se kombinuje sa hirurgijom, kao preoperativna ili postoperativna RT.

Baclesse je 30-tih godina objavio prve rezultate preoperativne zračne terapije, kojom je tretirao 21 pacijentkinju. Zračenje je sprovedjeno u periodu od 8-13 nedelja sa dozom od 5000 R. Nakon učinjene radikalne hirurgije u 1/3 pacijenata nije detektovano tumorsko tkivo (56).

Preoperativna RT se primenjivala u svim velikim radioterapijskim centrima u Evropi i Americi, a opisivane tumorske doze su se kretale od 4000 R do 5000 R (56,61,62).

Sa daljim razvojem radioterapijskih tehnika i uvođenja kobalt aparata za zračenje, 50-tih i 60-tih godina, zabeležena je i bolja lokalna kontrola u smislu manjeg procenta pozitivnih limfnih čvorova u aksili nakon mastektomije, kao i manja učestalost pojave lokalnog recidiva (56). Preoperativna RT je praktično bila u širokoj upotrebi kao inicijalna terapija LOKD sve do pojave sistemske hemioterapije 70-tih godina, kada je postepeno zamenjena neoadjuvantnom hemioterapijom.

1.4.3.2. SAVREMENA RADIOTERAPIJA LOKALNO ODMAKLOG KARCINOMA DOJKE

Radioterapija LOKD se danas, u najvećem broju slučajeva odnosi na primenu postoperativne RT posle neoadjuvantne hemioterapije i hirurgije. Preporuke za sprovedjenje postoperativne RT nakon inicijalne mastektomije LOKD su još od ranije poznate, a baziraju se na patohistološkoj proširenosti bolesti u momentu učinjene operacije. Tako su opšte poznate indikacije za sprovedjenje postoperativne RT tumori veći od 5 cm i sa infiltracijom kože (T3 i T4) i više od 4 pozitivna limfna čvora u aksili (63-66). Međutim, kako neoadjuvantna HT može da dovede do značajnog smanjenja tumora u dojci i limfnih čvorova u aksili, indikacije za postoperativnu RT posle neoadjuvantne HT ostaju dosta kontroverzne (67,68). To se posebno odnosi na pacijente kod kojih je nakon neoadjuvantne HT postignuta patohistološka kompletna regresija (pCR). Smatra se da pacijenti u III kliničkom stadijumu, bez obzira na postignut pCR na neoadjuvantnu HT i dalje imaju visok rizik za pojavu lokalnog relapsa bolesti i imaju indikacije za postoperativnu RT (69-72).

Zbog toga je vrlo važno pažljivo razmotriti inicijalni klinički stadijum bolesti (pre indukcione HT), kao i odgovor na HT i patohistološki nalaz nakon mastektomije (73,74). Takodje se prilikom donošenja odluke o sprovedjenju postoperativne RT u obzir uzimaju i individualni faktori samog pacijenta (godine starosti) i tumora (biološke karakteristike) (71,74,75).

U slučaju inoperabilnosti tumora posle inicijalne HT, može se primeniti lokoregionalna RT sa ciljem da se bolest prevede u operabilno stanje (preoperativna RT) ili RT ostaje jedini vid lokoregionalnog lečenja (radikalna RT) (22,52).

1.4.3.3. KOMBINOVANA NEOADJUVANTNA HEMIO-RADIOTERAPIJA

Uprkos sve većoj upotrebi neoadjuvantne HT u lečenju LOKD, zabeležena je relativno skromna patohistološka kompletna regresija, pogotovu kod tumora sa pozitivnim steroidnim receptorima i negativnim HER2 statusom. Kako pacijenti sa LOKD imaju visok rizik i za lokalni relaps i za udaljene metastaze, pokušalo se i sa istovremenom primenom sistemske i lokalne terapije, odnosno kombinovane hemio-radioterapije (76,77).

Kombinovana hemio-radioterapija (HT-RT) se danas rutinski primenjuje u lečenju lokalno odmaklih tumora pojedinih organa, kao što su tumori glave i vrata, pluća, jednjaka i rektuma. Neočekivano, u lečenju LOKD postoji relativno mali broj prospektivnih studija o kombinovanom HT-RT tretmanu. Prvi izveštaji o kombinovanoj HT-RT neoadjuvantnoj terapiji LOKD su publikovani pre više od 15 godina i ova vrsta terapije nije postala popularna zbog nedostatka čvrstih dokaza koji bi podržali njenu rutinsku upotrebu (76,77). Kombinovana HT-RT se može primeniti konkomitantno (istovremeno) ili sekvencijalno (jedna za drugom).

Uglavnom su bili ispitivani 5-fluorouracil (kontinuirana infuzija), kapecitabin i taksani u kombinaciji sa istovremenom zračnom terapijom (78-80). Bez obzira što su 5-fluorouracil i kapecitabin pokazali izvesnu korist u postizanju pCR i lokalnoj kontroli, bez dodatne veće toksičnosti, ovi citostatici se generalno ne smatraju najpogodnijim u lečenju karcinoma dojke u kombinovanom pristupu. Primena antraciklina istovremeno sa RT prouzrokovala je ozbiljnu kožnu toksičnost, kao i kardiotoksičnost, tako da su se antraciklini uglavnom primenjivali u sekvencijalnom pristupu (81,82). Stoga je najviše ispitivana upotreba taksana istovremeno sa primenom RT. Toksičnost je značajno redukovana primenom paklitaksela dva puta nedeljno u manjoj dozi uz znatno veću stopu pCR, pogotovu kod trostruko negativnih i HER2 pozitivnih, steroid receptor negativnih podgrupa pacijenata (83).

Stopa postizanja pCR u kombinovanoj HT-RT terapiji je bila različita, i kretala se od 16-45%, i u proseku je bila veća kod konkomitantne primene HT-RT u odnosu na sekvencijalnu (52).

Konkomitantnom primenom HT-RT znatno je smanjeno ukupno trajanje lečenja, bez većeg kompromitovanja kvaliteta života. Medjutim, optimalno hemioterapijsko sredstvo i doza njegove primene u kombinaciji sa RT još uvek nije utvrđena.

1.4.3.4. TEHNIKE ZRAČENJA DOJKE

Tehnološke inovacije su u proteklih tridesetak godina dovele do velikih promena u procesu planiranja i sprovođenju radioterapije. Napredak kompjuterske tehnologije i primena savremenih imidžing metoda (CT, MR) i kompjuterskih sistema za planiranje zračenja omogućili su uvođenje koncepta virtuelne simulacije, 3D planiranja i konformalne radioterapije, što danas predstavlja standard u radioterapiji.

2D planiranje RT

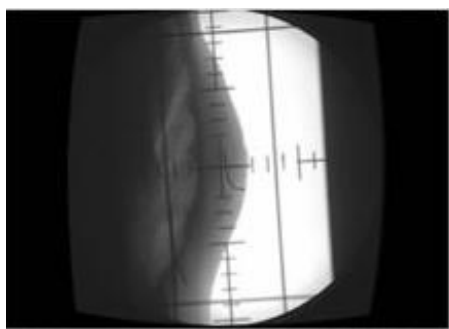
U prošlosti se RT planirala na Ro-simulatoru, gde su se određivali veličina, oblik i aranžman zračnih polja direktno na samom pacijentu. Planirani zračni volumen je uključivao celu dojku i pripadajuće regionalne limfatike, a zračna polja su bila definisana na osnovu inspekcije, palpacije i anatomskih struktura vidjenih na Ro-simulatoru.

Za zračenje dojke korišćena su flankirana (tangencijalna) polja da bi se smanjio volumen pluća koji je uključen u zračno polje. Granice polja su se određivale na osnovu vidljivog tkiva dojke, te je gornja granica polja obično bila u nivou sterno-klavikularnog zgloba, a donja granica 1-2 cm ispod tkiva dojke. Lateralna granica je bila u nivou srednje aksilarne linije, a medijalna u nivou srednje linije tela.

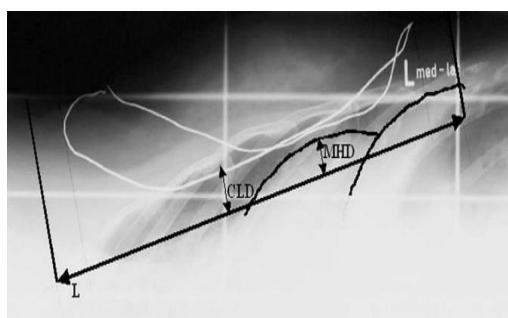
Proračun doze je vršen na jednoj transferzalnoj konturi koja je prolazila kroz centar dojke (Slika 1a). Za određivanje volumena organa od rizika (pluća i srca) koji su jednim svojim delom bili uključeni u zračni volumen korišćeni su parametri: CLD i MHD.

CLD (central lung distance) predstavlja rastojanje od dorzo-medijane ivice polja do ivice unutrašnjeg torakalnog zida na centralnom planu zračnog polja. Pokazano je da CLD korelira sa volumenom plućnog tkiva koje se nalazi u zračnom polju.

MHD (maximal hart distance) predstavlja maksimalnu udaljenost konture srca od dorzalne ivice polja vidjena iz medijalnog tangencijalnog polja (Slika 1b).



Slika 1a. 2D planiranje RT na Ro-simulatoru- prikaz flankiranog polja



Slika 1b. Šematski prikaz CLD i MHD

Veličina polja za regionalne limfne čvorove se također određivala prema anatomskim strukturama. Za supraklavikularne limfne čvorove donja granica polja je bila gornja ivica tangencijalnog polja za dojku, odnosno linija koja prolazi kroz infero-medijalni kraj sternoklavikularnog zgloba i prati gornji rub zadnjeg okrajka IV rebra. Medijalna granica polja je bila do istostranog sternoklavikularnog zgloba, a lateralna do glave humerusa. Za aksilopraklavikularno polje lateralna granica polja se pomera tako da obuhvata volumen aksile koji treba ozračiti. Polje za limfne čvorove uz a. mamariju internu je obuhvatalo prva tri medjurebarna prostora, te je gornja granica polja bila donji rub sternoklavikularnog zgloba, donja do IV medjurebarnog prostora, medijalna – 1 cm ipsilateralno od medijalne linije tela u zdravu strani i lateralna granica se prostirala 4-5 cm od medijalne linije tela u bolesnu stranu.

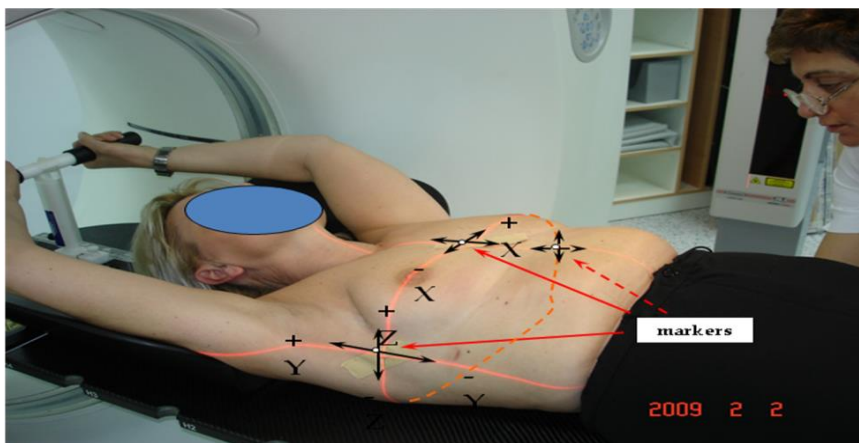
3D planiranje RT

Savremeno planiranje radioterapije sprovodi se na osnovu CT simulacije, gde se dobija prikaz anatomskih struktura u sve tri dimenzije, tako da je omogućeno precizno usmeravanje geometrije zračnih snopova na ciljni volumen uz poštedu organa od rizika (pluća i srca).

Moderna radioterapija karcinoma dojke sprovodi se na megavoltažnim aparatima- linearnim akceleratorima, koji poseduju multilamelarne kolimatore, čime je omogućeno postizanje optimalne preciznosti i homogenog ozračivanja ciljnog volumena uz maksimalnu poštedu okolnih zdravih struktura prvenstveno srca i pluća. Za zračenje dojke najčešće se koriste fotoni energije 4-8 MeV ili elektroni odgovarajuće energije (6-15 MeV) (84-86).

Planiranje radioterapije zahteva precizno pozicioniranje i imobilizaciju pacijenta. Najčešće se pozicioniranje vrši u supinacionom položaju na ravnoj ili ukošenoj podlozi, te se u tu svrhu koriste i različiti sistemi za imobilizaciju pacijenta. Dva najčešća imobilizaciona sistema su „wing-board“ za zračenje na ravnoj podlozi i „breast-board“ za zračenje na ukošenoj podlozi.

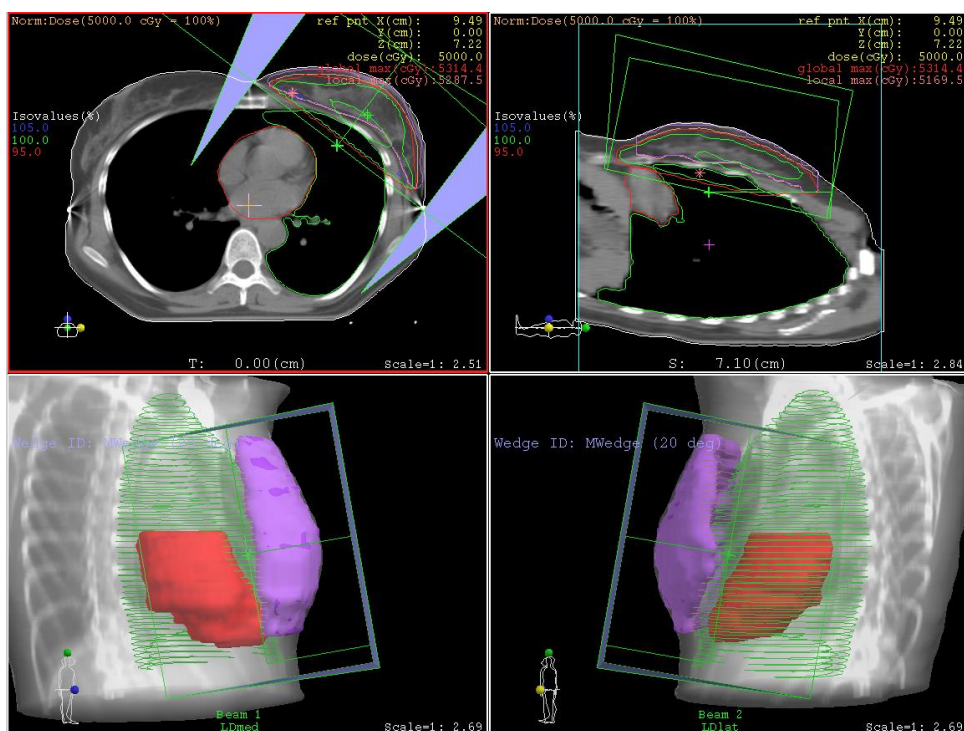
Planiranje RT se vrši na osnovu CT simulacije, gde se dobija serija CT preseka skenirane regije, čijom se 3D rekonstrukcijom dobija virtuelni pacijent. Na virtuelnom pacijentu se definišu parametri zračenja (veličina i oblik zračnih polja, uglovi gentryja i kolimatora), što predstavlja virtuelnu simulaciju, ili se radi konturisanje ciljnih volumena (dojka i regionalni limfatici) i organa od rizika (pluća i srce) – konformalno 3D planiranje. Proračun doze se također vrši u celom zračnom volumenu - trodimenzionalno. Slika 2.



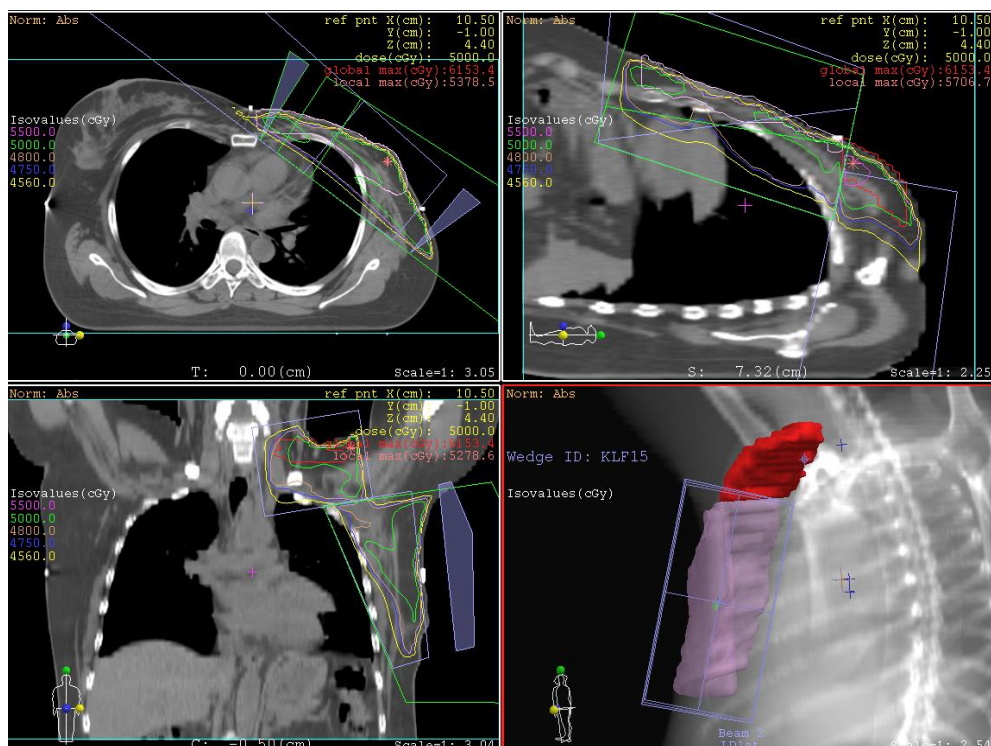
Slika 2. Planiranje RT na CT-simulatoru

Tehnike zračenja dojke i zida grudnog koša

Zračenje same dojke ili zida grudnog koša izvodi se fotonima primenom suprotnih tangencijalnih (flankiranih) polja. Ponekad se zračenje zida grudnog koša može sprovesti elektronima iz jednog direktnog polja. Tumorska doza (TD) koja se daje na dojku ili zid grudnog koša je obično 50 Gy u 25 frakcija (2 Gy po frakciji) fotonima, uz postavljanje bolusa ukoliko se zrači zid grudnog koša nakon mastektomije (22,84-86). Slike 3 i 4.



Slika 3. Zračenja dojke flankiranim poljima



Slika 4. Zračenje zida grudnog koša flankiranim poljima

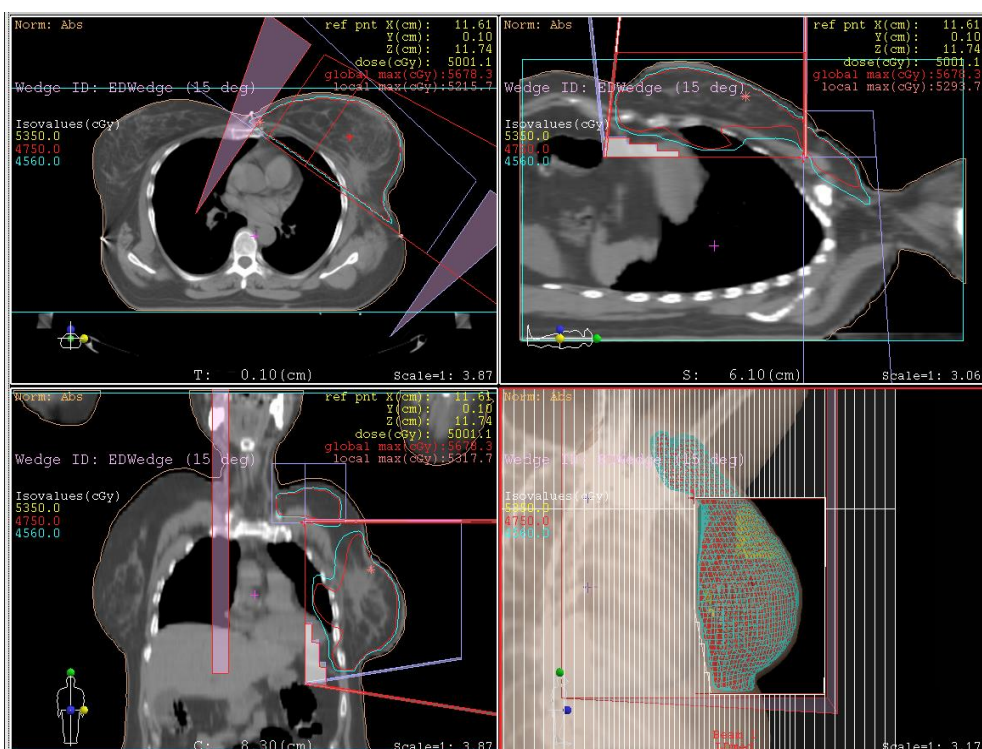
Ukoliko se sprovodi zračenje velikog inoperabilnog tumora u dojci, može se dodati boost na regiju tumora ili na regiju cele dojke sa TD 10-20 Gy (22). Boost doza se može sprovesti manjim flankiranim poljima, jednim direktnim poljem elektronima, ili intersticijalnom brahiterapijom. Takođe postoji mogućnost dodavanja boost doze i na regiju ožiljka od mastektomije ukoliko postoje pozitivne ivice resekcije.

Tehnike zračenja supraklavikularnih i aksilarnih limfnih čvorova

Supraklavikularna regija se zrači iz jednog direktnog prednjeg polja (anteriorno-posteriorno AP polje) i obuhvata supraklavikularne limfne čvorove i vrh (III sprat) aksilarne jame. Ukoliko je potrebno u zračni volumen uključiti i aksilarne limfne čvorove, supraklavikularno polje se produžava u lateralnom pravcu (do lateralnog dela glave humerusa). Zračna terapija se sprovodi fotonima sa TD ranga 45-50 Gy/2 Gy po frakciji. U slučajevima kada se zrači i aksilarna regija može se dodati boost doza na aksilu iz jednog posteriornog polja kada postoji konglomerat limfnih čvorova u aksili ili kada su limfni čvorovi supraklavikularne i aksilarne regije locirani na znatno različitim dubinama (84-88).

Prilikom kombinovanja geometrije flankiranih polja sa supraklavikularnim poljem može doći do izvesnog preklapanja zračnih polja i pojave takozvanih "vrućih" tačaka. Da bi se to

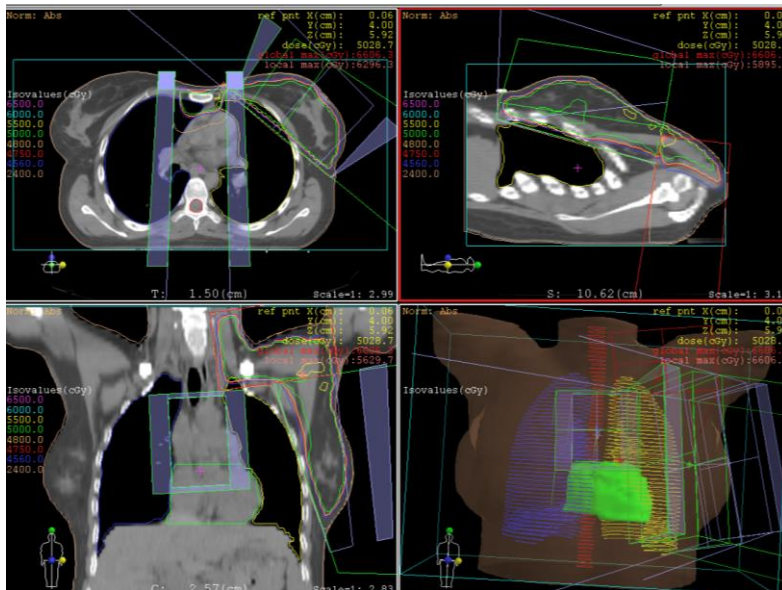
izbeglo mogu da se koriste različite tehnike zračenja, a najčešća od njih je "half-beam" tehnika jednog izocenta. Slika 5.



Slika 5. Kombinacija tri polja, "half-beam" tehnika jednog izocentra

Tehnike zračenja limfnih čvorova uz unutrašnju grudnu arteriju (a.mamaria interna)

Zračna terapija limfnih čvorova uz a. mamariju internu se obično sprovodi u okviru flankiranih polja, takozvanim proširenim flankiranim poljima, prilikom zračenja dojke ili zida grudnog koša. U tom slučaju je potrebna zaštita pluća i/ili srca u donjim partijama zračnog polja. Drugi način zračenja ovih limfatika je posebno prednje direktno polje koje obuhvata prva tri medjurebarna prostora i koje se obično sastoji u kombinaciji zračenja fotonima i elektronima da bi se smanjila doza koju bi primilo srce i pluća. (84-86) Slika 6.



Slika 6. Tehnike zračenja limfnih čvorova uz unutrašnju grudnu arteriju (a. mamaria interna)

Tehnike preoperativne radioterapije

Prilikom sprovođenja preoperativne RT u zračni volumen se uključuje cela dojka i svi regionalni limfni čvorovi (supraklavikularni, aksilarni i limfatici uz a. mamariju internu). Najčešće se koristi "half beam" tehnika jednog izocentra (slika5), gde se iz dva flankirana polja sprovodi zračenje dojke i limfatika uz a. mamariju int. a iz trećeg direktnog polja sprovodi zračenje supraklavikularnih i aksilarnih limfnih čvorova. Tumorska doza (TD) koja se daje na celu dojku iznosi 50 Gy u 25 frakcija (2 Gy dnevno) uz mogućnost dodavanja "boost" doze na regiju tumora sa TD 10 Gy. Regionalni limfni čvorovi se zrače dozom ranga 45-50 Gy u 25 frakcija.

Savremeno planiranje RT podrazumeva konturisanje ciljnih volumena na CT presecima dobijenim nakon sprovođenja CT simulacije. Vrš se konturisanje CTV-a (clinical target volume) dojke i regionalnih limfatika a prema preporukama Radiation Therapy Oncology Group (RTOG atlas) (89).

CTV za dojku uključuje vidljivo tkivo dojke na CT-u. Gornja granica CTV-a je obično do pripoja II rebra, mada može biti varijabilna i zavisi od veličine i oblika dojke, donja granica je dokle postoji tkivo dojke. Prednja granica je do kože (u slučaju da postoji infiltracija kože može se dodati i bolus). Posteriorna granica uključuje i pektoralne mišiće, mišiće grudnog koša i rebra. Lateralna granica je do srednje aksilarne linije (isključuje m. latissimus dorsi) i može biti varijabilna, što zavisi od veličine dojke i ptoze tkiva dojke na lateralnu stranu. Medijalna granica ide do sternuma.

CTV za supraklavikularne limfne čvorove kranijalno počinje od donje ivice krikoidne hrskavice, donja granica je do donje ivice glave klavikule. Prednja granica je do m. SCM, a posteriorna do prednje strane skalenskog mišića. Medijalna granica je do traheje i štitaste žlezde, a lateralna granica ide do lateralne ivice m. SCM (kranijalno) i spoja I rebara i klavikule (kaudalno).

Aksilarni limfni čvorovi su podeljeni u tri nivoa. CTV za I nivo počinje kranijalno od ukrštanja aksilarnih krvnih sudova sa lateralnom ivicom m. pectoralis minor-a, a donja granica je do insercije m. pectoralis major-a za rebro. Prednja granica je do prednje površine m. pectoralis major-a i m. latissimus dorsi, a zadnja ivica do prednje površine subskapularnog mišića. Lateralna granica je do medijalne granice m. latissimus dorsi, a medijalna granica do lateralne granice m. pectoralis minor-a.

CTV za II nivo počinje kranijalno od ukrštanja aksilarnih krvnih sudova sa medijalnom ivicom m. pectoralis minor-a, a donja granica je ukrštanje aksilarnih krvnih sudova sa lateralnom ivicom m. pectoralis minor-a. Prednja granica je prednja površina m. pectoralis minor-a, zadnja do rebara i interkostalnih mišića. Lateralna granica je lateralna ivica m. pectoralis minor-a, a medijalna granica je medijalna ivica m. pectoralis minor-a.

CTV za III nivo kranijalno počinje od insercije m. pectoralis minor-a na krikoid, a kaudalno se prostire do ukrštanja aksilarnih krvnih sudova sa medijalnom ivicom m. pectoralis minor-a. Prednja granica je zadnja površina m. pectoralis major-a, a zadnju granicu čine rebra i interkostalni mišići. Lateralna granica je do medijalne ivice m. pectoralis minor-a, a medijalnu granicu čini ulaz u toraks.

CTV za limfne čvorove uz a. mamariju int. kranijalno počinje od gornjeg medijalnog dela I rebra i proteže se kaudalno do gornjeg dela IV rebra. Limfni čvorovi prate unutrašnje grudne krvne sudove, te im je medijalna granica ivica sternuma, posteriorna granica je pleura, a anteriorna i lateralna granica je 5 mm od krvnog suda.

Pored konturisanja ciljnih volumena, vrši se i konturisanje organa od rizika – pluća i srca (za tumore lokalizovane u levoj dojci), a da bi se odredili volumen i doza koju primaju ovi zdravi organi u toku zračne terapije dojke.

QUANTEC (Quantitative analyses of normal tissue effects in the clinic) predstavlja analizu doze – volumen efekta na zdrava tkiva, a u cilju predviđanja rizika od njihovog oštećenja.

Za srce je pokazano da ukoliko je $V_{25Gy} < 10\%$ (manje od 10% volumena srca primi 25 Gy), to bi bilo udruženo sa $< 1\%$ verovatnoće od dugoročnog kardiološkog mortaliteta (15 godina nakon sprovedene RT), dok je za pluća pokazano da bi $V_{20 Gy} \leq 30\%$ (manje od 30%

volumena pluća primi 20Gy) moglo da dovede do pojave <20% slučajeva simptomatskog pneumonitisa (90,91).

Nove tehnologije u zračnoj terapiji

Konformalna terapija je postala sadašnji trend u radioterapiji sa ciljem da se aplikuje visoka doza zračenja tačno na planirani ciljni volumen, a da se maksimalno poštede okolni zdravi organi.

Dalji napredak u bezbednom i efektivnom aplikovanju zračne terapije usledio je uvođenjem novih tehnologija u radioterapiji kao što su intenzitetom modulirana RT (Intensity-Modulated radiotherapy-IMRT), volumetrijski modulirana lučna terapija (Volumetric modulated arc therapy-VMAT), radioterapija prilagodjena disanju (Breathing Adapted Radiotherapy) i RT protonima (92). IMRT podrazumeva modeliranje zračnog snopa prema kliničkoj potrebi, kako po obliku tako i po distribuciji (intenzitetu). U okviru zračnog volumena je moguće menjati intenzitet doze, tako da ciljni volumen dobije maksimalnu planiranu dozu uz poštedu okolnih organa, čime se postiže homogenije ozračivanje cele dojke (92,93). VMAT predstavlja još kompleksniju varijantu RT gde se tokom zračenja istovremeno rotiraju i gentry i kolimator. Ovim načinom zračenja je omogućena još veća pošteta srca i pluća prilikom zračenja leve dojke, a naročito kada su u zračni volumen uključeni limfatici uz a. mamariju internu (94). RT prilagođena disanju podrazumeva da se snop zračenja uključi samo u vreme određene faze respiratornog ciklusa, što modifikuje pokrete organa i njihovu poziciju u zračnom polju. Pokazano je da duboki inspirijum redukuje volumen srca u zračnom polju kod tumora lokalizovanih u levoj dojci, te se time znatno redukuje doza koju primi srce i istostrano plućno krilo bez kompromitovanja ciljnog volumena i bez povećanja doze na kontralateralne organe (92,95) Radioterapija protonima ima jedinstvenu mogućnost da optimalno ozrači ciljni volumen uz istovremenu optimalnu poštedu organa od rizika koji su postavljeni distalno, zahvaljujući naglom padu doze distalno od ciljnog volumena (96). Zbog toga je protonska terapija počela da se u poslednjih nekoliko godina primenjuje i kod zračenja LOKD, jer se znatno smanjuje doza koju primaju pluća i srce.

1.4.3.5. NEŽELJENI EFEKTI ZRAČNE TERAPIJE

Komplikacije RT mogu da se jave u toku same primene RT ili nakon nekog vremena od završetka RT.

U toku sprovođenja RT najčešće dolazi do pojave radijacionog dermatitisa kože zračene regije u vidu eritema, hiperpigmentacije sa suvom deskvamacijom i redje do vlažne deskvamacije. Sve ove promene su blage i prolazne.

Komplikacije koje se javljaju kasnije, posle nekog vremena od završenog RT tretmana, mogu da se odnose na kožu i meka tkiva zračene regije (fibroza, hiperpigmentacija i teleangiektazije) ili na pojavu limfedema ruke, radijacionog pneumonitisa, kardiološke toksičnosti i oštećenja brahijalnog pleksusa (84).

Limfedem ruke je obično povezan sa obimom aksilarne hirurgije, a primena RT dodatno povećava rizik (97,98). Aksilarna disekcija i RT aksilarne regije mogu da svaka ponaosob dovedu do rizika pojave limfedema koji je manji od 10%. Medjutim taj rizik ide i do 40% ako se kombinuje kompletna aksilarna disekcija sva tri sprata aksile sa RT kompletne aksilarne regije.

Pneumonitis i pulmonalna fibroza su udruženi sa povećanjem volumena pluća koje se nalazi u zračnom polju, kao i sa upotrebom HT. Analize su pokazale da se kod primene RT samo tangencijalnim poljima na regiju dojke, pneumonitis javlja u 0.2% slučajeva, dok se taj procenat povećava na 1.4% ukoliko se sprovodi i zračenje regionalnih limfatika. Primena adj. HT dodatno povećava incidencu pneumonitisa na 3.3% , a ukoliko se adj. HT daje istovremeno sa RT, onda se pneumonitis javlja u 8.8% slučajeva (97,98).

Kardiološka toksičnost se može manifestovati u vidu perikarditisa, pankarditisa, kardiomiopatije i oboljenja koronarnih arterija sa ishemičnom bolešću srca. Ranije sprovedene studije su pokazale da je kod pacijenata koji su imali postoperativnu RT primećen povećani mortalitet kardiovaskularne prirode. Medjutim, nove tehnike RT i planiranje bazirano na CT-u su omogućile individualno planiranje RT za svakog pacijenta i minimalno ozračivanje kritičnih organa - srca i pluća. (98)

Oštećenje brahijalnog pleksusa se može javiti prilikom zračenja supraklavikularne i aksilarne regije. Brahijalna pleksopatija je retka komplikacija ukoliko se daje standardna ukupna tumorska doza konvencionalnim režimom frakcionisanja. Ovo oštećenje je više bilo vezano za stare tehnike zračenja, kada je doza na brahijalni pleksus bila i preko 130% od preskribovane doze (84).

1.5. PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI FAKTORI LOKD

Prognoštički faktori u LOKD su praktično isti kao i kod ranog karcinoma dojke, i predstavljaju karakteristike samog tumora i pacijenta koji bitno određuju ishod bolesti i služe za predviđanje prognoze. Lokoregionalna kontrola i uopšte ishod bolesti zavise pre svega od standardnih prognoštičkih parametara kao što su veličina tumora, gradus tumora, nodalni status, godine starosti.

Veličina tumora i nodalni status imaju najveći uticaj na prognozu bolesti i preživljavanje. Još ranije je ustanovljeno da se sa povećanjem veličine tumora i broja pozitivnih limfnih čvorova u aksili pogoršava ishod bolesti (99).

Većina pacijenata sa LOKD ima zahvaćene aksilarne limfne čvorove, mada, određeni broj pacijenata može imati veliki primarni tumor u dojci bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima. Prognoza pacijenata bez zahvaćenih limfnih čvorova je bolja, dok je za one koji imaju zahvaćene limfne čvorove prognoza utoliko lošija, ukoliko je zahvaćen veći broj limfnih čvorova (99). Veličina primarnog tumora takodje ima uticaja na preživljavanje. Pacijenti sa većim tumorom imaju lošiju prognozu, pokazano je da 5-godišnje preživljavanje za tumore <5 cm, 5-10 cm i >10 cm, je 65%, 36% i 16% (23).

Pored toga postoje prognoštički faktori koji mogu biti i prediktivni markeri, odnosno mogu i da istovremeno ukažu na odgovor na određenu terapiju. Tu pre svega spadaju hormonski receptori za estrogen (ER) i progesteron (PgR) i receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER-2), koji su prediktori odgovora na hormonsku terapiju i biološku HER-2 ciljanu terapiju, kao i marker proliferacije Ki-67 (100-103).

Steroidni receptori za estrogen (ER) i progesteron (PgR)

Hormonski receptori za estrogen (ER) i progesteron (PgR) su intraćelijski steroidni receptori i predstavljaju dobro poznate, standardne prognoštičke faktore, kao i prediktivne faktore odgovora na hormonsku terapiju. Pozitivan nalaz hormonskih receptora (HR) je udružen sa boljom prognozom, odnosno dužim preživljavanjem u odnosu na negativne HR (104,105.) Takodje je pokazano da pacijenti sa negativnim HR imaju veći rizik za pojavu lokalnog recidiva nakon mastektomije (106).

Iako je poznato da pozitivni receptorski status ukazuje na bolju prognozu bolesti, manje je jasno da li ER i PgR mogu da predvide i odgovor na radioterapiju. Pokazano je da ER pozitivni tumori imaju manju verovatnoću pojave lokalnog recidiva nakon poštedne operacije

i postoperativne RT u odnosu na ER negativne (107-110). Ali sa druge strane, istraživanja su pokazala da pacijenti sa niskom ekspresijom ER imaju veću korist od postoperativne RT u pogledu preživljavanja bez bolesti (DFS- disease free survival) u odnosu na pacijente sa visokom ekspresijom ER (111). Takođe u literaturi postoje podaci da pacijenti sa LOKD koji imaju negativne HR bolje odgovore na kombinovanu HT-RT neoadjuvantnu terapiju u smislu većeg procenta pCR u komparaciji sa HR pozitivnim pacijentima (112,113).

Receptor za humani epidermalni faktor rasta-2 (*HER-2*)

Receptor humanog epidermalnog faktora rasta-2 (*HER-2*), poznat kao c-erbB2 ili neu, nalazi se na površini ćelije, a predstavlja transmembranski glikoprotein čija unutrašnja domena ima aktivnost tirozin kinaze (114). Pripada familiji HER i kodiran je od strane proto-onkogene *HER-2/erbB2* koji se nalazi na hromozomu 17. Amplifikacija gena i/ili povećana ekspresija receptora uočena je u do 60% duktalnih carcinoma in situ i u 15-20% žena sa invazivnim karcinomom dojke (115). U kliničkoj praksi određuje se *HER-2* ekspresija receptora imunohistohemijskom (IHH) metodom ili amplifikacija *HER-2* gena. Pokazano je da je *HER-2* amplifikacija gena ili prekomerna ekspresija receptora udružena sa većim tumorskim gradusom, nedostatkom ER receptora, većim nivoom indikatora tumorske proliferacije kao što je *Ki-67* i lošijom prognozom, odnosno, sa agresivnom prirodom bolesti i tumorskog rasta (102,108,115,116). Pored toga smatra se da prekomerna ekspresija *HER-2* može da štiti maligne ćelije karcinoma dojke od letalnih efekata jonizujućeg zračenja (117). U eksperimentima na ćelijskim kulturama pokazana je povećana radiorezistencija u ćelijama koje imaju povećanu ekspresiju *HER-2* receptora (118). Kliničke studije su pokazale da pacijenti sa lokalnim recidivom nakon pošteđene operacije kao i nakon mastektomije imaju veću verovatnoću da su *HER-2* pozitivni (106,109,110). U seriji pacijenata sa lokalno odmaklim karcinomom dojke koji su tretirani kombinovanim lečenjem hemioterapijom i radioterapijom, uočeno je da je niska ekspresija *HER-2* udružena sa boljim odgovorom na terapiju (119).

Ki-67

Ki-67 je nuklearni antigen koji se nalazi u ćeliji koja je u proliferativnoj fazi, te stoga predstavlja marker ćelijske proliferacije (115). Ekspresija *Ki-67* varira kroz različite faze ćelijskog ciklusa (G1, S, G2, i M faze) sa pikom u fazi mitoze, dok je u fazi mirovanja (G0) odsutan. Pokazano je da pacijenti sa povećanom ekspresijom *Ki-67* u više od 50% ćelija imaju visok rizik za razvoj relapsa bolesti i lošiju prognozu (115). Pored toga povećana

ekspresija Ki-67 udružena je i sa negativnim ER i pozitivnim HER-2 nalazom (120). Sa druge strane, studije su pokazale da Ki-67 ima i prediktivnu ulogu u odgovoru na neoadjuvantnu HT, odnosno da je visok nivo Ki-67 udružen sa boljim odgovorom na terapiju (121-123). Takođe, neka istraživanja su procenjivala ulogu Ki-67 i u predikciji odgovora na radioterapiju (102).

1.6. BIOLOGIJA TUMORA I ODGOVOR NA NEOADJUVANTNU TERAPIJU

Neoadjuvantni pristup u lečenju LOKD počeo je primenom preoperativne RT još sredinom prošlog veka, kada nisu bili poznati biološki markeri, te ispitivanja u tom smislu i nisu bila moguća. Uvodjenjem neoadjuvantne HT i njenom sve širom primenom, omogućeno je da se prvo istraži povezanost bioloških markera i odgovora na HT.

U prošlosti, pre upotrebe neoadjuvantne HT, 5-godišnje preživljavanje LOKD je iznosilo oko 25% (88). Kombinovanim načinom lečenja (HT, hirurgija, RT) preživljavanje za operabilni IIIA stadijum je povećano do 80%, a za inoperabilni IIIB na oko 45% (88). Pokazano je da pacijenti u III stadijumu bolesti koji imaju identične kliničke prediktivne faktore, mogu da imaju različite ishode bolesti. Otkrićem molekularnih podtipova karcinoma dojke, objašnjen je heterogeni ishod bolesti i podstaknut nastavak napora u identifikaciji prediktora odgovora na terapiju i preživljavanje baziranih na molekularnom profilu tumora (124-126). Prema biološkim karakteristikama maligni tumori dojke se mogu podeliti na:

a) *Luminalne podtipove* - luminal A podtip je najčešći, javlja sa u 51-66% svih karcinoma dojke. Ovi tumori su indolentne prirode, sa niskim proliferativnim indeksom i dobrom prognozom. Imaju jaku ekspresiju hormonskih receptora, visoko su hormonski senzitivni, vrlo malo osetljivi na hemioterapiju (124,126). Luminal B podtip se javlja u 10% slučajeva svih tumora, definiše ga visok proliferativni indeks i lošija prognoza u odnosu na luminal A. Endokrina senzitivnost je varijabilna u odnosu na status HR, dok je hemosenzitivnost veća u odnosu na luminal A (125,126).

U literaturi se opisuju različiti procenti pCR za luminalne podtipove tumora koji se kreću od 0-23%, i to za luminal A podtip od 0-7.5%, a za luminal B od 1-16.2% (126).

b) *HER-2 pozitivni podtip* - javlja se u oko 15% slučajeva svih karcinoma dojke i podeljen je na HER-2 pozitivni sa odsustvom HR i luminal HER-2 pozitivni sa prisutnim HR (124-126). Ovi tumori su obično agresivni, sa visokim proliferativnim indeksom i lošom prognozom.

Visoko su osetljivi i na hemioterapiju i na anti HER-2 terapiju, te se pCR prilikom primene obe terapije može postići u 22-48% slučajeva u luminal HER-2 podtipu i 33-70% slučajeva u HER-2 pozitivnim (uz odsustvo HR) tumorima (126).

c) *Trostruko negativni podtip* - javlja se u oko 15% slučajeva i definisan je negativnim ER i PgR i nedostatkom ekspresije HER-2 proteina ili amplifikacije HER-2 gena. To su izrazito agresivni tumori sa jako lošom prognozom. Terapija izbora za ove tumore je hemioterapija, a pCR koji se opisuje u literaturi se kreće od 20% - 56% (126).

Česta upotreba *neoadjuvantne HT* u lečenju LOKD obezbedila je mogućnost da se istraže molekularni mehanizmi tumorskog odgovora na terapiju. Tako se stopa patohistologog kompletnog odgovora (pCR) značajno razlikuje između molekularnih podtipova. Luminal A podtip ima vrlo mali procenat pCR na različite vrste neoadjuvantne HT, za razliku od basal-like i HER-2 pozitivnog podtipa, koji imaju visoku stopu pCR, dok je luminaln B podtip udružen sa srednjom stopom odgovora na terapiju (19). Na prvi pogled, niže preživljavanje pacijenata sa basal-like i HER-2 pozitivnim tumorima izgleda da stoji u kontrastu sa visokom stopom pCR-a, s obzirom da postizanje pCR-a poboljšava ukupno preživljavanje. Međutim, pacijenti koji imaju pCR, imaju bolje preživljavanje bez obzira na podtip tumora. Nepovoljni ishod kod pacijenata sa basal-like i HER-2 pozitivnim tumorima je uzrokovan visokim procentom relapsa ili smrtnog ishoda, ali kod onih pacijenata koji nisu postigli pCR.

Uticaj molekularnih podtipova na odgovor na *radioterapiju* ispitivan je kod pacijenata koji su imali postoperativnu RT nakon mastektomije LOKD, odnosno koji su bili sa visokim rizikom za relaps bolesti (tumor veći od 5 cm, pozitivan nalaz u aksili). Pokazano je da basal-like i HER-2 pozitivni tumori imaju postignutu manju redukciju lokalnog recidiva primenom RT u poredjenju sa luminalnim podtipovima (106). Ovaj nalaz može da sugeriše postojanje radiorezistencije kod podtipova sa lošom prognozom, u suprotnosti sa relativnom radiosenzitivnošću kod luminalnih potipova. Drugo objašnjenje visoke stope LR može da bude u vezi sa prirodnom agresivnošću preživelih ćelija basal-like i HER-2 poz. tumora. Slični rezultati su dobijeni i kod primene postoperativne RT ranog karcinoma dojke nakon poštredne operacije. Naime pokazan je značajno povećan procenat pojave 5-godišnjeg LR kao prvog relapsa kod basal-like i HER-2 pozitivnih podtipova u odnosu na luminalne A i B podtipove (110).

1.7. GENSKA ANALIZA

Analiza na molekularnom nivou je pokazala da je karcinom dojke heterogena bolest sa različitim podtipovima, i da svaki podtip ima svoju biologiju i prirodu. Kao rezultat toga postoje različiti terapijski pristupi koji su optimalni za svaki podtip tumora. Iako je podela na podtipove na osnovu imunohistohemijskih analiza pokazala jasne prognostičke i prediktivne sposobnosti, i dalje postoje slučajevi koji zahtevaju još precizniju analizu.

Potreba za daljim poboljšanjem prognostičkih faktora dovela je do razvoja molekularnih testova baziranih na proceni ekspresije setova gena koristeći DNA mikroereje (127,128). Na taj način su identifikovani prognostički geni koji mogu da predvide ishod bolesti i utiču na izbor sistemske terapije. Kvantitativno merenje genske ekspresije vrši se na parafinskim uzorcima tumorskog tkiva FFPE (formalin fixed parafin embeded) tehnikom Real-time PCR. Postoji nekoliko genskih testova, koji su danas u upotrebi, kao što su 21-gen Oncotype DX, Prosigna PAM 50 i 70-gen MammaPrint, a koji se pre svega odnose na procenu potrebe adjuvantne sistemske terapije kod ranog karcinoma dojke (103,127).

Oncotype DX je jedan od prvih klinički potvrđenih molekularnih testova, koji se bazira na analizi 21 gena, a pokazuje korist od primene adjuvantne terapije kod ranog, ER pozitivnog karcinoma dojke (129). MammaPrint mikroerej test analize 70 gena je takodje prediktivni biomarker kod ranog karcinoma dojke (130,131), a može biti od pomoći i u identifikaciji pacijenata koji bi imali koristi od neoadjuvantne hemioterapije (132). Prosigna PAM 50 je genski test koji analizira aktivnost određenih gena (set od 50 gena) kod ranog, HR pozitivnog karcinoma dojke sa ciljem procene pojave udaljenih metastaza (133).

Kako se većina genskih testova koji su u komercijalnoj upotrebi koriste za procenu rizika pojave relapsa bolesti i potrebu primene sistemske terapije, sve više se javlja interesovanje za otkrivanjem biologije tumora koja bi predvidela i korist od sprovođenja RT u određenoj populaciji pacijenata sa karcinomom dojke.

Za sada ne postoje snažni biološki markeri koji bi identifikovali pacijente koji hoće ili neće odgovoriti na RT. Identifikacija gena koji se različito eksprimiraju kod radiosenzitivnih i radiorezistentnih pacijenata sa karcinomom dojke mogla bi biti metoda za predikciju odgovora na RT.

Analiza gena koji bi predvideli korist od primene RT radjena je kod pacijenata koji su imali postoperativnu RT nakon mastektomije gde je potvrđen genski profil koji je udružen sa pojavom LRR i predikcijom koristi od postoperativne RT u grupi pacijenata sa visokim rizikom (134). Sa druge strane, pokazano je da grupa pacijenata sa niskim rizikom nije imala

dodatne koristi od postoperativne RT. Slično, radjena je laboratorijska studija na ćelijskim kulturama raka dojke koja je nastojala da ustanovi genski zapis radiosenzitivnosti karcinoma dojke u cilju identifikovanja pacijenata koji bi najverovatnije imali koristi od RT (135). Stoga, danas sve više studija radi na tome da utvrdi ulogu molekularnog profilisanja u cilju odredjivanja koji će pacijenti imati koristi od primene radioterapije.

2. CILJEVI RADA

1. Ispitivanje povezanosti lokalnog odgovora (kliničkog i patohistološkog) na preoperativnu RT sa ukupnim preživljavanjem (OS) i preživljavanjem bez znakova bolesti (DFS).
2. Ispitivanje uticaja inicijalnih karakteristika pacijenata i tumora (starost, menopauzalni status, veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova) na ishod bolesti i odgovor na preoperativnu RT.
3. Ispitivanje povezanosti bioloških markera ER, PgR, HER2, Ki-67 u odnosu na odgovor tumora na preoperativnu RT (kompletna regresija-CR, parcijalna regresija-PR i stabilizacija bolesti-SD) i ishod bolesti (OS i DFS).
4. Ispitivanje promene ekspresije bioloških markera (ER, PgR, HER2, Ki-67) nakon preoperativne RT i njihova povezanost sa odgovorom na PRT i ishodom bolesti.
5. Ispitivanje povezanosti genske analize primarnog tumora sa odgovorom na preoperativnu RT.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. PACIJENTI I NAČIN LEČENJA

U analizu je uključeno 134 bolesnica sa lokalno odmaklim karcinomom dojke u stadijumu IIIA i IIIB, kod kojih je u periodu od 1997 – 2000 godine u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije sprovedena preoperativna radioterapija dojke i regionalnih limfatika. Pre započinjanja zračne terapije kod svih bolesnica je uradjena biopsija tumora radi patohistološke verifikacije malignog procesa u dojci. Šest nedelja po završenoj zračnoj terapiji kod svih bolesnica je učinjena radikalna mastektomija i data odgovarajuća adjuvantna terapija (hemioterapija i/ili hormonoterapija – u zavisnosti od prognostičkih parametara, a prema tada važećem protokolu za lečenje malignih tumora) (136).

Preoperativna zračna terapija je sprovedena sa TD 45 Gy u 15 frakcija (3 Gy po frakciji) na regiju dojke i svih regionalnih limfatika (aksilarni, supraklavikularni i limfatici duž a. mamarije int.). Zračenje dojke i regionalnih limfatika je vršeno naizmenično, svaki drugi dan, tako da je ukupno trajanje zračne terapije bilo 30 radnih dana, odnosno 6 nedelja.

Zračena terapija dojke je sprovedena fotonima, iz dva suprotna tangencijalna polja – medijalnog i lateralnog uz korišćenje klinastih filtera za homogenizaciju doze. Proračun doze je vršen na jednom transferzalnom preseku, koji je prolazio kroz centar dojke (kroz mamilu). Supraklavikularni i aksilarni limfni čvorovi su zračeni takodje fotonima iz jednog direktnog (prednjeg) polja sa kalkulacijom doze na 1/3 antero-posteriornog dijametra. Limfatici uz a.mamariju internu su zračeni iz jednog prednjeg polja, koje je obuhvatalo prva tri medjurebarna prostora, a doza je kalkulirana na dubini od 2-3 cm. Korišćena je kombinacija fotona (30Gy) i elektrona (15Gy) a radi smanjenja kardiološke toksičnosti. Zračna terapija je sprovedena na aparatu za tele-kobalt terapiju (TCT) i na linearnom akceleratoru.

Šest nedelja po završenoj zračnoj terapiji kod svih bolesnica je učinjena radikalna mastektomija.

Adjuvantna hemioterapija i/ili hormonska terapija su date prema tada važećem protokolu za lečenje karcinoma dojke. Hemioterapija je podrazumevala primenu 6 ciklusa kombinacije sledećih citostatika: ciklofosfamida, metotreksata i 5-fluorouracila (CMF) ili 5-

fluorouracila, doksorubicina i ciklofosfamida (FAC). Hormonska terapija se sastojala iz primene Tamoksifena u trajanju od 5 godina za postmenopauzne bolesnice ili primene zračne kastracije sa TD 12 Gy u 4 frakcija, za premenopauzne bolesnice, ili njihove kombinacije u pojedinim slučajevima.

Analiza bioloških markera vršila se na materijalu biopsiranog tumora pre sprovođenja RT i na materijalu tumora nakon sprovedene RT dobijenog posle mastektomije (osim za one tumore kod kojih je preoperativna RT dovela do kompletne regresije. U slučaju kompletne regresije tumora u dojci, za analizu bioloških markera uziman je materijal iz limfnog čvora u aksili, ukoliko je bio pozitivan.

Materijal na kome su se određivali biomarkeri: parafinski kalupi od biopsije tumora pre radioterapije i uzoraka tumora posle radioterapije i mastektomije.

3.2. KRITERIJUMI EVALUACIJE ODGOVORA NA PREOPERATIVNU RADIOTERAPIJU

3.2.1. Klinička procena

Procena odgovora na preoperativnu RT vršena je na osnovu kliničkog nalaza upoređivanjem inicijalne veličine tumora (pre započinjanja zračne terapije) i veličine tumora u tkivu nakon mastektomije. Odgovor je procenjen kao:

Klinički kompletan odgovor (cCR): odsustvo malignog tkiva na preparatu od mastektomije, ili prisustvo pojedinačnih malignih ćelija ili fokusa DCIS.

Klinički parcijalan odgovor (cPR): smanjenje tumora za više od 30%.

Klinički stabilna bolest (cSD): smanjenje tumora za manje od 30% ili nepromenjena veličina tumora.

3.2.2. Patohistološka procena posle neoadjuvantne terapije

Radjena je i patohistološka procena odgovora primarnog tumora na preoperativnu RT (20,137) i odgovor je procenjivan kao:

Kompletan patohistološki odgovor (pCR): odsustvo invazivnog karcinoma sa ili bez fokusa DCIS u tkivu nakon mastektomije.

Približno kompletan patohistološki odgovor (pNCR): prisutan rezidualni tumor manji od 5 mm.

Parcijalan patohistološki odgovor (pPR): evidentna redukcija tumora ili oštećenja ćelija, rezidualni tumor veći od 5 mm.

Patohistološki nema promena (pNC): nema promena koje bi sugerisale dejstvo RT.

3.3. METODOLOGIJA ODREĐJIVANJA BIOLOŠKIH MARKERA

Odredjivanje statusa ER, PgR, HER-2 i Ki-67 radili su se imunohistohemijском (IHH) metodom iz parafinskih tkivnih kalupa.

3.3.1. Odredjivanje ER i PgR

Za odredjivanje ER korišćeno je LabVision antitelo (klon SP1) u razblaženju 1:200 primenom citratnog pufera.

Za odredjivanje PgR korišćen je DAKO-vo antitelo (klon PgR 636) u razblaženju 1:500 u citratnom puferu

Interpretacija imunohistohemijske analize ekspresije estrogenog (ER) i progesteronskog (PgR) receptora u tumorskim ćelijama (Allred score):

Skor proporcije prebojenih nukleusa (a) Skor intenziteta prebojenosti (b)

0 = nema prebojenosti jedara

0 = nema bojenja

1 = < od 1% jedara prebojeno

1 = slab intenzitet bojenja

2 = 1-10% jedara prebojeno

2 = srednji intenzitet bojenja

3 = 11-33% jedara prebojeno

3 = jaka prebojenost

4 = 34-66% jedara prebojeno

5 = 67-100% jedara prebojeno

Ukupan skor SR dobija se sabiranjem skora prebojenih nukleusa (a) i skora intenziteta prebojenosti (b).

Za pozitivan status SR je uzeta vrednost skora ≥ 3 (138).

3.3.2. Odredjivanje HER-2 statusa

Za odredjivanje HER-2 korišćeno je Novocastra antitelo (klon CB 11) u razblaženju 1:800 u citratnom puferu.

Algoritam evaluacije humanog epidermalnog faktora rasta receptora 2 (HER-2) proteina imunohistohemijskom analizom u invazivnoj komponenti tumora:

IHC 0 negativno - nema bojenja ili slabo nekompletno membransko bojenje u < 10% tumorskih ćelija.

IHC 1+ negativno - slabo nekompletno membransko bojenje u > 10% tumorskih ćelija.

IHC 2+ "equivocal" - cirkumferentno membransko bojenje koje je nekompletno, slabo ili umereno u >10% tumorskih ćelija ili intenzivno kompletno i cirkumferentno membransko bojenje u < 10% tumorskih ćelija.

IHC 3+ pozitivno - kompletno intenzivno membransko bojenje u > 10% tumorskih ćelija (139).

3.3.3. Odredivanje Ki-67

Za odredjivanje Ki-67 korišćeno je Lab Vision antitelo (klon SP6) u razblaženju 1:200 primenom citratnog pufera.

Granična vrednost za Ki-67 je uzeta $\leq 14\%$ za niski proliferativni indeks, a $> 14\%$ za visoki proliferativni indeks (140).

Za vizuelizaciju je korišćen Ulta Vision detekcioni sistem, RTU (ready to use), Lab Vision.

3.4. METODE MERENJA GENSKE EKSPRESIJE U UZORCIMA INICIJALNOG TUMORA KARCINOMA DOJKE

Izolacija RNK iz parafinskih uzoraka tumorskog tkiva FFPE (formalin fixed parafin embeded) vršena je na blokovima sa više od 50% tumorskog tkiva. Ukupna RNK je izolovana iz dva isečka FFPE tkiva debljine 10 mikrona korišćenjem RNeasy FFPE Kit (Qiagen). Kvalitet i kvantitet RNK je odredjivan na aparatu BioSpec-nano (Shimatzu).

Za merenje globalne genske ekspresije Microarray hibridizacijom korišćen je Agilent SurePrint G3 Hm GE v.2 8x60k Microarray koji pokriva 27.958 gena. Eksperiment je urađen po Agilent protokolu za parafinske uzorke. Microarray slajdovi su pročitani na Agilent SureScan Microarray skeneru. Slike su obradjene korišćenjem Feature Extraction v.11 softvera.

3.4.1. Analiza microarray podataka

Prva obrada podataka i kontrola kvaliteta je izvedena korišćenjem R verzije 3.0.1 i R/Bioconductor seta. Analiza diferencijalne ekspresije urađena je korišćenjem izmenjenog linearnog modela t-testa (limma). Procenjeni nivoi značajnosti (nemodifikovana p-vrednost) su korigovani korišćenjem Benjamini i Hochberg False Discovery Rate (FDR) podešavanja i q-vrednosti (podešene p-vrednosti su prikazane). Geni sa q vrednošću < 0.05 su selektovani kao značajno različito eksprimirani.

3.4.2. Analiza izmenjenih signalnih puteva

Svi različito eksprimirani geni su podvrgnuti analizi signalnih puteva korišćenjem Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software. Fisher-ov test i χ^2 -test su korišćeni za odabir značajno izmenjenih signalnih puteva.

3.4.3. Validacija mRNK ekspresionih profila kvantitativnim Real – Time PCR-om (Q-RT-PCR)

Validacija microarray eksperimentalnih podataka je urađena Q-RT-PCR-om za 10 značajno izmenjenih gena (CHEK2, XRCC2, MCM6, MAP3K4, MMP14 APOA1, WHSC1L1, IDO1, ST3Gal-4 i A1CF).

3.5. DEFINICIJA ISHODA BOLESTI

Definisani su sledeći parametri na osnovu kojih je procenjen ishod bolesti:

- DFI (disease-free interval) – vremenski interval bez bolesti (slobodni interval): vreme od radikalne operacije do pojave lokalnog recidiva i/ili udaljenih metastaza i/ili primarnog tumora suprotne dojke i/ili drugog primarnog tumora nekih drugih organa.
- DFS (disease-free survival) – preživljavanje bez znakova bolesti: vreme od radikalne operacije do pojave lokalnog recidiva i/ili udaljenih metastaza i/ili primarnog tumora suprotne dojke i/ili drugog primarnog tumora nekih drugih organa i/ili smrti bez relapsa bolesti.
- OS (overall survival) – ukupno preživljavanje: vreme od postavljanja patohistološke dijagnoze (biopsije tumora) do smrti bez obzira na njen uzrok.

3.6. STATISTIČKA ANALIZA

Prilikom statističke analize podataka, njihovog opisa i prikaza, korišćeno je sledeće:

- Za ispitivanje saglasnosti uzoračkih raspodela sa normalnom raspodelom, korišćeni su grafici: Normal Q-Q Plot i Histogram, kao i testovi: Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk.
- Za opis parametara od značaja α u zavisnosti od njihove prirode, korišćene su mere deskriptivne statistike: frekvencije, procenti, srednja vrednost (prosek), medijana, standardna devijacija (SD) i opseg (raspon).
- Za nivo statističke značajnosti usvojena je vrednost $\alpha=0.05$. U slučaju višestrukog testiranja nad istim setom podataka, korišćena je Bonferroni korekcija α -vrednosti ($\alpha_1=0.05/3=0.0167$; $\alpha_2=0.05/6=0.0083$).
- Za testiranje razlika između podgrupa od značaja α u zavisnosti od prirode ispitivanih parametara, korišćeni su: Pearson χ^2 test i Fisher exact test.
- Za prikaz ukupnog preživljavanja (OS), slobodnog intervala (DFI) i preživljavanja bez znakova bolesti (DFS) korišćena je Kaplan-Meier product-limit metoda a za njihov opis korišćene su medijane Survival Analysis sa odgovarajućim 95% intervali poverenja (95%CI). Za testiranje razlika u ukupnom preživljavanju, slobodnom

intervalu i preživljavanju bez znakova bolesti u odnosu na parametre od značaja, korišćen je Log-rank test.

- Analiza podataka je rađena u statističkom programu R version 3.3.2 (2016-10-31) -- "Sincere Pumpkin Patch"; Copyright (C) 2016 The R Foundation for Statistical Computing; Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit) (dostupno na: www.r-project.org; preuzeto: 21.01.2017.)

Statistička analiza gena sprovedena u okviru eksperimentalnog dela istraživanja:

- Shapiro-Wilk W test je upotrebljen za procenu da li genska ekspresija merena Q-RT-PCR-om prati normalnu distribuciju.
- Razlike u genskoj ekspresiji merene su korišćenjem Student t-testa za gene sa normalnom distribucijom, dok je za ostale gene korišćen neparametrijski Mann-Whitney test.

4. REZULTATI

4.1. KARAKTERISTIKE PACIJENATA I TUMORA

U analizu je uključeno 134 bolesnica sa lokalno odmaklim, neinflamatornim karcinomom dojke, stadijuma IIIA i IIIB, kod kojih je nakon patohistološke potvrde malignog tumora sprovedena preoperativna zračna terapija dojke i regionalnih limfatika. Šest nedelja po završenoj zračnoj terapiji, kod svih bolesnica je učinjena radikalna mastektomija i primenjena adjuvantna sistemska terapija prema tada važećem protokolu za lečenje karcinoma dojke (hemioterapija i/ili hormonska terapija) (136).

Osnovne karakteristike pacijenata prikazane su na tabeli 3.

Tabela 3. Karakteristike pacijenata i tumora

	N	(%)
Broj bolesnica	134	(100)
Životna dob (godine)		
Medijana (opseg)	52.5	(34-71)
Prosek (SD)	53.4	(8.9)
≤ 50	59	(44.0)
> 50	75	(56.0)
Menopauzalni status		
Premenopauzne	58	(43.3)
Postmenopauzne	76	(56.7)
Klinički stadijum bolesti		
Stadijum III A	93	(69.4)
Stadijum III B	41	(30.6)

Nastavak tabele 3. Karakteristike pacijenta i tumora

Klinička veličina tumora (T)		
T1	4	(3.0)
T2	67	(50.0)
T3	22	(16.4)
T4	41	(30.6)
Klinički nodalni status (N)		
N0	3	(2.2)
N1	13	(9.7)
N2	118	(88.1)
PH tumora (biopsija)		
Duktalni	56	(41.8)
Lobularni	33	(24.6)
Drugo	45	(33.6)
Gradus tumora		
Grad 1	1	(0.7)
Grad 2	86	(64.2)
Grad 3	6	(4.5)
Nepoznat	41	(30.6)
Nodalni status (mastektomija)		
Negativan	23	(17.2)
Pozitivan	111	(82.8)

4.2. ODGOVOR TUMORA NA PREOPERATIVNU RT

Klinički odgovor tumora na preoperativnu RT procenjen je kao kompletna regresija tumora (cCR) kod 29/134 bolesnica (21.6%), parcijalna regresija (cPR) kod 75/134 bolesnica (56%) i stabilna bolest (cSD) kod 30/134 bolesnica (22.4%). Progresija bolesti tokom PRT nije zabeležena ni kod jedne bolesnice. Nakon učinjene mastektomije, patohistološki je pokazano da je u dojci postignuta kompletna regresija tumora kod 20/134 bolesnica (15%), dok je među njima 9/134 bolesnica (6.7%) imalo kompletnu regresiju i tumora u dojci i limfnih čvorova u aksili (tpCR). Tabela 4.

Tabela 4. Odgovor tumora na PRT

<i>Klinički odgovor</i>		<i>Patohistološki odgovor</i>	
cCR	29 (21.6%)	pCRB	20 (15.0%)
cPR	75 (56.0%)	tpCR	9 (6.7%)
cSD	30 (22.4%)	non-tpCR	124 (92.5%)
<i>ukupno</i>	134 (100%)	<i>ukupno</i>	134 (100%)

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalan odgovor; cSD: klinički stabilna bolest; pCRB: patohistološki kompletan odgovor u dojci; tpCR: totalni pCR

Takodje, posebno je radjena i patohistološka procena odgovora tumora na preoperativnu RT kod 94 bolesnica (kod preostalih 40 bolesnica procena nije mogla da se uradi zbog lošeg kvaliteta patohistološkog preparata). Patohistološka kompletna regresija tumora (pCR) registrovana je kod 12/94 bolesnica (12.8%), skoro kompletna patohistološka regresija (pNCR) kod 8/94 bolesnica (8.5%), parcijalna patohistološka regresija (pPR) kod 63/94 bolesnice (67%) i patohistološki bez promena (pNC) kod 11/94 bolesnica (11.7%).

4.3. PRIMENJENA ADJUVANTNA TERAPIJA

Kod 127/134 bolesnica (94,8%) primenjena je adjuvantna terapija, dok je 7/134 bolesnica (5,2%) bilo bez dodatne adjuvantne terapije. Samo adjuvantna hemioterapija (CMF ili FAC) primenjena je kod 71/134 bolesnice (53%), adjuvantna hormonska terapija (Tamoksifen ili Ro kastracija) kod 24/134 bolesnice (17.9%), a kod 32/134 bolesnice (23.9%) primenjena je kombinovana hemio-hormonska terapija. (Tabela 5)

Tabela 5. Vrsta adjuvantne terapije

Adj. Th	N	%
Da	127	94.8
Ne	7	5.2
Adj hemioterapija		
CMF	57	42.5
FAC	46	34.4
Adj hormonoterapija		
Tamoksifen	44	32.8
Ro kastracija	8	6.0
Tamoksifen + Ro kastracija	3	2.2

4.4. ANALIZA ISHODA BOLESTI U CELOJ GRUPI

Bolesnice su praćene od 4 do 216 meseci (medijana 74), dok je srednje vreme praćenja iznosilo 78.35 meseci. Relaps bolesti registrovan je kod 83/134 bolesnice (61.9%). Lokoregionalni relaps kao prvi relaps bolesti zabeležen je kod 10/134 bolesnica (7.5%) i to kod 4 bolesnice zabeležen je izolovani lokoregionalni recidiv, a kod 6 bolesnica razvio se istovremeno sa udaljenim metastazama. Udaljene metastaze kao prvi relaps bolesti najčešće su se javljale na visceralnim organima (pluća i jetra), kao i na kostima i često su bile lokalizovane na više organa istovremeno.

Distribucija prvog relapsa bolesti prikazana je na tabeli 6.

Tabela 6. Vrsta prvog relapsa bolesti

Vrsta relapsa	N	%
Lokoregionalni relaps:	10	7.5
Izolovani	4	3.0
Udružen sa udaljenim metastazama	6	4.5
Udaljene metastaze		
Kosti	24	17.9
Visceralni organi	25	18.6
Meka tkiva	7	5.2
CNS	3	2.2
Multipne metastaze	14	10.5

Tokom perioda praćenja 83/134 bolesnica (61,9 %) je umrlo: 67/134 (50%) od karcinoma dojke, a 16/134 (11.9%) zbog drugih propratnih bolesti.

Stope 5-godišnjeg i 10-godišnjeg ukupnog preživljavanja (OS) bile su 56% (95%CI:47-65%) i 37.8% (95%CI:29-48%), dok su stope 5-godišnjeg i 10-godišnjeg preživljavanja bez znakova bolesti (DFS) bile 39.2% (95%CI:31-48) i 27% (95%CI:19-36%). Petogodišnje i 10-godišnje stope bez relapsa bolesti (DFI) iznosile su 43.5% (CI:35-53) i 33.1% (CI:25-43). Medijana OS, DFS i DFI za celu grupu bila je 74 meseca (95% CI:53-117), 39 meseci (95%CI: 26-55) i 42 meseca (95%CI:31-67).

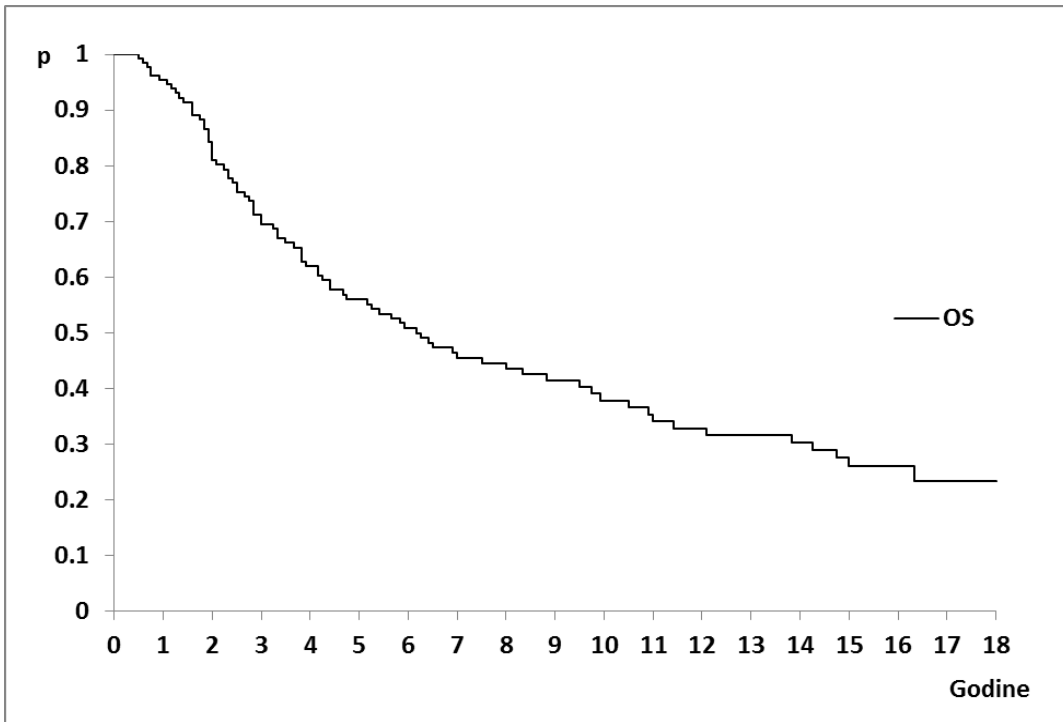
Ovi rezultati su prikazani na tabeli 7 i grafikonima 1 i 2.

Tabela 7. OS, DFS i DFI za celu grupu pacijenata

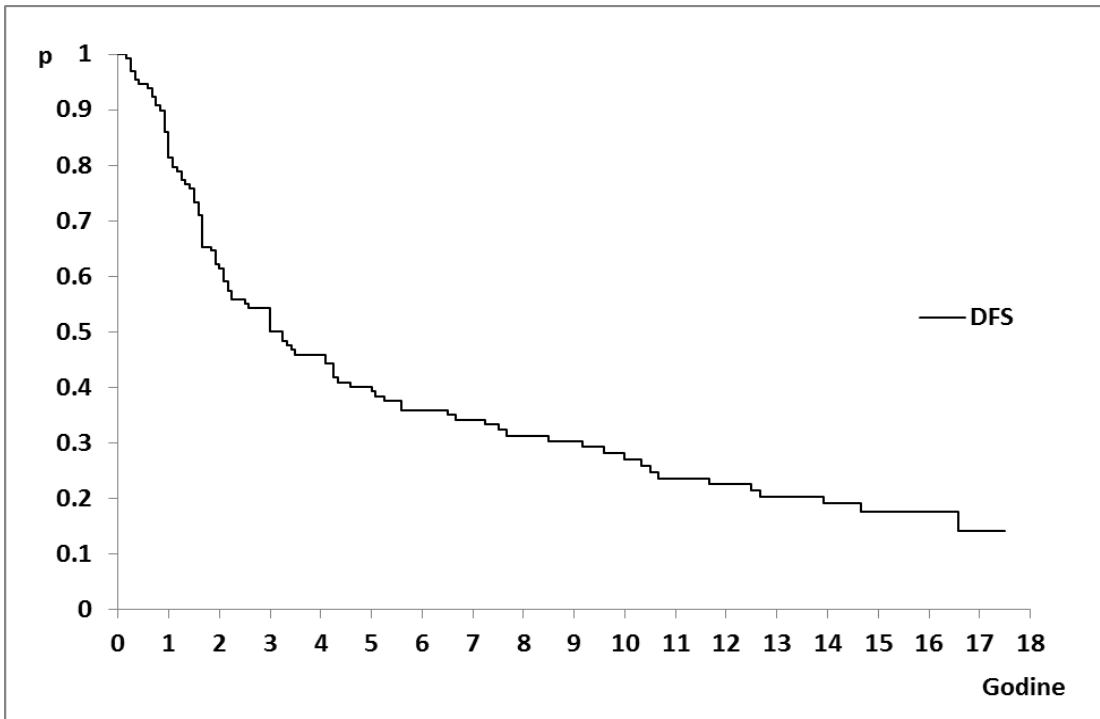
N	Medijana*, u mesecima, sa 95%CI		
	OS	DFS	DFI
134	74 (53-117)	39 (26-55)	42 (31-67)

OS: ukupno preživljavanje; DFS:preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N:broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

**Medijana po metodi Analize preživljavanja (Survival Analysis)*



Grafikon 1. Ukupno preživljavanje (OS) za celu gupu



Grafikon 2. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) za celu gupu

4.5. ANALIZA ISHODA BOLESTI PREMA KLINIČKOM ODGOVORU TUMORA U DOJCI NA PREOPERATIVNU RT

Posebno je analizirano ukupno preživljavanje (OS), preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) i vreme do pojave relapsa bolesti (DFI) u odnosu na klinički odgovor tumora na preoperativnu RT. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 8a.

Tabela 8a. OS, DFS i DFI prema kliničkom odgovoru tumora na PRT

Klinički odgovor na PRT	N	Medijana*, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
cCR	29	145 (>70)		110 (>36)		167 (>36)	
cPR	75	65 (46-90)	$\chi^2_2=6.538$ p=0.038	31 (24-51)	$\chi^2_2=5.223$ p=0.073	39 (25-63)	$\chi^2_2=4.718$ p=0.094
cSD	30	71 (34-171)		39 (20-78)		55 (20-102)	

*OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; PRT: preoperativna radioterapija; N: broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja; *Medijana po metodi Analize preživljavanja (Survival Analysis)*

Dodatnim testiranjem parova kategorija, dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 8b.

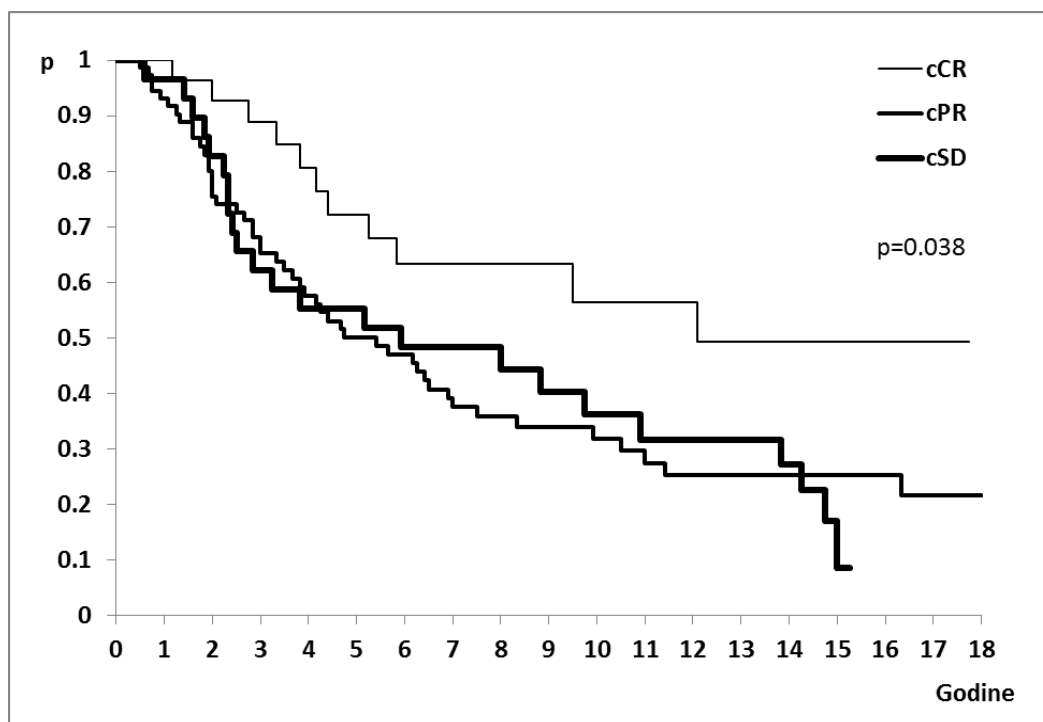
Tabela 8b. Rezultati testiranja vrednosti OS, DFS i DFI između parova kategorija

Parovi kategorija kliničkog odgovora na PRT	Log-rank test		
	OS	DFS	DFI
cCR vs cPR	$\chi^2_1=5.692$; p*=0.017	$\chi^2_1=4.045$; p*=0.044	$\chi^2_1=3.721$; p*=0.053
cCR vs cSD	$\chi^2_1=5.658$; p*=0.017	$\chi^2_1=4.522$; p*=0.033	$\chi^2_1=3.904$; p*=0.048
cPR vs cSD	$\chi^2_1=0.034$; p*=0.854	$\chi^2_1=0.191$; p*=0.662	$\chi^2_1=0.123$; p*=0.725

**Bonferroni korekcija: 0.05/3=0.0167*

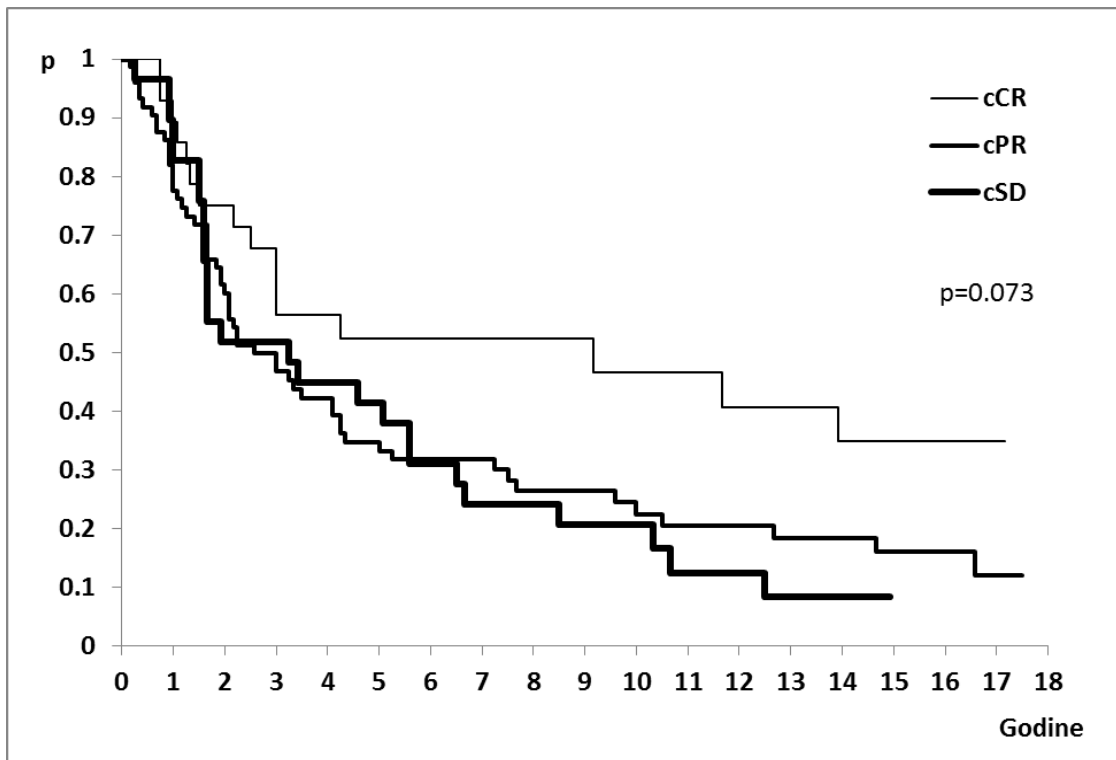
Bolesnice koje su imale klinički kompletnu regresiju tumora (cCR) imale su najbolje ukupno preživljavanje, što je, u poredjenju sa bolesnicama kod kojih nije bila postignuta cCR, bilo i statistički značajno (Tabela 8a, Tabela 8b i Grafikon br 3).

Stope 10-godišnjeg preživljavanja kod bolesnica sa cCR, cPR i cSD iznosile su 56.3% (95%CI: 38-82%), 31.8% (95%CI: 22-45%) i 36.2% (95%CI: 22-59%).



Grafikon 3. Ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na klinički odgovor tumora na PRT

Medjutim, u pogledu DFS nije bilo statistički značajne razlike prema kliničkom odgovoru tumora na PRT (Tabela 6a, Tabela 6b i Grafikon 4), mada postoji razdvajanje kriva nakon 5 godina praćenja. Stopa 10-godišnjeg DFS u grupi cCR bila je 46.5% (95%CI: 30-71%), u odnosu na cPR [22.4% (95%CI: 14-35%)] i cSD [20.7% (95%CI: 10-42%)].



Grafikon 4. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na klinički odgovor tumora na PRT

Bolesnice koje su imale kompletan klinički odgovor tumora na preoperativnu RT imale su značajno duži OS i trenda ka dužem DFS i DFI (tabela 8a, 8b).

4.6. ANALIZA ISHODA BOLESTI PREMA PATOHISTOLOŠKOJ PROCENI ODGOVORA TUMORA NA PRT

Kod 94 bolesnice radjena je patohistološka procena odgovora tumora u dojci na preoperativnu RT (kod preostalih 40 nije uradjeno iz tehničkih razloga).

Patohistološki kompletan odgovor tumora (pCR) registrovan je kod 12/94 bolesnica (12.8%), dok je skoro kompletna regresija (pNCR) zabeležena kod 8/94 bolesnica (8.5%). Patohistološka parcijalna regresija (pPR) se javila kod 63/94 bolesnice (67%), dok kod 11/94 bolesnica (11.7%) nije bilo promena u tumoru na dejstvo preoperativne RT (pNC).

Analizirano je ukupno preživljavanje (OS), preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) i vreme do pojave relapsa bolesti (DFI) u odnosu na patohistološku procenu odgovora tumora u dojci na preoperativnu RT. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 9a.

Tabela 9a. OS, DFS i DFI prema patohistološkoj proceni odgovora tumora u dojci na preoperativnu RT

PH odgovor na PRT	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
pCR+pNCR	20	114 (>46)		39 (>31)		ND [#]	
pPR	63	68 (47-106)	$\chi^2_2=5.758$ p=0.056	27 (24-60)	$\chi^2_2=5.185$ p=0.074	36 (24-60)	$\chi^2_2=4.652$ p=0.097
pNC	11	24 (>15)		18 (>11)		199 (>18)	

*Medijana po metodi Analize preživljavanja (Survival Analysis) ; [#] Medijana nije dostignuta

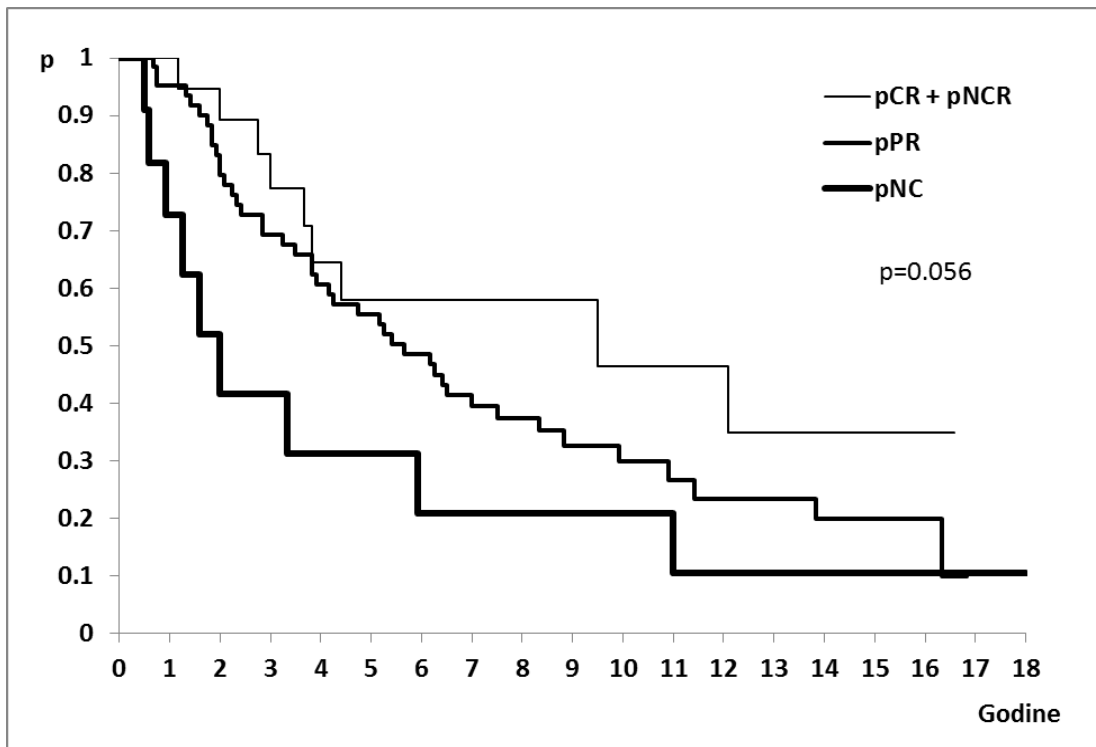
Dodatnim testiranjem parova kategorija, dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 9b.

Tabela 9b. Rezultati testiranja vrednosti OS, DFS i DFI između parova kategorija

Parovi kategorija PH odgovora na PRT	Log-rank test		
	OS	DFS	DFI
pCR+pNCR vs pPR	$\chi^2_1=1.913$; p*=0.166	$\chi^2_1=3.097$; p*=0.078	$\chi^2_1=4.262$; p*=0.038
pCR+pNCR vs pNC	$\chi^2_1=5.475$; p*=0.019	$\chi^2_1=4.049$; p*=0.044	$\chi^2_1=0.083$; p*=0.773
pPR vs pNC	$\chi^2_1=2.676$; p*=0.101	$\chi^2_1=1.371$; p*=0.241	$\chi^2_1=0.812$; p*=0.367

*Bonferroni korekcija: $0.05/3=0.0167$

Analiziranjem ukupnog preživljavanja (OS) kod ovih bolesnica (bolesnice sa pCR i pNCR su spojene) nije bilo statistički značajne razlike između onih koje su imale potpunu ili skoro potpunu patohistološku regresiju i onih sa parcijalnom regresijom, odnosno bolesnica procenjenih kao pNC, ali postoji trend ka dužem preživljavanju bolesnica sa pCR + pNCR u odnosu na druge dve grupe (Tabela 9a, 9b i Grafikon 5).

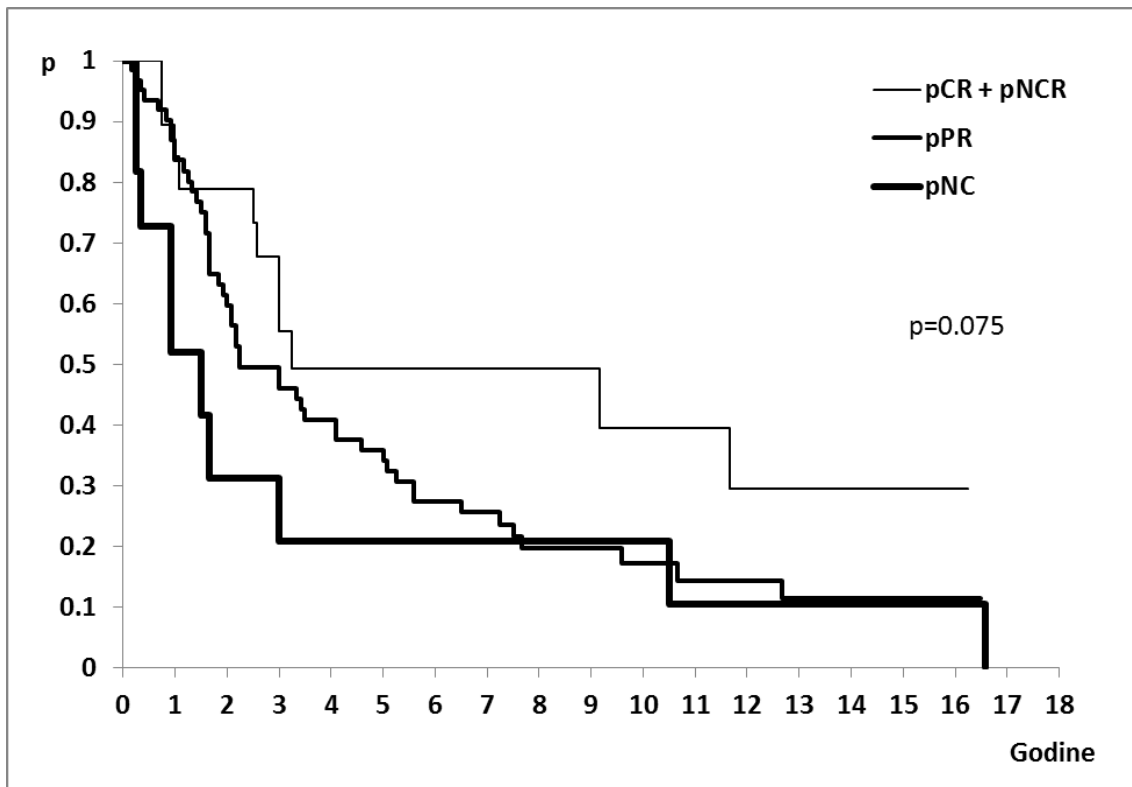


Grafikon 5. Ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na patohistološki odgovor tumora na PRT

Stope 10-godišnjeg ukupnog preživljavanja bile su 46.4% (95%CI: 25-84%) u grupi sa pCR + pNCR, u grupi sa pPR 29.9% (95%CI: 19-45%) i u grupi sa pNC 20.8% (95%CI: 6-70%).

Stope 10-godišnjeg preživljavanja bez relapsa bolesti bile su u grupi bolesnica koje su imale pCR + pNCR 39.4% (95%CI:20-75%), u grupi sa pPR 17.2% (95%CI: 9-31%) i u grupi sa pNC 20.8% (95%CI: 6-70%).

Na grafikonu 6 prikazano je preživljavanje bez znakova bolesti u odnosu na patohistološki odgovor na radioterapiju, gde takodje nije zabeležena statistički značajna razlika (Tabela 9a, 9b).



Grafikon 6. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na patohistološki odgovor tumora na PRT

I prilikom analize DFI nije pokazana statistički značajna razlika u odnosu na patohistološku procenu odgovora tumora na PRT (Tabela 9a, 9b)

Medjutim, na tabeli 9a se može videti da postoji trend ka znatno dužem preživljavanju bolesnica koje su imale pCR + pNCR u odnosu na bolesnice sa pPR i pNC, kao i dužeg preživljavanje bez relapsa bolesti i dužeg slobodnog intervala.

Kada smo razdvojili bolesnice sa pCR (12 bolesnica) i bolesnice sa pNCR (8 bolesnica) prilikom analize OS, DFS i DFI, takodje nije dobijena statistički značajna razlika (Tabele 10a i 10b i grafikoni 7 i 8) mada, bolesnice koje su imale pCR imaju duže OS, DFS i DFI u odnosu na ostale bolesnice .

Tabela 10a. OS, DFS i DFI prema patohistološkom odgovoru tumora na PRT

Patohistološki odgovor na PRT	N	Medijana*, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
pCR	12	114 (>53)		110 (>36)		ND [#]	
pNCR	8	44 (>33)	$\chi^2_3=6.667$	39 (>31)	$\chi^2_3=5.397$	39 (>31)	$\chi^2_3=5.059$
pPR	63	68 (47-106)	p=0.083	27 (24-60)	p=0.14	36 (24-60)	p=0.17
pNC	11	24 (>15)		18 (>11)		199 (>18)	

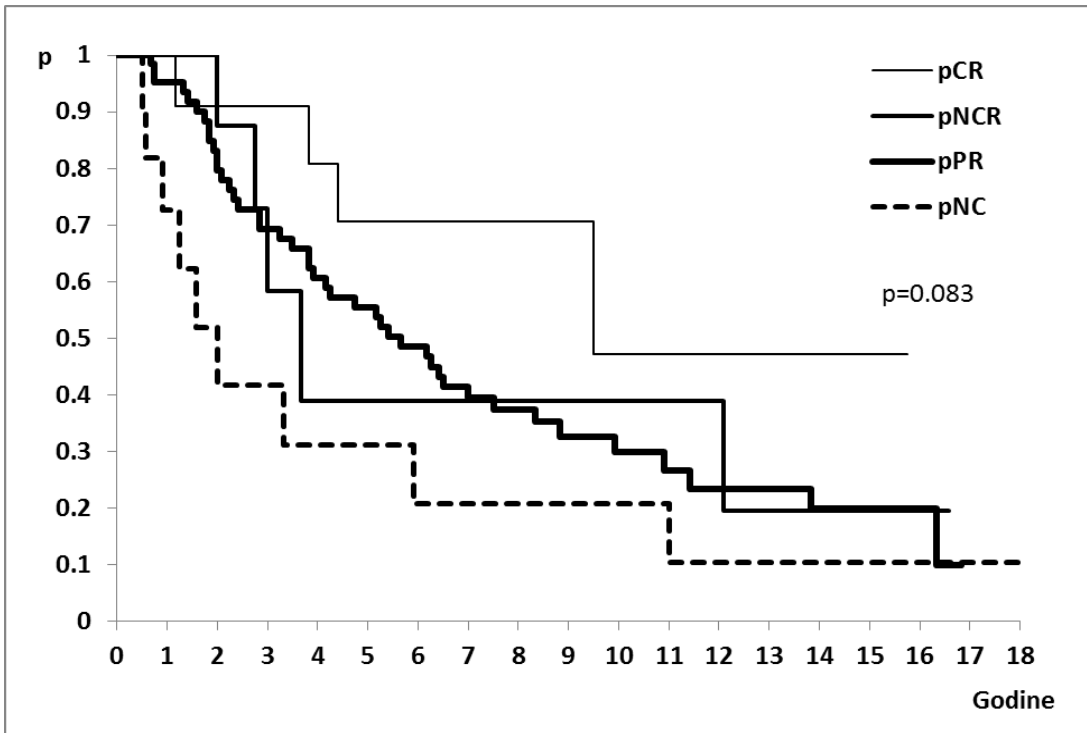
*Medijana po metodi Analize preživljavanja (Survival Analysis) ; [#] Medijana nije dostignuta

Dodatnim testiranjem parova kategorija, dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 10b.

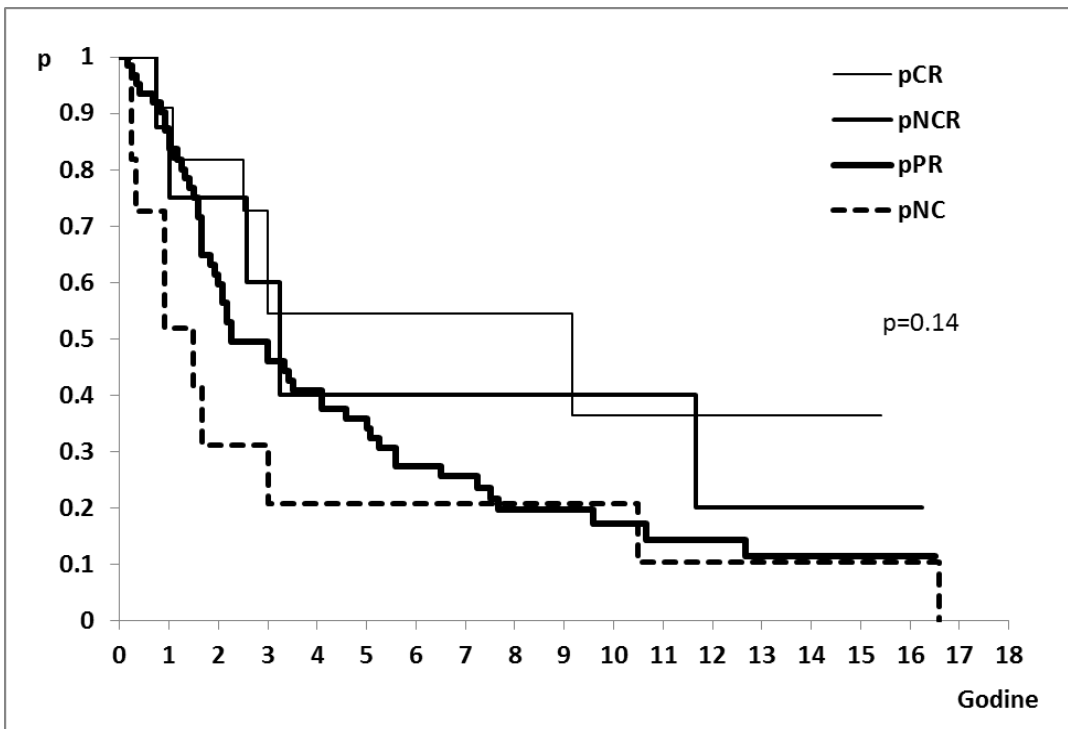
Tabela 10b. Rezultati testiranja vrednosti OS, DFS i DFI između parova kategorija

Parovi kategorija patohistološkog odgovora na PRT	Log-rank test		
	OS	DFS	DFI
pCR vs pNCR	$\chi^2_1=1.699$; p*=0.192	$\chi^2_1=0.293$; p*=0.588	$\chi^2_1=0.77$; p*=0.378
pCR vs pPR	$\chi^2_1=2.78$; p*=0.095	$\chi^2_1=2.982$; p*=0.084	$\chi^2_1=4.323$; p*=0.037
pCR vs pNC	$\chi^2_1=5.38$; p*=0.02	$\chi^2_1=3.441$; p*=0.063	$\chi^2_1=0.286$; p*=0.592
pNCR vs pPR	$\chi^2_1=0.031$; p*=0.86	$\chi^2_1=0.596$; p*=0.44	$\chi^2_1=0.695$; p*=0.404
pNCR vs pNC	$\chi^2_1=1.604$; p*=0.205	$\chi^2_1=1.768$; p*=0.183	$\chi^2_1=0.018$; p*=0.893
pPR vs pNC	$\chi^2_1=2.676$; p*=0.102	$\chi^2_1=1.371$; p*=0.242	$\chi^2_1=0.812$; p*=0.367

*Bonferroni korekcija: $0.05/6=0.0083$



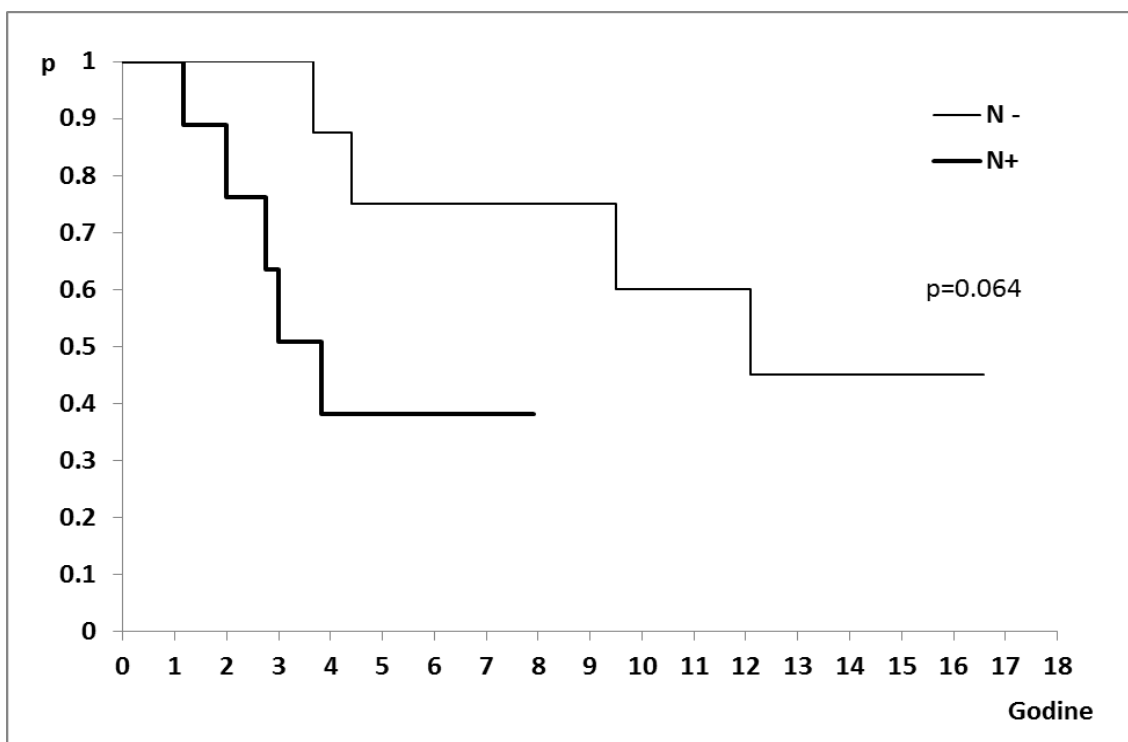
Grafikon 7. Ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na patohistološki odgovor tumora na PRT



Grafikon 8. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na patohistološki odgovor tumora na PRT

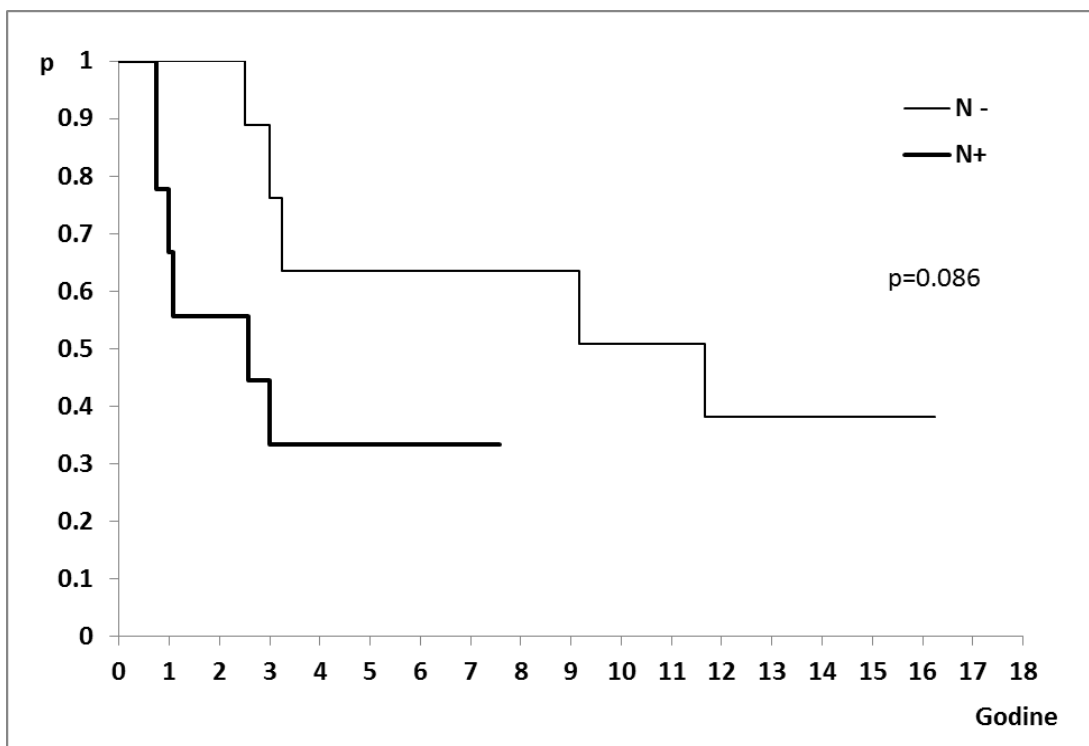
Posebno je analizirana podgrupa od 20 bolesnica koja je imala kompletnu (pCR) i skoro kompletnu (pNCR) patohistološku regresiju tumora u odnosu na nodalni status. U toj podgrupi bio je jednaki broj nodus negativnih (pCR+pNCR/N0) i nodus pozitivnih bolesnica (pCR+pNCR/N+), po 10 bolesnica u svakoj podgrupi.

Na grafikonu 9 prikazano je ukupno preživljavanje ovih bolesnica. Nije bilo statistički značajne razlike izmedju pCR+pNCR/N0 i pCR+pNCR/N+ bolesnica (Log-Rank test, $p = 0.064$). Medjutim, stopa 5-godišnjeg preživljavanja u nodus negativnoj podgrupi bolesnica bila je veća od stope 5-godišnjeg preživljavanja u nodus pozitivnoj podgrupi bolesnica (75%, odnosno 38%).



Grafikon 9. Ukupno preživljavanje (OS) izmedju pCR+pNCR/N0 i pCR+pNCR/N+ bolesnica

Takodje, nije bilo statistički značajne razlike ni u pogledu DFS (Log-Rank test, $p = 0.085$, grafikon 10), niti u pogledu DFI (Log-Rank test, $p=0.15$) izmedju pCR+pNCR/N0 i pCR+pNCR/N+ bolesnica.



Grafikon 10. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) između pCR+pNCR/N0 i pCR+pNCR/N+ bolesnica

Bez obzira što nije zabeležena statistički značajna razlika, bolesnice koje su ostvarile pCR + pNCR i istovremeno su imale negativan nalaz aksilarnih limfnih čvorova, pokazivale su trend ka dužem ukupnom preživljavanju (OS) kao i preživljavanju bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na nodus pozitivne bolesnice (tabela 11).

Tabela 11. OS, DFS i DFI bolesnica koje su imale pCR + pNCR/N0 i pCR + pNCR/N+

Nodalni status	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
N 0	10	145 (>114)	$\chi^2_1=3.429$ p=0.064	140 (>39)	$\chi^2_1=2.957$ p=0.085	ND [#]	$\chi^2_1=2.05$ p=0.15
N +	10	46 (>33)		31 (>12)		36 (>13)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: slobodni interval; N0: nodus negativne; N+: nodus pozitivne; N: broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

*Medijana po metodi Analize preživljavanja (Survival Analysis) ; [#] Medijana nije dostignuta

Ishod bolesti pCR+pNCR/N0 bolesnica poredjen je sa ishodom bolesti ostalih (124) bolesnica, bez ostvarene tpCR (ne-tpCR grupa).

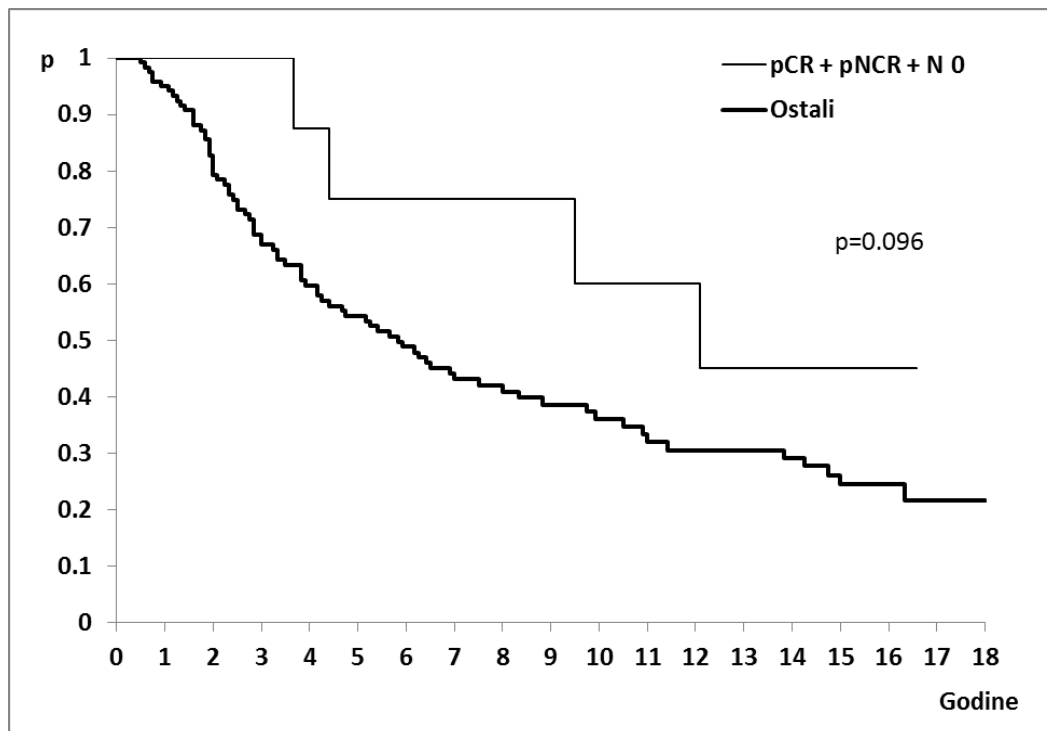
Rezultati su prikazani na tabeli 12 i grafikonima 11,12 i 13.

Table 12. OS, DFS i DFI bolesnica koje su imale pCR+pNCR/N0 i ne-tpCR bolesnica

Patohistološki odgovor tumora na PRT	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
pCR+pNCR+N0	10	145 (>114)	$\chi^2_1=2.775$	140 (>39)	$\chi^2_1=3.641$	ND [#]	$\chi^2_1=4.567$
non-pCR	124	70(50-106)	p=0.096	36(24-51)	p=0.056	41(26-67)	p=0.033

OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N: broj pacijenata 95%CI: 95% interval poverenja;

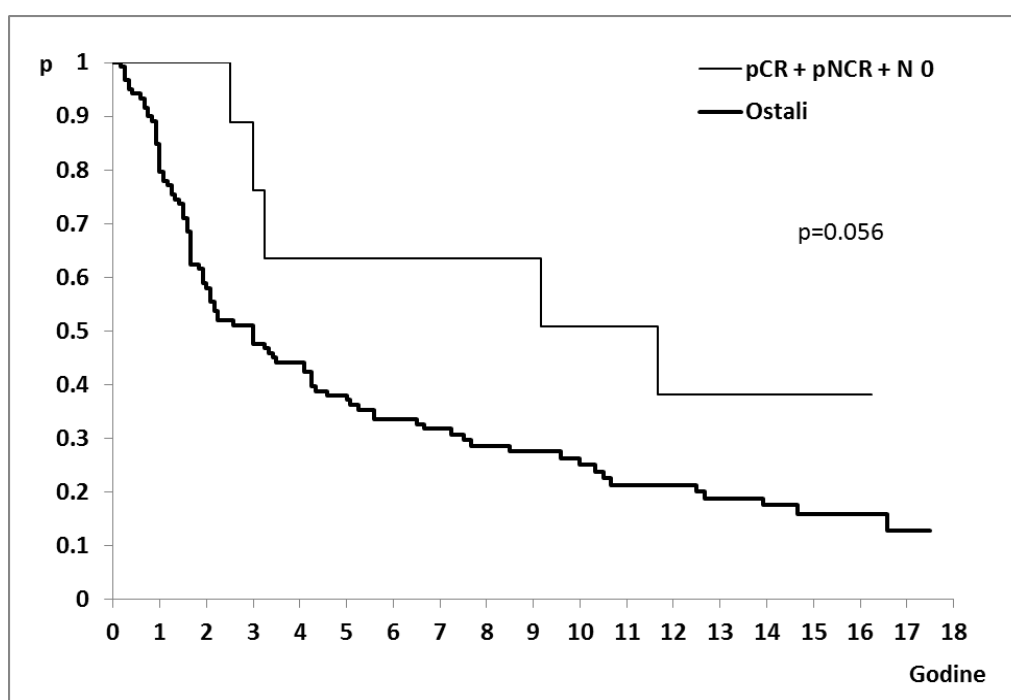
*Medijana po metodi Analize preživljavanja (Survival Analysis) ; # Medijana nije dostignuta



Grafikon 11. Ukupno preživljavanje (OS) izmedju pCR+pNCR/N0 i ne-tpCR bolesnica

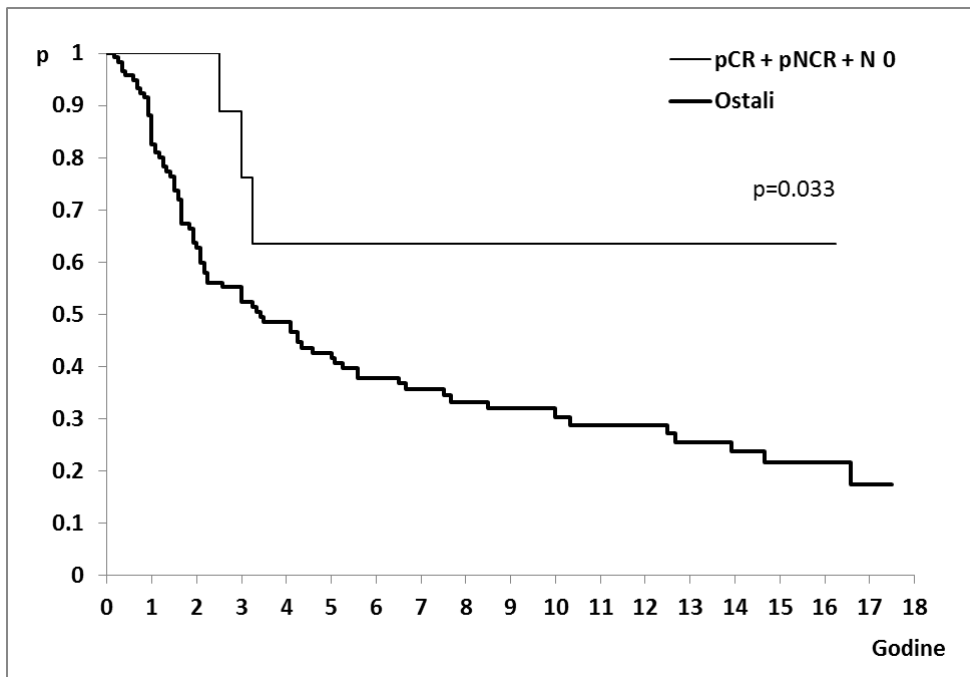
Iako je preživljavanje pCR + pNCR/N0 bolesnica bilo numerički bolje u poređenju sa ostalim bolesnicama, ova razlika nije bila statistički značajna (Tabela 12). Stope 10-godišnjeg OS bile su 60% (95%CI: 33-100%), odnosno 36% (95% CI: 27-46%).

Nije dobijena statistički značajna razlika u DFS izmedju pCR+pNCR/N0 bolesnica i ne-tpCR bolesnica, ali postoji trend ka dužem DFS bolesnica sa pCR+pNCR/N0 (Tabela 12, grafikon 12). Stopa 10-godišnjeg DFS bila je kod bolesnica sa pCR+pNCR/N0 50.8% (95%CI: 25-100%), a kod ne-tpCR bolesnica 25.1% (95%CI: 18-34%).



Grafikon 12. Preživljavanje bez relapsa bolesti (DFS) izmedju pCR+pNCR/N0 i ne-tpCR bolesnica

Medjutim, zabeležena je statistički značajna razlika u pogledu DFI izmedju bolesnica sa pCR+pNCR/N0 u poređenju sa ne-tpCR bolesnicama (Tabela 12, grafikon 13). Stopa 10-godišnjeg DFI bila je kod bolesnica sa pCR+pNCR/N0 63.5% (95%CI: 37-100%), a kod ne-tpCR bolesnica 30.3% (95%CI: 22-41%).



Grafikon 13. Vremenski interval bez bolesti (DFI) izmedju pCR+pNCR/N0 i ne-tpCR bolesnica

Generalno, bolesnice koje su imale pCR+pNCR/N0 imaju duže ukupno preživljavanje, duže preživljavanje bez relapsa bolesti i duži vremenski interval bez bolesti, što je prikazano na tabeli 12.

4.7. ANALIZA ISHODA BOLESTI PREMA PROGNOŠTIČKIM FAKTORIMA

4.7.1. Godine starosti

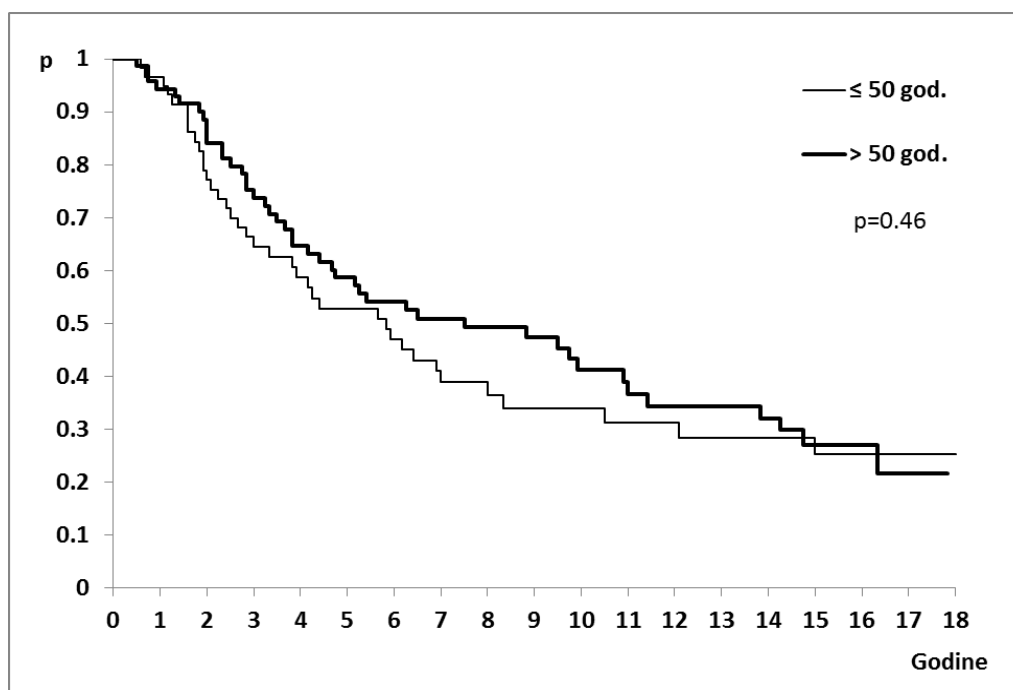
Analizirano je ukupno preživljavanje (OS), preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) i interval bez bolesti (DFI) u odnosu na godine starosti. Bolesnice su podeljene u dve kategorije: 1) do 50 godina starosti - 59/134 (44%) i 2) starije od 50 godina - 75/134 (56%) bolesnica.

Statistički nije bilo značajne razlike u pogledu ukupnog preživljavanja izmedju dve starosne kategorije bolesnica (tabela 13, grafikon 14)

Tabela 13. OS, DFS i DFI u odnosu na starost bolesnica

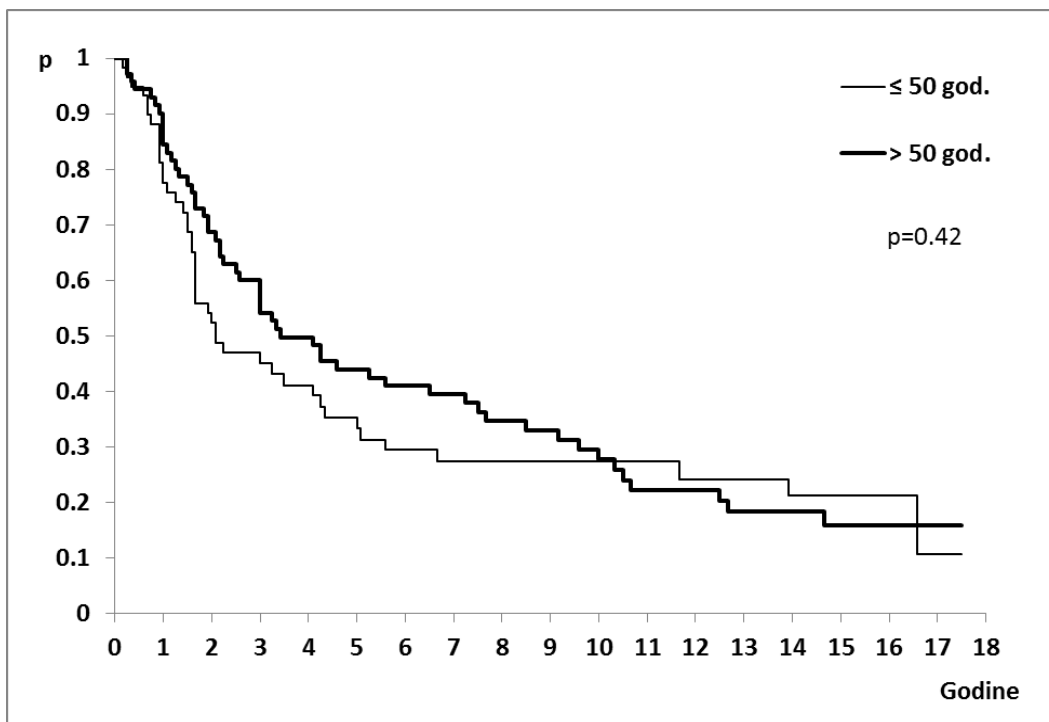
Starost	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
≤ 50 godina	59	70 (46-126)	$\chi^2_1=0.538$ p=0.46	25 (20-60)	$\chi^2_1=0.641$ p=0.42	39 (23-67)	$\chi^2_1=0.738$ p=0.39
> 50 godina	75	90 (56-137)		41 (31-90)		51 (36-120)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N: broj pacijenata 95%CI: 95% interval poverenja;



Grafikon 14. Ukupno preživljavanje (OS) bolesnica ≤ 50 i > 50 godina

Takodje, nije bilo statistički značajne razlike ni u preživljavanju bez znakova bolesti, niti u vremenu do relapsa raka dojke (DFI) izmedju dve starosne kategorije bolesnica. (Tabela 13, grafikon 15)



Grafikon 15. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) bolesnica ≤ 50 i > 50 godina

Analiziran je i klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na starosne kategorije bolesnica. Statistički nije potvrđena razlika u odnosu na odgovor tumora na PRT između bolesnica mlađih i starijih od 50 godina. (Pearson Chi-squared test, $p=0.31$) (Tabela 14).

Tabela 14. Klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na godine starosti

<i>Klinički odgovor</i>	<i>≤ 50 godina</i>	<i>>50 godina</i>	<i>Ukupno</i>
cCR	12 (20.3%)	17 (22.7%)	29 (21.6%)
cPR	37 (62.7%)	38 (50.7%)	75 (56.0%)
cSD	10 (17.0%)	20 (26.6%)	30 (22.4%)
<i>Ukupno</i>	<i>59 (100%)</i>	<i>75 (100%)</i>	<i>134 (100%)</i>

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalna odgovor; cSD: klinički stabilna bolest

4.7.2. Menopauzni status

Analizirani su ukupno preživljavanje (OS), preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) i vremenski interval bez bolesti (DFI) u odnosu na menopauzni status. Rezultati su prikazani na tabeli 15 i grafikonima 16 i 17.

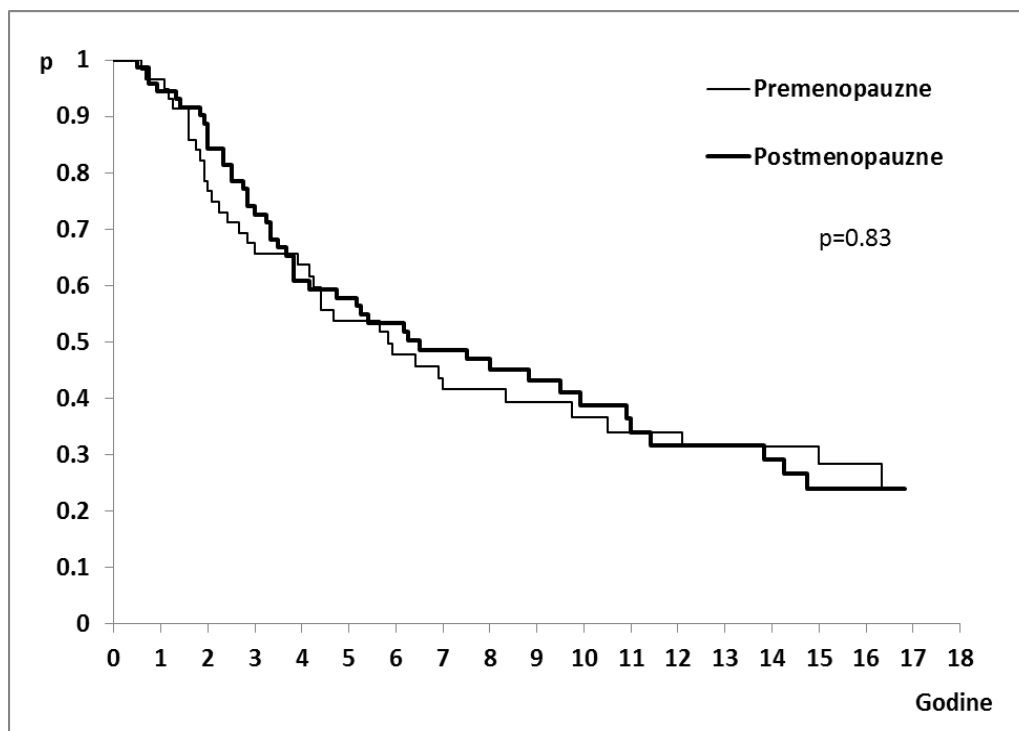
Prema menopauznom statusu bolesnice su podjeljene na dve grupe: 1) premenopauzne – 58/134 bolesnica (43.3%) i postmenopauzne – 76/134 bolesnica (56.7%).

Tabela 15. OS, DFS i DFI za pre i postmenopauzne bolesnice

Menstrualni status	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
premenopauzne	58	70 (50-145)	$\chi^2_1=0.047$	25 (20-102)	$\chi^2_1=0.274$	42 (>25)	$\chi^2_1=0.207$
postmenopauzne	76	78 (50-132)	p=0.83	39 (27-67)	p=0.6	49 (31-90)	p=0.65

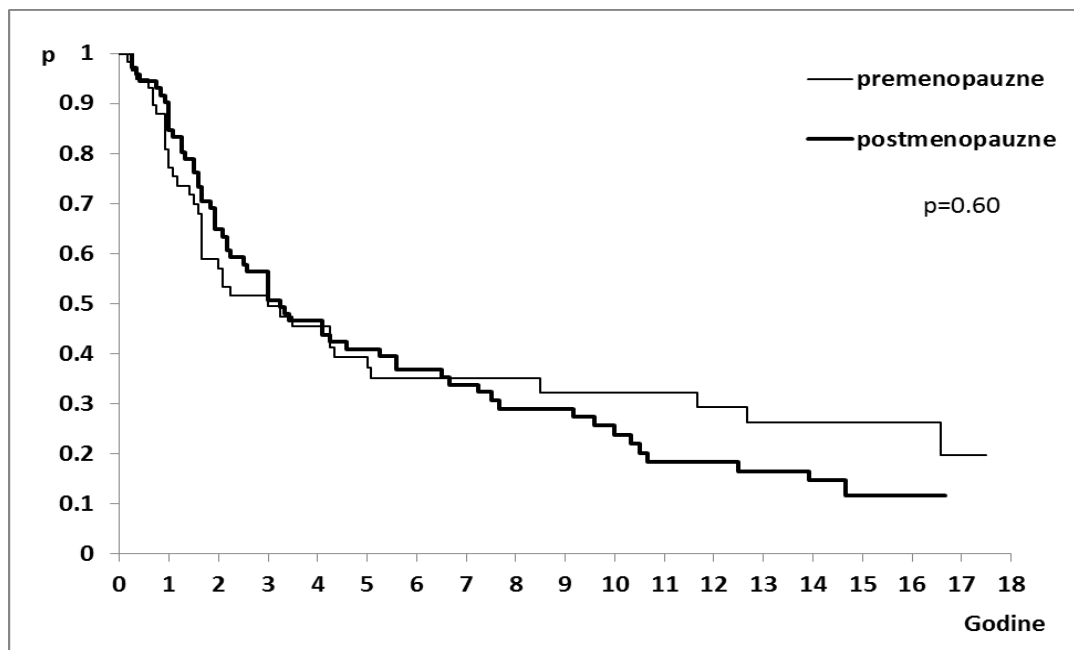
OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N: broj pacijenata 95%CI: 95% interval poverenja;

Statistički nije bilo značajne razlike u ukupnom preživljavanju (OS) između premenopauznih i postmenopauznih bolesnica (Tabela 15, grafikon 16).



Grafikon 16. Ukupno preživljavanje (OS) pre- i postmenopauznih bolesnica

Takodje nije bilo statistički značajne razlike ni u preživljavanju bez znakova bolesti izmedju pre- i postmenopauzних bolesnica (Tabela 15, Grafikon 17).



Grafikon 17. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) pre- i postmenopauzних bolesnica

Isto tako, i vremenski interval bez bolesti je bio sličan izmedju pre- i postmenopauzних bolesnica (tabela 15).

Analiziran je i klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na menopauzni status bolesnica. Potvrđena je statistički značajna razlika u kliničkom odgovoru tumora na PRT izmedju pre- i postmenopauzних bolesnica (Pearson Chi-squared test, $p=0.049$). (Tabela 16)

Najveći broj premenopauzних bolesnica (67%) imao je cPR na PRT, dok je kod postmenopauzних bolesnica cPR imalo 47%. Takodje, skoro jedna trećina postmenopauzних bolesnica (29%) imala je cSD u odnosu na premenopauzne bolesnice (14%).

Tabela 16. Klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na menopauzni status

<i>Klinički odgovor</i>	<i>premenopauzne</i>	<i>postmenopauzne</i>	<i>Ukupno</i>
cCR	11 (19%)	18 (23.7%)	29 (21.6%)
cPR	39 (67.2%)	36 (47.4%)	75 (56.0%)
cSD	8 (13.8%)	22 (28.9%)	30 (22.4%)
<i>Ukupno</i>	58 (100%)	76 (100%)	134 (100%)

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalna odgovor; cSD: klinički stabilna bolest

4.7.3. Broj pozitivnih limfnih čvorova u aksili nakon preoperativne RT i mastektomije

Analizirano je ukupno preživljavanje (OS), preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) i vremenski interval bez bolesti (DFI) u odnosu na broj pozitivnih limfnih čvorova nakon mastektomije. Bolesnice su podeljene u tri grupe: 1) nodus negativna grupa – 23/134 bolesnica (17.2%), 2) grupa sa 1-3 pozitivna aksilarna limfna čvora – 42/134 bolesnice (31.3%) i 3) grupa sa ≥ 4 pozitivna aksilarna limfna čvora – 69/134 bolesnica (51.5%).

Rezultati su prikazani na tabeli 17a

Tabela 17a. OS, DFS, DFI u grupama bolesnica podeljenih u odnosu na broj pozitivnih limfnih čvorova u aksili

Broj zahvaćenih limfnih čvorova	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
N0	23	ND [#]		199 (>67)		199 (>67)	
N1-3	42	78 (65-166)	$\chi^2_2=15.311$ p=0.0004	31 (20-102)	$\chi^2_2=13.617$ p=0.001	40 (20-120)	$\chi^2_2=12.236$ p=0.0022
N>4	69	47 (34-74)		25 (20-49)		27 (23-52)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS:preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N:broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

**Medijana po metodi Analize preživljavanja (Survival Analysis) ; # Medijana nije dostignuta*

Dodatnim testiranjem parova kategorija, dobijeni su rezultati prikazani na tabeli 17 b.

Tabela 17b Rezultati testiranja vrednosti OS, DFS i DFI između parova kategorija

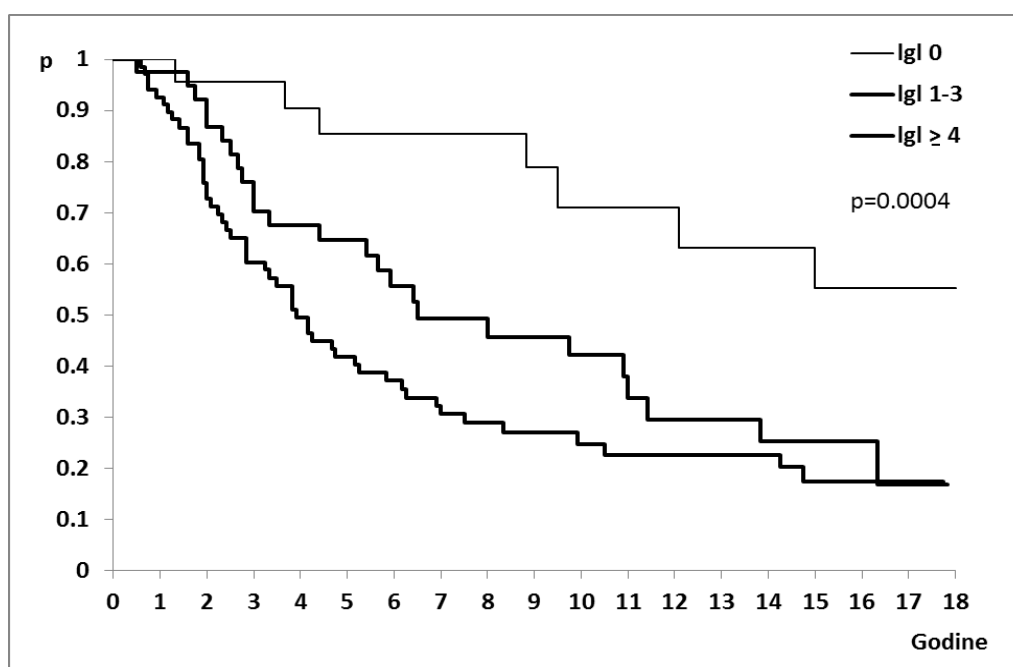
Parovi kategorija prema broju zahvaćenih limfnih čvorova	Log-rank test		
	OS	DFS	DFI
N0 vs N1-3	$\chi^2_1=7.217$; $p^*=0.007$	$\chi^2_1=9.487$; $p^*=0.002$	$\chi^2_1=8.135$; $p^*=0.004$
N0 vs $N \geq 4$	$\chi^2_1=14.024$; $p^*=0.0002$	$\chi^2_1=13.341$; $p^*=0.0002$	$\chi^2_1=12.129$; $p^*=0.0005$
N1-3 vs $N \geq 4$	$\chi^2_1=2.536$; $p^*=0.111$	$\chi^2_1=0.527$; $p^*=0.468$	$\chi^2_1=0.522$; $p^*=0.47$

*Bonferroni korekcija: $0.05/3=0.0167$

Statističkom analizom pokazana je značajna razlika u pogledu ukupnog preživljavanja između analiziranih grupa bolesnika (Tabela 17a, grafikon 18)

Desetogodišnja stopa preživljavanja bolesnika u nodus negativnoj grupi bila je 71% (95%CI: 51-97%), bolesnika u grupi sa 1-3 pozitivna limfna čvora 42.2% (95%CI: 28-63%), a u grupi sa ≥ 4 pozitivna limfna čvora 24.7% (95%CI: 15-38%).

Dodatnim testiranjem između parova opisanih grupa, pokazano je da postoji statistički značajna razlika između bolesnika u nodus negativnoj grupi i grupi sa 1-3 pozitivna limfna čvora i između bolesnika u nodus negativnoj i grupi sa ≥ 4 pozitivna limfna čvora. Između grupe bolesnika sa 1-3 pozitivna limfna čvora i bolesnika sa ≥ 4 pozitivna limfna čvora nije bilo statistički značajne razlike (Tabela 17b).

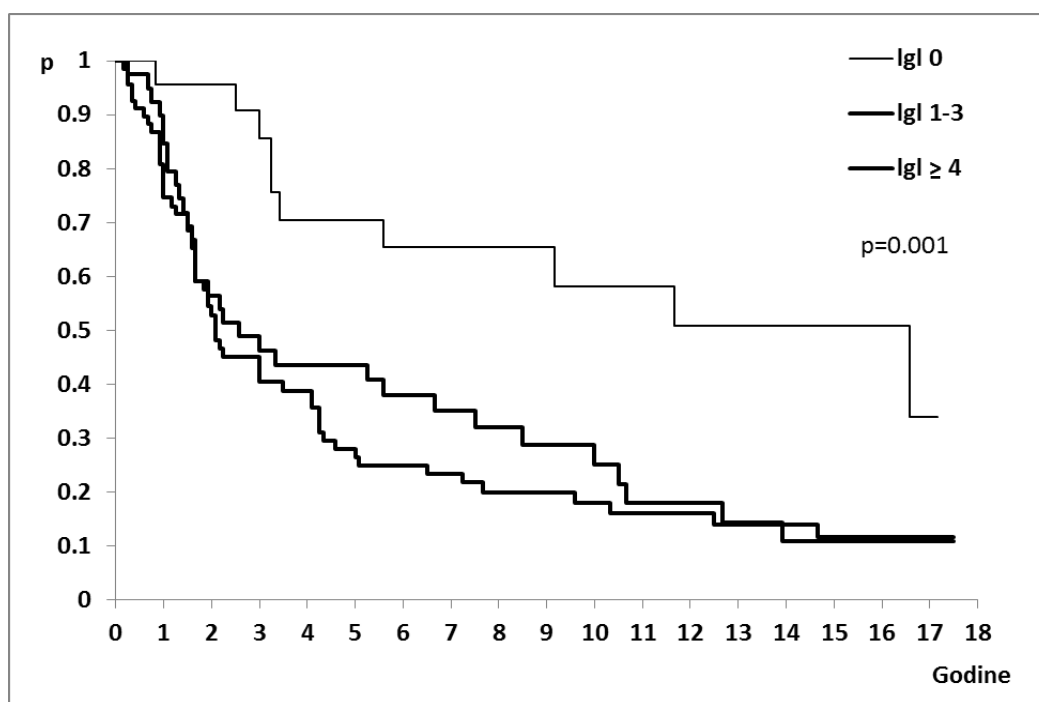


Grafikon 18. Ukupno preživljavanje (OS) između grupa bolesnika podjeljenih u odnosu na broj pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova

Zabeležena je statistički značajna razlika i u preživljavanju bez znakova bolesti između analiziranih grupa bolesnica (Tabela 17a, grafikon 19)

Desetogodišnja stopa preživljavanja bez znakova bolesti bolesnica u nodus negativnoj grupi (pN0) bila je 58.2% (95%CI: 39-86%), bolesnica sa 1-3 pozitivna limfna čvora 25.1% (95%CI: 14-44%), a bolesnica sa ≥ 4 pozitivna limfna čvora 17.9% (95%CI: 10-30%).

Dodatnim testiranjem između parova opisanih grupa pokazano je da postoji statistički značajna razlika između bolesnica nodus negativne grupe i bolesnica grupe sa 1-3 pozitivna limfna čvora i između bolesnica nodus negativne grupe i grupe sa ≥ 4 pozitivna limfna čvora. Između bolesnica sa 1-3 pozitivna limfna čvora i bolesnica sa ≥ 4 pozitivna limfna čvora nije bilo statistički značajne razlike (Tabela 17b).

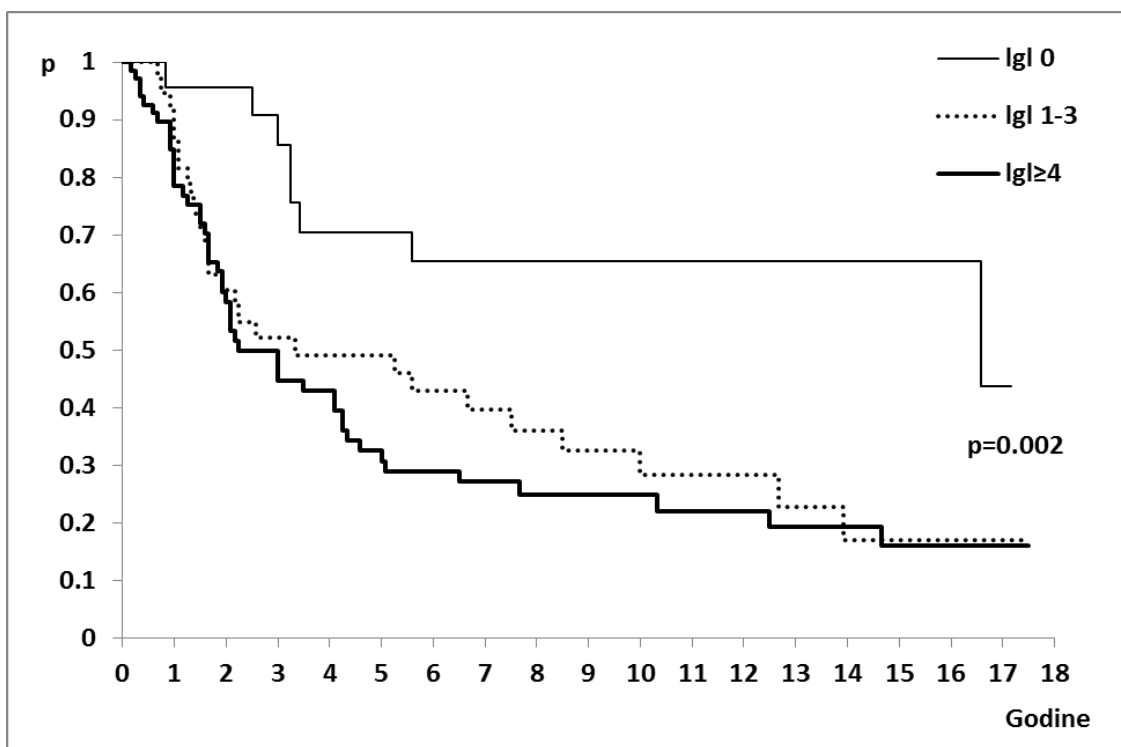


Grafikon 19. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u grupama bolesnica podeljenih u odnosu na broj pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova

Analizom vremenskog intervala bez bolesti (DFI) dobijena je statistički značajna razlika u odnosu na broj zahvaćenih limfnih čvorova (Tabela 17a, grafikon 20)

Desetogodišnji DFI za bolesnice u nodus negativnoj grupi bio je 65.5% (95%CI:47-89%), u grupi sa 1-3 pozitivna limfna čvora 28.4% (95%CI:16-49%) i u grupi sa ≥ 4 pozitivna limfna čvora 24.8% (95%CI: 15-39%).

Dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa pokazano je da postoji statistički značajna razlika izmedju bolesnica nodus negativne grupe i grupe sa 1-3 pozitivna limfna čvora i izmedju bolesnica nodus negativne grupe i bolesnica sa ≥ 4 pozitivna limfna čvora. Izmedju bolesnica sa 1-3 pozitivna limfna čvora i bolesnica sa ≥ 4 pozitivna limfna čvora nije bilo statistički značajne razlike (Tabela 17b).



Grafikon 20. Vremenski interval bez bolesti (DFI) u grupama bolesnica podeljenih u odnosu na broj pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova

Bolesnice nodus negativne grupe imaju statistički značajno duže OS, DFS i DFI u poredjenju sa bolesnicama sa 1-3 pozitivna aksilarna limfna čvora i bolesnica sa ≥ 4 pozitivna aksilarna limfna čvora (Tabela 15a i 15b).

Analiziran je i odnos kliničkog odgovora tumora na PRT i broja pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova nakon mastektomije. Nije potvrđena statistički značajna razlika u odnosu na klinički odgovor tumora na PRT i broja pozitivnih limfnih čvorova u aksili. (Pearson Chi-squared test, $p=0.24$) (Tabela 18)

Tabela 18. Klinički odgovor tumora na PRT u grupama bolesnica podeljenih u odnosu na broj pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova

<i>Klinički odgovor tumora u dojci</i>	<i>N0</i>	<i>N1-3</i>	<i>N>4</i>	<i>Ukupno</i>
cCR	9 (39.1%)	8 (19.1%)	12 (17.4%)	29 (21.6%)
cPR	9 (39.1%)	25 (59.5%)	41 (59.4%)	75 (56.0%)
cSD	5 (21.8%)	9 (21.4%)	16 (23.2%)	30 (22.4%)
<i>Ukupno</i>	23 (100%)	42 (100%)	69 (100%)	134 (100%)

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalna odgovor; cSD: klinički stabilna bolest

4.7.4. Veličina rezidualnog tumora u dojci nakon PRT

Analizirani su OS, DFS i DFI u odnosu na veličinu rezidualnog tumora nakon PRT. Bolesnice su podeljene u tri grupe: 1) grupa bez rezidualnog tumora - postignut pCR ili prisutni samo mikroskopski fokusi tumora čija veličina nije mogla da se odredi – 29/134 bolesnica (21.6%), 2) grupa sa rezidualnim tumorom do 20 mm – 35/134 bolesnica (26.1%) i 3) grupa sa veličinom tumora > 20 mm – 44/134 (32.8%) bolesnice. Kod 26 bolesnica (19.4%) koje su imale rezidualni tumor, veličina tumora nije mogla biti određena.

Rezultati su prikazani na tabelama 19a i 19b.

Tabela 19a. OS, DFS i DFI u grupama bolesnica podeljenih prema veličini rezidualnog tumora nakon PRT

Veličina rezidualnog tumora	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
Bez tumora	29	145 (>70)		110 (>36)		167 (>36)	
Tu do 20 mm	35	83 (>50)	$\chi^2=9.338$ p=0.009	40 (25-176)	$\chi^2=8.762$ p=0.01	40 (>25)	$\chi^2=5.504$ p=0.064
Tu > 20 mm	44	56 (30 - 117)		36 (20-61)		49 (23-90)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N: broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

Dodatnim testiranjem parova kategorija dobijeni su rezulteti prikazani u tabeli 19b.

Tabela 19b. Rezultati testiranja vrednosti OS, DFS i DFI između parova kategorija

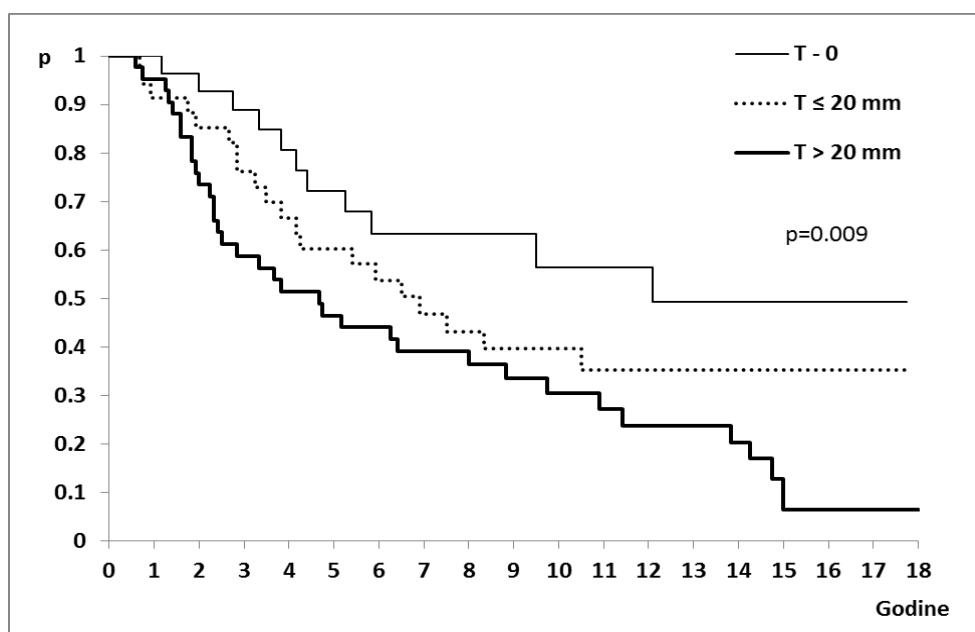
Parovi kategorija prema veličini rezidualnog tumora	Log-rank test		
	OS	DFS	DFI
Bez Tu vs Tu <20 mm	$\chi^2_1=1.736$; $p^*=0.188$	$\chi^2_1=0.812$; $p^*=0.367$	$\chi^2_1=1.567$; $p^*=0.21$
Bez Tu vs Tu >20 mm	$\chi^2_1=9.158$; $p^*=0.002$	$\chi^2_1=8.004$; $p^*=0.005$	$\chi^2_1=5.725$; $p^*=0.017$
Tu< 20mm vs Tu>20mm	$\chi^2_1=3.035$; $p^*=0.081$	$\chi^2_1=3.82$; $p^*=0.051$	$\chi^2_1=1.32$; $p^*=0.251$

*Bonferroni korekcija: $0.05/3=0.0167$

Statističkom analizom pokazana je značajna razlika u OS između analiziranih grupa bolesnica podeljenih prema veličini rezidualnog tumora u dojci nakon PRT (Tabela 19a, grafikon 21)

Desetogodišnja stopa preživljavanja u grupi bolesnica bez rezidualnog tumora u dojci bila je 56.3% (95%CI: 38-82%), u grupi bolesnica sa tumorom do 20 mm 39.6% (95%CI: 25-61%) i u grupi sa rezidualnim tumorom > 20 mm - 30.5% (95%CI:19-49%).

Dodatnim testiranjem između parova opisanih grupa pokazano je da postoji statistički značajna razlika između bolesnica koje nisu imale rezidualni tumor i onih sa rezidualnim tumorom većim od 20 mm (Tabela 19b). Testiranjem između ostalih parova nije dobijena statistički značajna razlika.

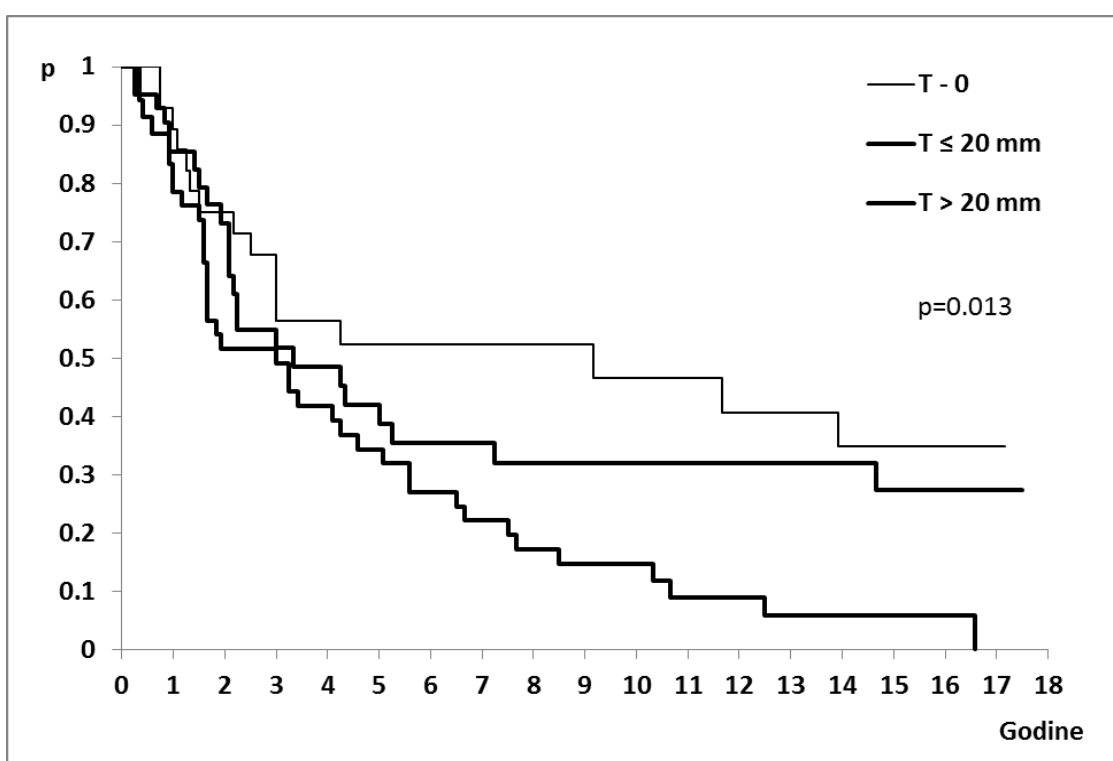


Grafikon 21. Ukupno preživljavanje (OS) u grupama bolesnica podeljenih prema veličini rezidualnog tumora nakon PRT

Takodje je postojala statistički značajna razlika i u DFS izmedju analiziranih grupa bolesnica podeljenih prema veličini rezidualnog tumora nakon PRT (Tabela 19a, Grafikon 22)

Desetogodišnja stopa DFS za bolesnice bez rezidualnog tumora dojci bila je 46.5% (95%CI: 30-71%), kod bolesnica sa tumorima do 20 mm 10-godišnja stopa preživljavanja bila je 32% (95%CI: 19-53%), a kod bolesnica sa rezidualnim tumorom > 20 mm 14.7% (95% CI: 7-30%).

Dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa pokazano je da postoji statistički značajna razlika samo izmedju bolesnica koje nisu imale merljivi rezidualni tumor i onih sa rezidualnim tumorom > 20 mm (Tabela 19b).

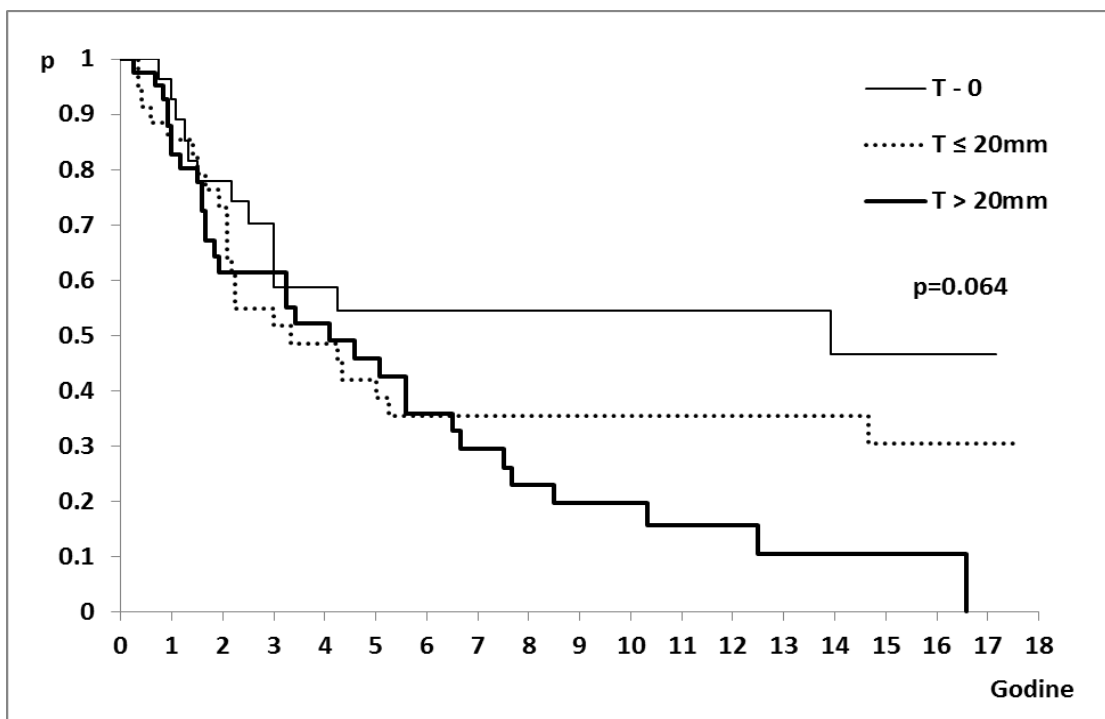


Grafikon 22. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u grupama bolesnica podeljenih prema veličini rezidualnog tumora nakon PRT

Analizom DFI nije dobijena statistički značajna razlika u odnosu na veličinu rezidualnog tumora nakon PRT, mada postoji trend dužeg vremenskog intervala bez bolesti bolesnica koje su bile bez merljivog rezidualnog tumora (Tabela 19a, Grafikon 23)

Medutim, dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa pokazano je da postoji razlika koja je na granici statističke značajnosti izmedju bolesnica koje nisu imale rezidualni tumor i onih sa rezidualnim tumorom > 20 mm (tabela 19b).

Bolesnice bez rezidualnog tumora u dojci nakon PRT imale su statistički znatno duže OS i DFS, dok je postojao trend ka dužem DFI (Tabela 19a).



Grafikon 23. Vremenski interval bez bolesti (DFI) u grupama bolesnica podjeljenih prema veličini rezidualnog tumora nakon PRT

Analiziran je klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na veličinu rezidualnog tumora nakon PRT. Statistički nije potvrđena razlika u odnosu na klinički odgovor tumora na PRT i veličine rezidualnog tumora. (Fisher Exact test, $p=1.356$) (Tabela 20)

Rezidualni tumori koji su bili manji od 20 mm u najvećem broju slučajeva (91%) su na PRT odgovorili kao cPR, dok je 61% rezidualnih tumora većih od 20 mm procenjen kao cSD.

Tabela 20. Klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na veličinu rezidualnog tumora nakon PRT

<i>Klinički odgovor</i>	<i>bez Tu</i>	<i>Tu ≤ 20mm</i>	<i>Tu > 20mm</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
cCR	29 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	29 (21.6%)
cPR	0 (0%)	32 (91.4%)	17 (38.6%)	26 (100%)	75 (56.0%)
cSD	0 (0%)	3 (8.6%)	27 (61.4%)	0 (0%)	30 (22.4%)
<i>Ukupno</i>	29 (100%)	35 (100%)	44 (100%)	26 (100%)	134 (100%)

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalna odgovor; cSD: klinički stabilna bolest; NA: nepoznato

Analiziran je klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na inicijalnu veličinu tumora. Statistički nije dobijena razlika (Fisher Exact test, $p=0.195$) (Tabela 21)

Tabela 21. Klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na inicijalnu veličinu tumora

<i>Klinički odgovor</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>Ukupno</i>
cCR	3 (75%)	16 (23.9%)	3 (13.6%)	7 (17.1%)	29 (21.6%)
cPR	1 (25%)	35 (52.2%)	12 (54.6%)	27 (65.8%)	75 (56.0%)
cSD	0 (0%)	16 (23.9%)	7 (31.8%)	7 (17.1%)	30 (22.4%)
<i>Ukupno</i>	4 (100%)	67 (100%)	22 (100%)	41 (100%)	134 (100%)

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalna odgovor; cSD: klinički stabilna bolest

Može se uočiti da 75% tumora koji su inicijalno bili manji od 2 cm (T1) imalo je klinički CR na PRT, dok je najveći procenat T2, T3 i T4 tumora imalo parcijalni odgovor na PRT.

Takodje smo analizirali i odnos inicijalne veličine tumora sa odgovorom na PRT. Statistički nije dobijena značajna razlika. (Fisher Exact test, $p=0.195$) (Tabela 22).

Od svih bolesnica sa cCR nakon PRT, najveći broj (16/29, 55%) inicijalno je imalo T2 tumore, ali 7/29 (24%) je inicijalno imalo T4 tumore.

Tabela 22. Inicijalna veličina tumora u odnosu na klinički odgovor tumora na PRT

Veličina Tu	cCR	cPR	cSD	Ukupno
T1	3 (10.3%)	1 (1.3%)	0 (0 %)	4 (3.0%)
T2	16 (55.2%)	35 (46.7%)	16 (53.4%)	67 (50%)
T3	3 (10.3%)	12 (16%)	7 (23.3%)	22 (16.4%)
T4	7 (24.1%)	27 (36%)	7 (23.3%)	41 (30.6%)
Ukupno	29 (100%)	75 (100%)	30 (100%)	134 (100%)

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalna odgovor; cSD: klinički stabilna bolest

Analizirana je inicijalna veličina tumora u odnosu na patohistološku procenu odgovora na PRT. Statistiki je dobijena razlika koja je na granici značajnosti (Fisher Exact Test, $p=0.0592$) (Tabela 23).

Od svih bolesnica sa postignutom pCR, najveći procenat je bilo sa inicijalno T2 tumorima (7/12, 58%), dok je u grupi sa postignutom pNCR najveći broj bio kod bolesnica sa T3 (4/8, 50%) i T4 (3/8, 37,5%) tumorima. U grupi bolesnica bez patohistološki zabeleženog odgovora na PRT, najveći broj bolesnica bio je sa inicijalno T2 tumorima (8/11, 72,7%).

Tabela 23. Inicijalna veličina tumora u odnosu na patohistološki odgovor tumora na PRT

Veličina Tu	pCR	pNCR	pPR	pNC	NA	Ukupno
T1	2 (16.7%)	0 (0 %)	1 (1.6%)	0 (0 %)	1 (2.5%)	4 (3%)
T2	7 (58.3%)	1 (12.5%)	32 (50.8%)	8 (72.7%)	19 (47.5%)	67 (50%)
T3	1 (8.3%)	4 (50%)	10 (15.9%)	1 (9.1%)	6 (15%)	22 (16.4%)
T4	2 (16.7%)	3 (37.5%)	20 (31.7%)	2 (18.2%)	14 (35%)	41 (30.6%)
Ukupno	12 (100%)	8 (100%)	63 (100%)	11 (100%)	40 (100%)	134 (100%)

pCR: patohistološki kompletan odgovor; pNCR: patohistološki skoro kompletan odgovor; pPR: patohistološki parcijalni odgovor; pNC: patohistološki bez promene; NA: nepoznato

Analizirana je veličina rezidualnog tumora posle PRT u odnosu na inicijalnu veličinu. Nije dobijena statistički značajna razlika (Fisher Exact Test, $p=0.186$). (Tabela 24)

Primena PRT je postigla pCR kod većine inicijalno T1 tumora (3/4, 75%). Sa druge strane, 31% bolesnica sa T2 tumorima, 50% sa T3 tumorima i 29% sa T4 tumorima je nakon PRT imalo rezidualne tumore veće od 20 mm.

Tabela 24. Patohistološka veličina tumora u odnosu na veličinu inicijalnog tumora

Veličina rezidualnog Tu	Inicijalna veličina tumora				Ukupno
	T1	T2	T3	T4	
Bez tumora	3 (75%)	16 (23.9%)	3 (13.6%)	7 (17.1%)	29 (21.7%)
Do 20 mm	0 (0%)	19 (28.4%)	5 (22.7%)	11 (26.8%)	35 (26.1%)
Veći od 20 mm	0 (0%)	21 (31.3%)	11 (50%)	12 (29.3%)	44 (32.8%)
NA	1 (25%)	11 (16.4%)	3 (13.6%)	11 (26.8%)	26 (19.4%)
Ukupno	4 (100%)	67 (100%)	22 (100%)	41 (100%)	134 (100%)

NA: nepoznato

4.8. ANALIZA ISHODA BOLESTI PREMA BIOLOŠKOJ KLASIFIKACIJI TUMORA

Kod 71 bolesnice određeni su biološki markeri ER, PgR, HER-2 i Ki-67 iz primarnog tumora pre otpočinjanja preoperativne RT, na osnovu čega su bolesnice klasifikovane u 4 molekularna podtipa:

1. Luminal A – 15/71 bolesnica (21.1%)
2. Luminal B (HER-2 negativan i HER-2 pozitivan) – 25/71 bolesnica (35.2%)
3. Her-2 pozitivne (nonluminal) – 11/71 bolesnica (15.5%)
4. Trostruko negativne (TN) – 20/71 bolesnica (28.2%)

Analizirani su OS, DFS i DFI u odnosu na biološki podtip inicijalnog tumora i rezultati su prikazani na tabelama 25a i 25b.

Tabela 25a. OS, DFS i DFI prema biološkim podtipovima tumora

Biološki podtip tumora	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
Luminal A	15	132 (>75)		64 (>49)		67 (>49)	
Luminal B	25	65 (>46)	$\chi^2_3=7.953$ p=0.047	27 (>20)	$\chi^2_3=4.432$ p=0.22	36 (>24)	$\chi^2_3=6.367$ p=0.095
HER-2 pozitivan	11	33.5 (>22)		16.5 (>9)		19.5 (>9)	
Trostruko negativan	20	40 (>17)		36 (>11)		36 (>12)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N: broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

Tabela 25b Rezultati testiranja vrednosti OS, DFS i DFI između parova kategorija

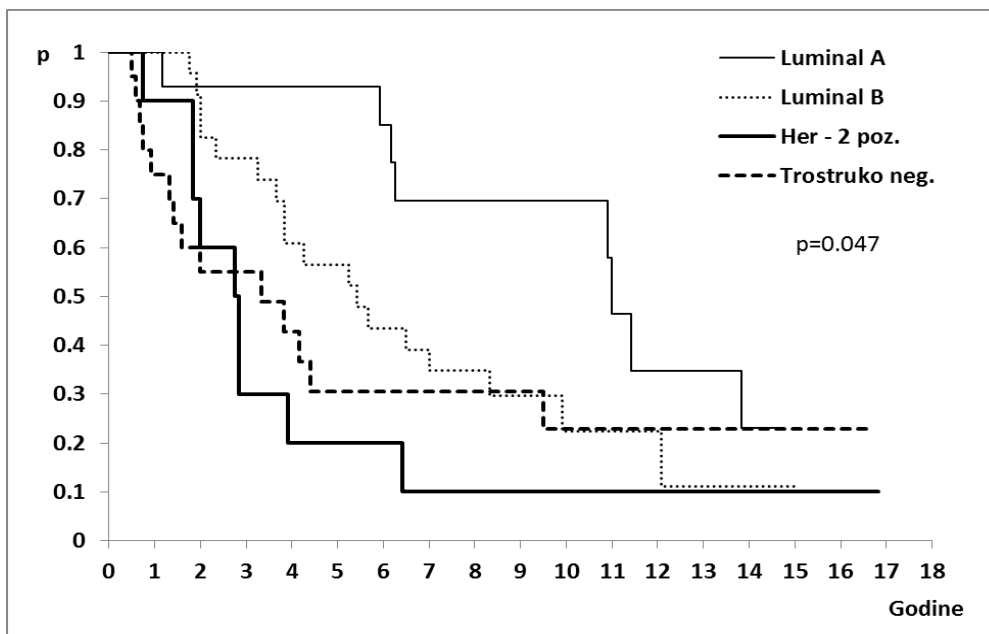
Parovi kategorija prema biološkom podtipu tumora	Log-rank test		
	OS	DFS	DFI
Lum A vs Lum B	$\chi^2_1=4.404$; p*=0.035	$\chi^2_1=0.56$; p*=0.454	$\chi^2_1=0.99$; p*=0.32
Lum A vs Her2 poz.	$\chi^2_1=6.843$; p*=0.009	$\chi^2_1=4.839$; p*=0.028	$\chi^2_1=7.145$; p*=0.007
Lum A vs TN	$\chi^2_1=3.552$; p*=0.06	$\chi^2_1=0.673$; p*=0.412	$\chi^2_1=0.734$; p*=0.391
Lum B vs Her2 poz.	$\chi^2_1=3.103$; p*=0.08	$\chi^2_1=2.996$; p*=0.083	$\chi^2_1=3.435$; p*=0.064
Lum B vs TN	$\chi^2_1=0.752$; p*=0.385	$\chi^2_1=0.051$; p*=0.822	$\chi^2_1=0.003$; p*=0.958
Her2 poz. vs TN	$\chi^2_1=0.327$; p*=0.567	$\chi^2_1=0.994$; p*=0.32	$\chi^2_1=1.682$; p*=0.194

*Bonferroni korekcija: 0.05/6=0.0083

U pogledu ukupnog preživljavanja u odnosu na biološki podtip pokazano je da postoji statistički značajna razlika između ove 4 podgrupe. (Tabela 25a, Grafikon 24).

Stopa 5-godišnjeg preživljavanja bolesnica sa luminal A tumorima bila je 92.9% (95%CI: 80-100%), luminal B tumorima 56.5% (95%CI: 39-80%), HER-2 pozitivnim tumorima 20% (95%CI:5-69%) i trostruko negativnim tumorima 30.6% (95% CI: 15-61%).

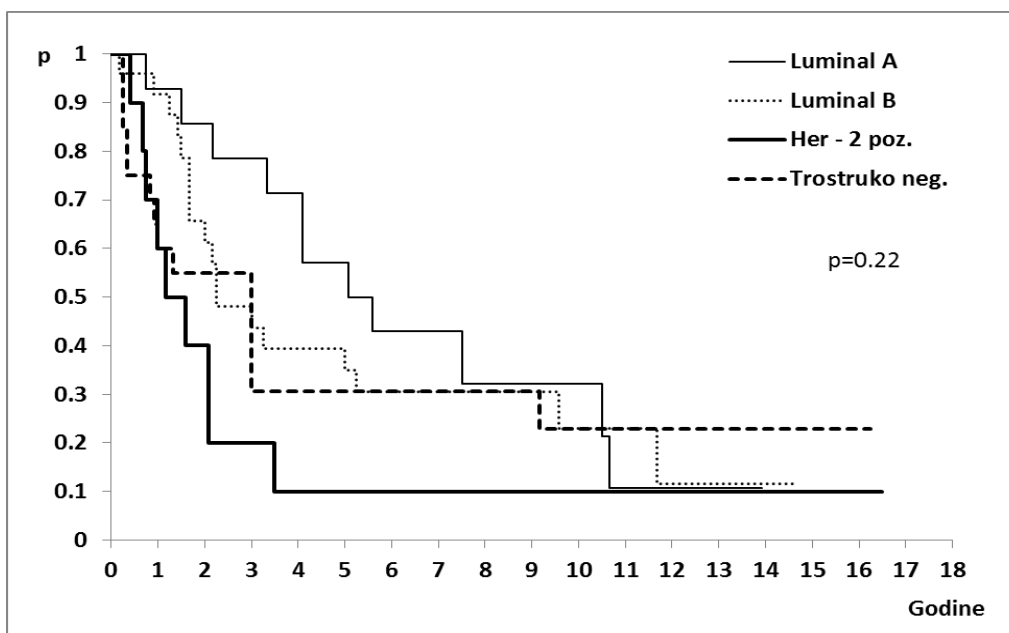
Dodatnim testiranjem između parova opisanih podtipova nije potvrđena statistički značajna razlika, mada je zabeležen trend ka dužem preživljavanju bolesnica sa luminal A tumorima u poredjenju sa bolesnicama sa HER2 pozitivnim tumorima (Tabela 25b).



Grafikon 24. Ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na biološke podtipove tumora

Nije bilo statistički značajne razlike u DFS izmedju bolesnica sa razlicitim podtipovima tumora (tabela 25a, grafikon 25).

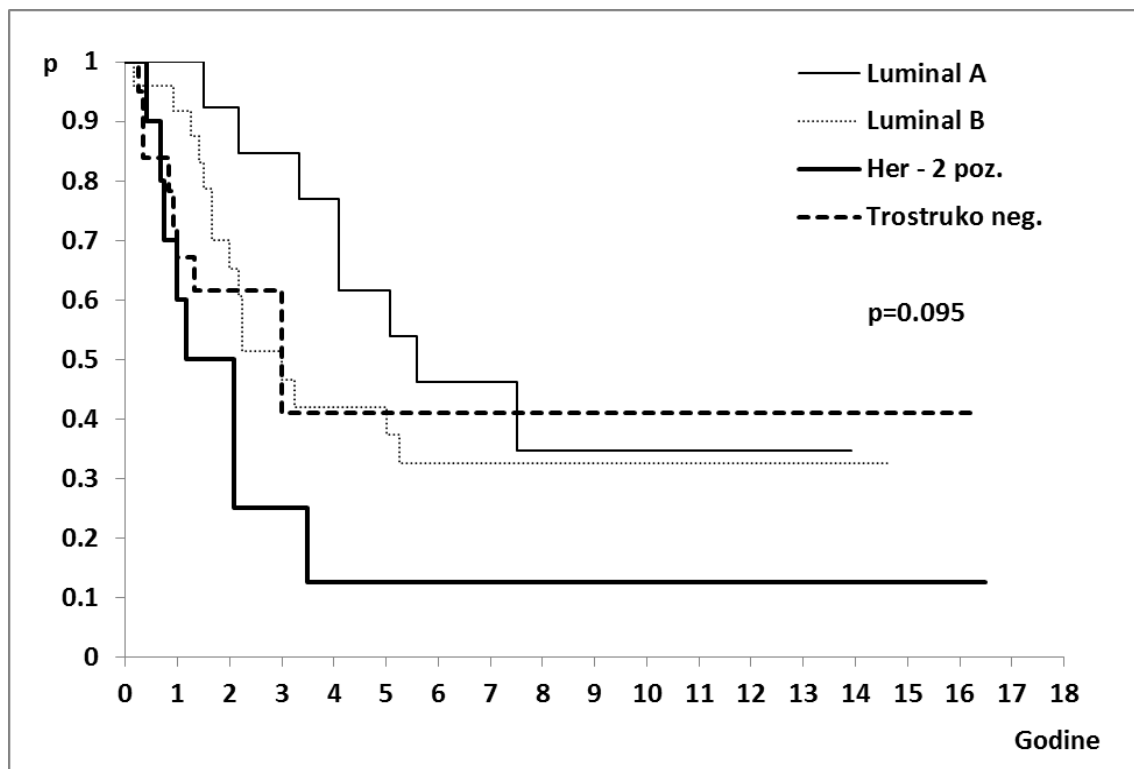
Stopa 5-godišnjeg DFS kod bolesnica sa luminal A tumorima bila je 57.1% (95%CI: 36-89%), luminal B tumorima 35% (95%CI: 20-61%), HER-2 pozitivnim tumorima 10% (95%CI: 1-64%) i trostruko negativnim tumorima 30.6% (95%CI: 15-61%).



Grafikon 25. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na biološke podtipove tumora

Nije zabeležena značajna razlika u DFI između podgrupa bolesnika podeljenim prema biološkim podtipovima tumora (Log-Rank test, $p=0.095$). Dodatnim testiranjem između parova opisanih grupa dobijena je statistički značajna razlika između luminal A podgrupe i HER-2 pozitivne podgrupe (Tabela 25b, Grafikon 26).

Bolesnice koje su imale tumor luminal A podtipa imale su najduže OS, što je statistički bilo značajno u poređenju sa bolesnicama sa ostalim podtipovima tumora, kao i duži DFS i DFI, ali bez statističke značajnosti (tabela 25a).



Grafikon 26. Vremenski interval bez bolesti (DFI) u odnosu na biološke podtipove tumora

Analiziran je klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na biološki podtip tumora. Statistički nije potvrđena razlika između kliničkog odgovora tumora na PRT u odnosu na biološki podtip tumora. (Fisher Exact test, $p=0.21$) (Tabela 26)

Ipak, može se primetiti da je kod 8/20 (40%) bolesnica sa TN tumorima postignut klinički CR, za razliku od 1/15 (6,7%) bolesnica sa luminal A tumorima.

Tabela 26. Klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na biološki podtip tumora

<i>Klinički odgovor</i>	<i>Lum A</i>	<i>Lum B</i>	<i>HER-2 poz.</i>	<i>TN</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
cCR	1 (6.7%)	3 (12%)	1 (9.1%)	8 (40%)	16 (25.4%)	29 (21.6%)
cPR	10 (66.7%)	18 (72%)	8 (72.7%)	9 (45%)	30 (47.6%)	75 (56.0%)
cSD	4 (26.6%)	4 (16%)	2 (18.2%)	3 (15%)	17 (27%)	30 (22.4%)
<i>Ukupno</i>	15 (100%)	25 (100%)	11 (100%)	20 (100%)	63 (100%)	134 (100%)

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalna odgovor; cSD: klinički stabilna bolest; NA: nepoznato

Analiza patohistološke procene odgovora tumora na PRT u odnosu na biološki podtip tumora, pokazala je statistički značajnu razliku između ispitivanih bioloških podgrupa (Fisher Exact test, $p=0.024$). Dodatnim testiranjem između parova opisanih grupa nije dobijena statistički značajna razlika (Fisher's Exact Test za parove).

Bolesnice koje su imale trostruko negativne tumore imale su najbolji odgovor na PRT (8/20, 40% je pCR i pNCR) u odnosu na luminal A i B i HER-2 pozitivne tumore gde je u 80% bolesnica zabeležena pPR (tabela 27).

Tabela 27. Patohistološka procena odgovora tumora na PRT u odnosu na biološki podtip tumora

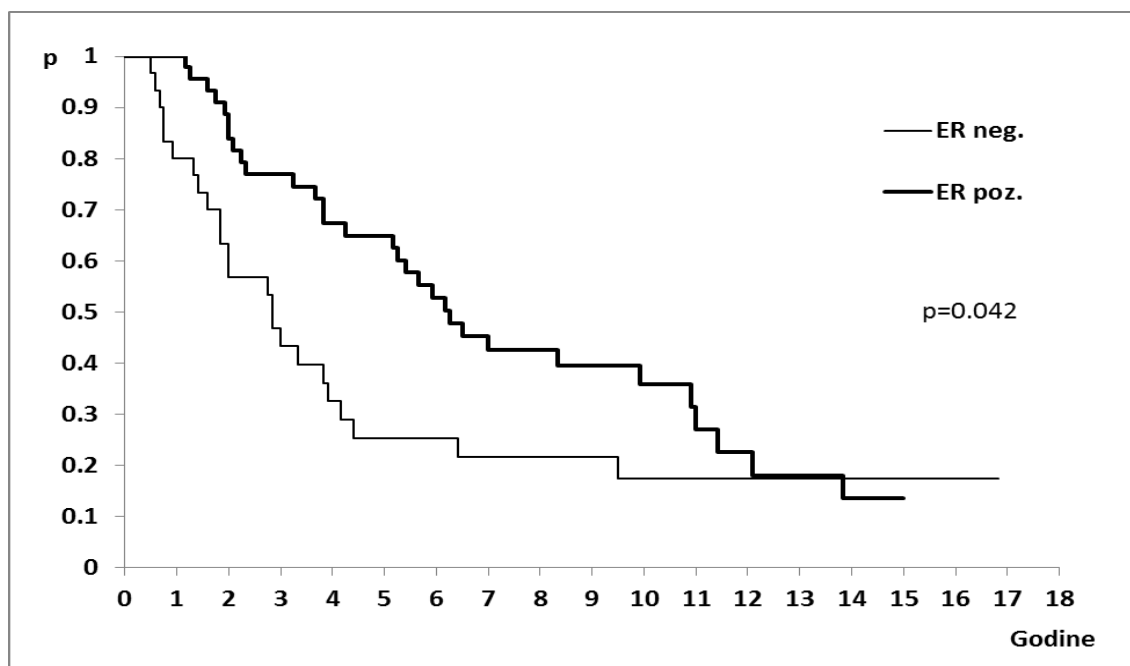
<i>Klinički odgovor</i>	<i>Lum A</i>	<i>Lum B</i>	<i>HER-2 poz.</i>	<i>Trost. neg.</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
pCR	1 (6.7%)	1 (4%)	0 (0%)	5 (25%)	5 (7.9%)	12 (9%)
pNCR	0 (0%)	2 (8%)	2 (18.2%)	3 (15%)	1 (1.6%)	8 (6%)
pPR	12 (80%)	20 (80%)	9 (81.8%)	7 (35%)	15 (23.8%)	63 (47.0%)
pNC	2 (13.3%)	2 (8%)	0 (0%)	5 (25%)	2 (3.2%)	11 (8.2%)
NA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	40 (63.5%)	40 (29.8%)
<i>Ukupno</i>	15 (100%)	25 (100%)	11 (100%)	20 (100%)	63(100%)	134 (100%)

pCR: patohistološki kompletan odgovor; pNCR: patohistološki skoro kompletan odgovor; pPR: patohistološki parcijalni odgovor; pNC: patohistološki bez promene; NA: nepoznato

4.9. ISHOD BOLESTI PREMA BIOLOŠKIM MARKERIMA U INICIJALNOM TUMORU

4.9.1. Analiza ER u inicijalnom tumoru

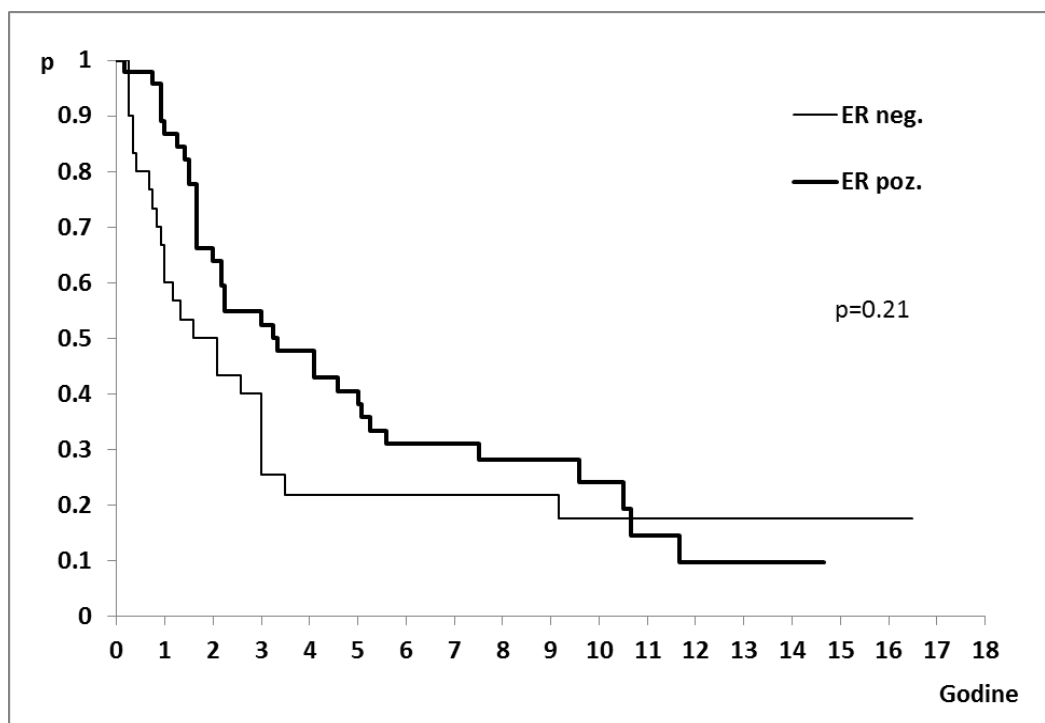
Kod 79 bolesnica odredjen je ER IHH metodom u inicijalnom tumoru pre započinjanja PRT. ER pozitivan tumor zabeležen je kod 47/79 (59.5%) bolesnica, a negativan tumor kod 32/79 (40.5%) bolesnica. Analizom OS dobijena je statistički značajna razlika izmedju bolesnica sa ER pozitivnim i ER negativnim tumorima (Log-Rank test, $p=0.042$) (grafikon 27). Stopa 5-godišnjeg preživljavanja bolesnica sa ER pozitivnim tumorima bila je 64.9% (95%CI:52-81%), a sa ER negativnim tumorima 25.3% (95%CI:13-47%).



Grafikon 27. Ukupno preživljavanje (OS) kod bolesnica sa ER pozitivnim i ER negativnim tumorima

Nema razlike u DFS izmedju bolesnica sa ER pozitivnim i ER negativnim tumorima (Log-Rank test, $p=0.21$) (grafikon 28). Stopa 5-godišnjeg DFS kod ER pozitivnih tumora bila je 38.1% (95%CI:26-55%), a kod ER negativnih tumora 21.8% (95%CI: 10-43%).

Nije nadjena statistički značajan razlika u DFI izmedju bolesnica sa ER pozitivnim i ER negativnim tumorima (Log-Rank test, $p=0.18$)



Grafikon 28. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) kod bolesnica sa ER pozitivnim i ER negativnim tumorima

Bolesnice sa ER pozitivnim tumorima imaju statistički značajno duže ukupno preživljavanje, ali ne i preživljavanje bez znakova bolesti i vremenski interval bez bolesti u poredjenju sa bolesnicama sa ER negativnim tumorima (tabela 28).

Tabela 28. OS, DFS i DFI kod bolesnica sa ER pozitivnim i ER negativnim tumorima

Vrednosti ER pre PRT	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
ER - pozitivni	47	75 (62-132)	$\chi^2_1=4.127$ p=0.042	40 (26-67)	$\chi^2_1=1.574$ p=0.21	49 (27-90)	$\chi^2_1=1.738$ p=0.18
ER - negativni	32	34 (22-53)		22 (12-36)		25 (>12)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N: broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

Analiza patohistološkog odgovora tumora na PRT u odnosu na ER status tumora pre PRT pokazala je statistički značajnu razliku izmedju bolesnica sa ER pozitivnim i bolesnica sa ER negativnim tumorima (Fisher Exact test, p=0.039) (tabela 29).

Bolesnice sa negativnim ER imaju bolji odgovor na PRT u smislu većeg postizanja pCR 6/32 (18.8%) i pNCR 5/32 (15.6%) u odnosu na bolesnica sa ER-pozitivnim tumorima kod koji je pCR registrovan kod 2/47 (4.3%) i pNCR 3/47 (6.4%).

Tabela 29. Patohistološki odgovor tumora na PRT kod bolesnica sa ER pozitivnim i ER negativnim tumorima

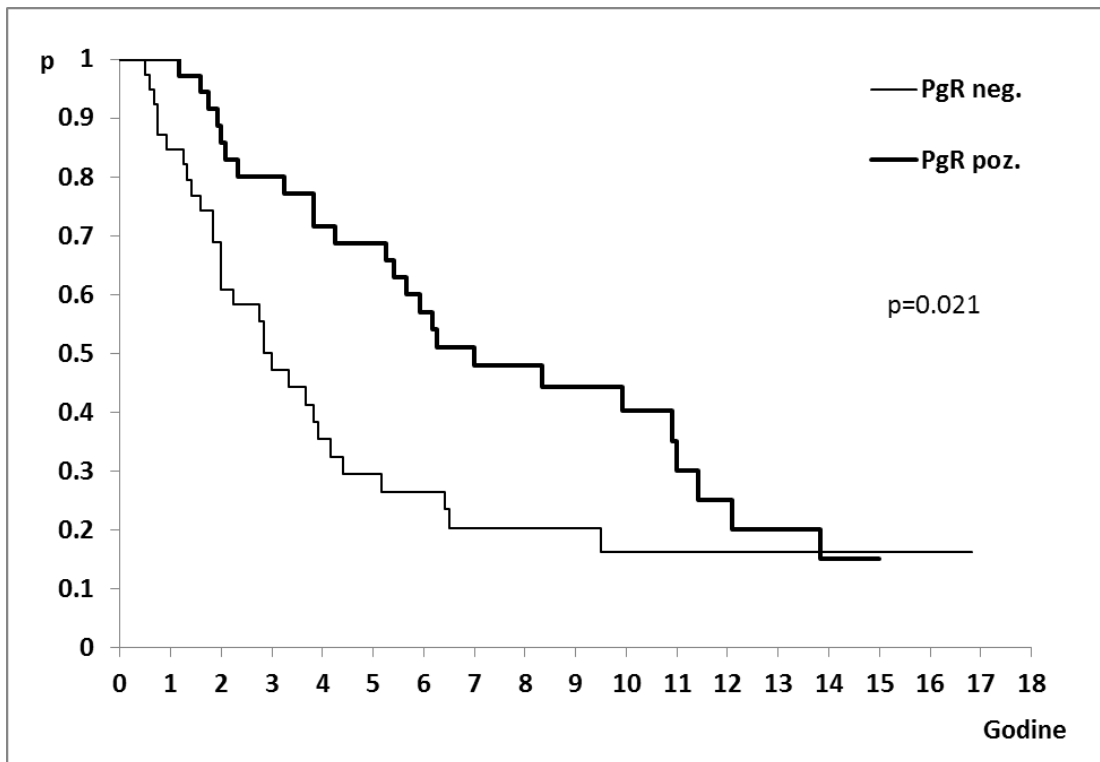
<i>Patohistološki odgovor</i>	<i>ER- neg.</i>	<i>ER-2 poz.</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
pCR	6 (18.8%)	2 (4.3%)	4 (7.3%)	12 (9%)
pNCR	5 (15.6%)	3 (6.4%)	0 (0%)	8 (6%)
pPR	16 (50.0%)	37 (78.8%)	10 (18.2%)	63 (47.0%)
pNC	5 (15.6%)	5 (10.6%)	1 (1.8%)	11 (8.2%)
NA	0 (0%)	0 (0%)	40 (72.7%)	40 (29.8%)
<i>Ukupno</i>	32 (100%)	47 (100%)	55 (100%)	134 (100%)

pCR: patohistološki kompletan odgovor; pNCR: patohistološki skoro kompletan odgovor; pPR: patohistološki parcijalni odgovor; pNC: patohistološki bez promene; NA: nepoznato

4.9.2. Analiza PgR u inicijalnom tumoru

Kod 79 bolesnica određen je PgR IHH metodom u inicijalnom tumoru pre započinjanja PRT. Pozitivne PgR imalo je 38/79 bolesnica (48.1%), dok je 41/79 bolesnica (51.9%) imalo negativan nalaz PgR. Analizom OS dobijena je statistički značajna razlika između bolesnica sa PgR pozitivnim i PgR negativnim tumorima (Log-Rank test, $p=0.021$). Grafikon 29.

Stopa 5-god. OS bolesnica sa PgR pozitivnim tumorima bila je 68.6% (95%CI:54-85%), a sa PgR negativnim tumorima 29.5% (95%CI:17-49%).

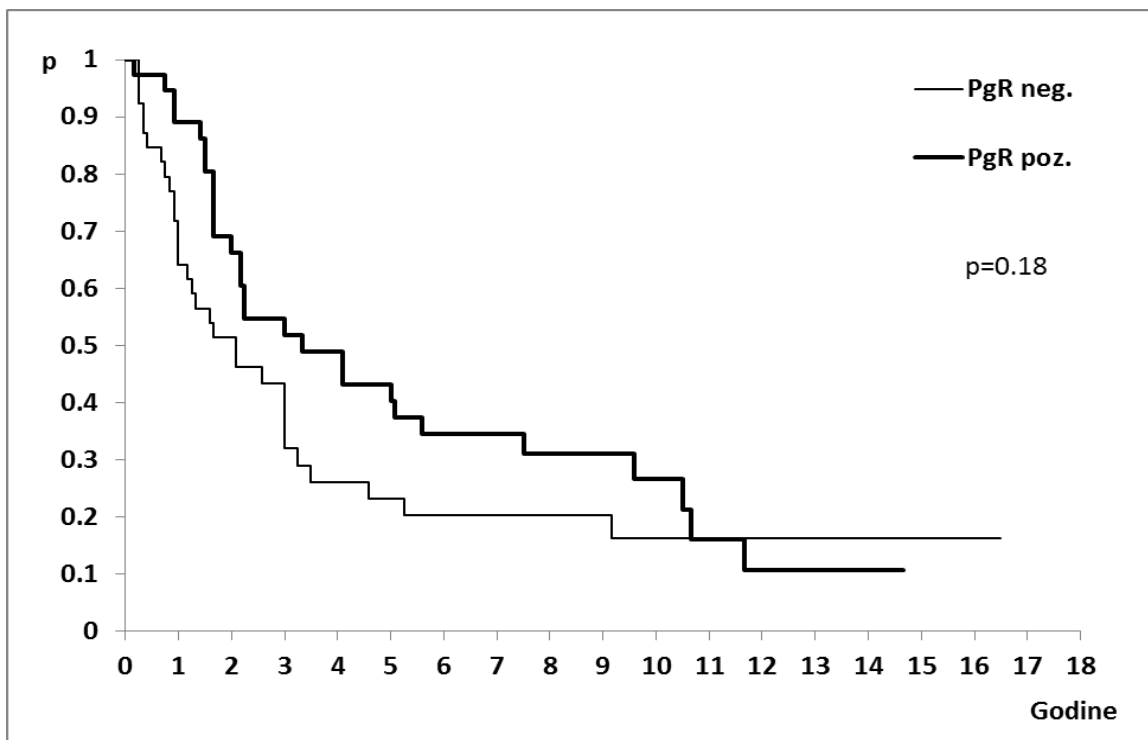


Grafikon 29. Ukupno preživljavanje (OS) kod bolesnica sa PgR pozitivnim i PgR negativnim tumorima

Medjutim, analizom DFS nije dobijena statistički značajna razlika izmedju ove dve grupe bolesnica (Log-Rank test, $p=0.18$) Grafikon 30.

Stopa 5-godišnjeg DFS kod bolesnica sa PgR pozitivnim tumorima bila je 40.2% (95%CI:26-60%), a kod bolesnica sa PgR negativnim tumorima 23.2% (95%CI: 12-42%).

Takodje nije bilo statistički značajne razlike ni u DFI izmedju bolesnica sa PgR pozitivnim i PgR negativnim tumorima (Log-Rank test, $p=0.17$).



Grafikon 30. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) kod bolesnica sa PgR pozitivnim i PgR negativnim tumorima

Bolesnice sa pozitivnim nalazom PgR imaju statistički značajno duže ukupno preživljavanje, ali ne i preživljavanje bez znakova bolesti, niti vremenski interval bez bolesti. Tabela 30.

Tabela 30. OS, DFS i DFI kod bolesnica sa PgR pozitivnim i PgR negativnim tumorima

Vrednosti PgR pre PRT	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
PgR - pozitivni	38	84 (65-137)	$\chi^2_{1}=5.343$ p=0.021	40 (26-115)	$\chi^2_{1}=1.798$ p=0.18	49 (>27)	$\chi^2_{1}=1.88$ p=0.17
PgR - negativni	41	34 (24-53)		25 (14-39)		31 (16-63)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N: broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

Analiziran je i patohistološki odgovor tumora na PRT u odnosu na PgR- status pre PRT i potvrđena je statistički značajna razlika između bolesnica sa PgR pozitivnim i PgR negativnim tumorima. (Fisher Exact test, p=0.039) (Tabela 31).

Bolesnice sa PgR negativnim tumorima imaju bolji odgovor na PRT u smislu većeg postizanja pCR 6/41 (14.6%) i pNCR 7/41 (17.1%) u odnosu na bolesnice sa PgR pozitivnim tumorima: pCR 2/38 (5.3%) i pNCR 1/38 (2.6%).

Tabela 31. Patohistološki odgovor tumora na PRT kod bolesnica sa PgR pozitivnim i PgR negativnim tumorima

<i>Patohistološki odgovor</i>	<i>PgR- neg.</i>	<i>PgR- poz.</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
pCR	6 (14.6%)	2 (5.3%)	4 (7.3%)	12 (9%)
pNCR	7 (17.1%)	1 (2.6%)	0 (0%)	8 (6%)
pPR	22 (53.7%)	31 (81.6%)	10 (18.2%)	63 (47.0%)
pNC	6 (14.6%)	4 (10.5%)	1 (1.8%)	11 (8.2%)
NA	0 (0%)	0 (0%)	40 (72.7%)	40 (29.8%)
<i>Ukupno</i>	41 (100%)	38 (100%)	55 (100%)	134 (100%)

pCR: patohistološki kompletan odgovor; pNCR: patohistološki skoro kompletan odgovor; pPR: patohistološki parcijalni odgovor; pNC: patohistološki bez promene; NA: nepoznato

4.9.3. Analiza HER-2 statusa u inicijalnom tumoru

Kod 79 bolesnica određen je HER-2 status IHH metodom u tumoru pre otpočinjanja PRT. Negativan HER-2 registrovan je kod 57/79 bolesnica (72.2%), pozitivan HER-2 kod 14/79 bolesnica (17.7%) i kod 8/79 bolesnica (10.1%) HER-2 status je procenjen kao 2+ (nije radjena dodatna CISH analiza zbog oskudnosti materijala).

Analizirani su OS, DFS i DFI i dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 32a.

Tabela 32a. OS, DFS i DFI kod bolesnica sa pozitivnim, negativnim i neodređenim HER-2 statusom pre PRT

HER2 status inicijalni	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
HER2 neg.	57	75 (53-132)		39 (27-90)		49 (>36)	
HER2 poz.	14	33 (>23)	$\chi^2_2=13.435$ p=0.0012	19 (>9)	$\chi^2_2=10.321$ p=0.0057	25 (>9)	$\chi^2_2=10.371$ p=0.0056
HER-2 2+	8	27 (>19)		20 (>11)		20 (>12)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS:preživljavanje bez znakova bolesti;DFI: vremenski interval bez bolesti; N:broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

Dodatnim testiranjem parova kategorija dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 32b.

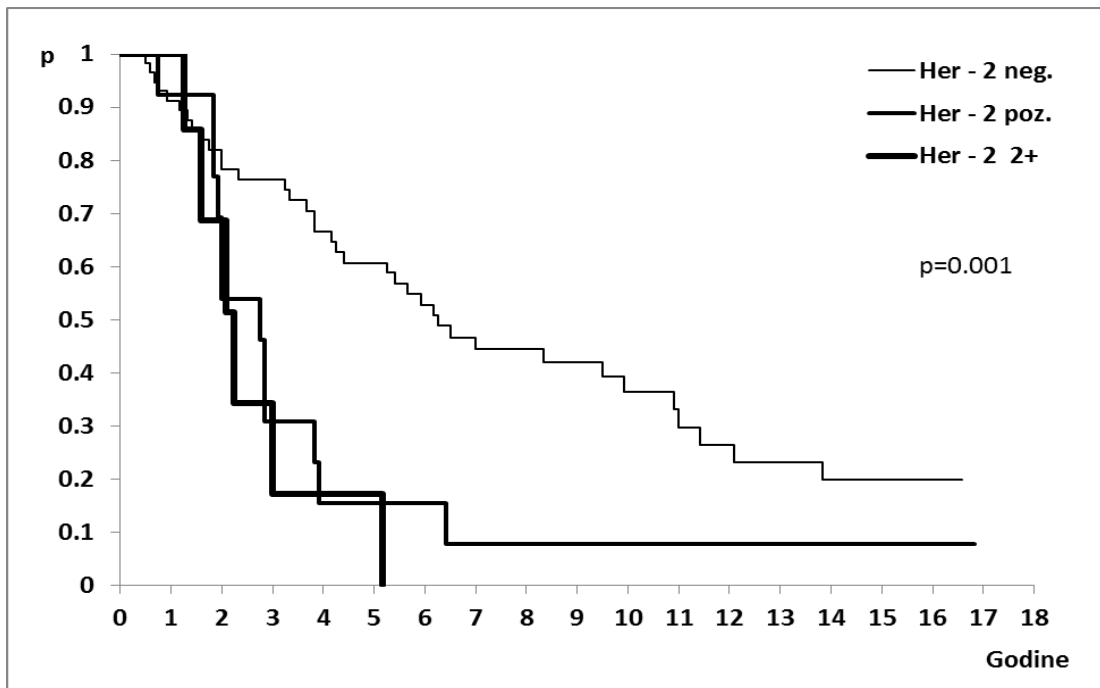
Tabela 32b Rezultati testiranja vrednosti OS, DFS i DFI između parova kategorija

Parovi kategorija HER2 inicijalnog statusa	Log-rank test		
	OS	DFS	DFI
HER2 neg. vs HER2 poz.	$\chi^2_1=6.826$; p*=0.009	$\chi^2_1=6.367$; p*=0.012	$\chi^2_1=6.724$; p*=0.009
HER2 neg. vs HER2 2+	$\chi^2_1=9.21$; p*=0.002	$\chi^2_1=6.243$; p*=0.012	$\chi^2_1=5.697$; p*=0.017
HER2 poz. vs HER2 2+	$\chi^2_1=0.352$; p*=0.553	$\chi^2_1=0.001$; p*=0.976	$\chi^2_1=0.006$; p*=0.94

*Bonferroni korekcija: 0.05/3=0.0167

Analizom ukupnog preživljavanja dobijena je statistički značajna razlika između bolesnica sa HER-2 pozitivnim, HER-2 negativnim i HER-2 2+ tumorima (Tabela 32a, Grafikon 31).

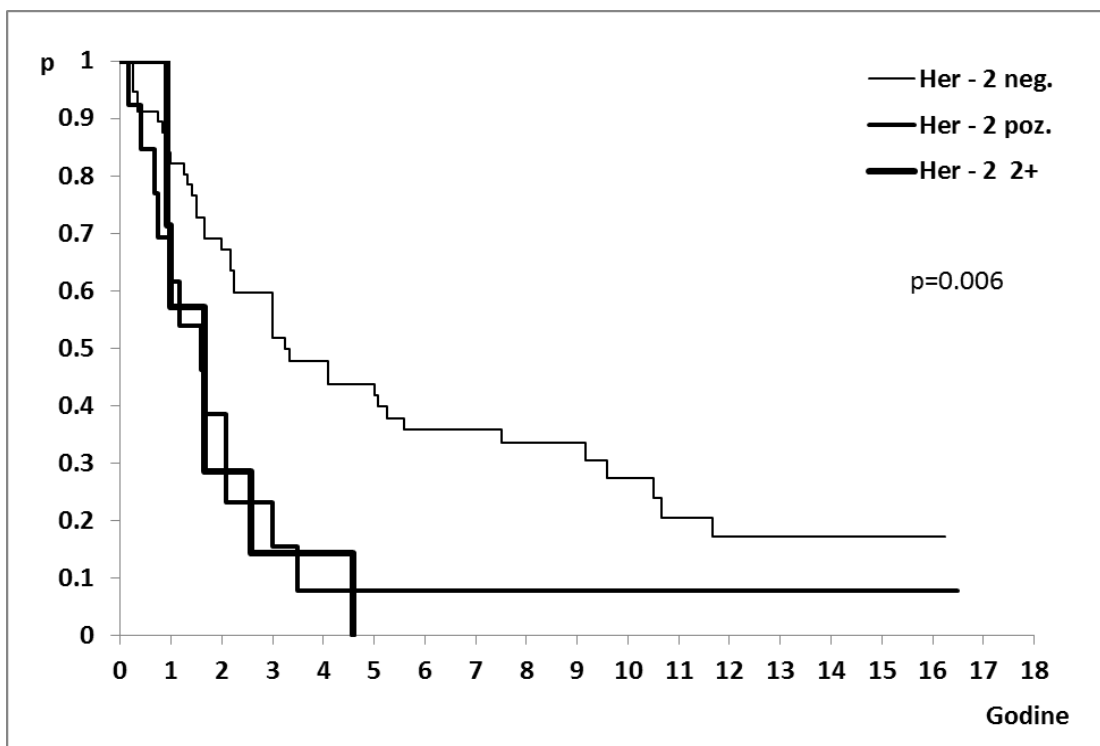
Stopa petogodišnjeg ukupnog preživljavanja bolesnica sa HER-2 negativnim tumorima bila je 60.7% (95%CI:49-75%), sa HER-2 pozitivnim tumorima 15.4% (95%CI:4-55%) i sa HER-2 2+ 17.1% (95%CI:2-100%). Dodatnim testiranjem između parova opisanih grupa dobijena je statistički značajna razlika između bolesnica sa HER-2 negativnim i HER-2 pozitivnim tumorima i između bolesnica sa HER-2 negativnim i HER-2 2+ tumorima (Tabela 32b).



Grafikon 31. Ukupno preživljavanje (OS) kod bolesnica sa pozitivnim, negativnim i neodređenim HER-2 statusom pre PRT

Analizom (DFS) također je dobijena statistički značajna razlika između ove tri podgrupe bolesnica (Tabela 32a). Dodatnim testiranjem između parova opisanih grupa dobijena je statistički značajna razlika između bolesnica sa HER-2 negativnim i HER-2 pozitivnim tumorima i između bolesnica sa HER-2 negativnim i HER-2 2+ tumorima (Tabela 32b, Grafikon 32).

Stopa petogodišnjeg preživljavanja bez znakova bolesti bolesnica sa HER-2 negativnim tumorima bila je 41.8% (95%CI:30-57%), sa HER-2 pozitivnim tumorima 7.7% (95%CI:1-50%) i sa HER-2 2+ tumorima nije dostignuta.

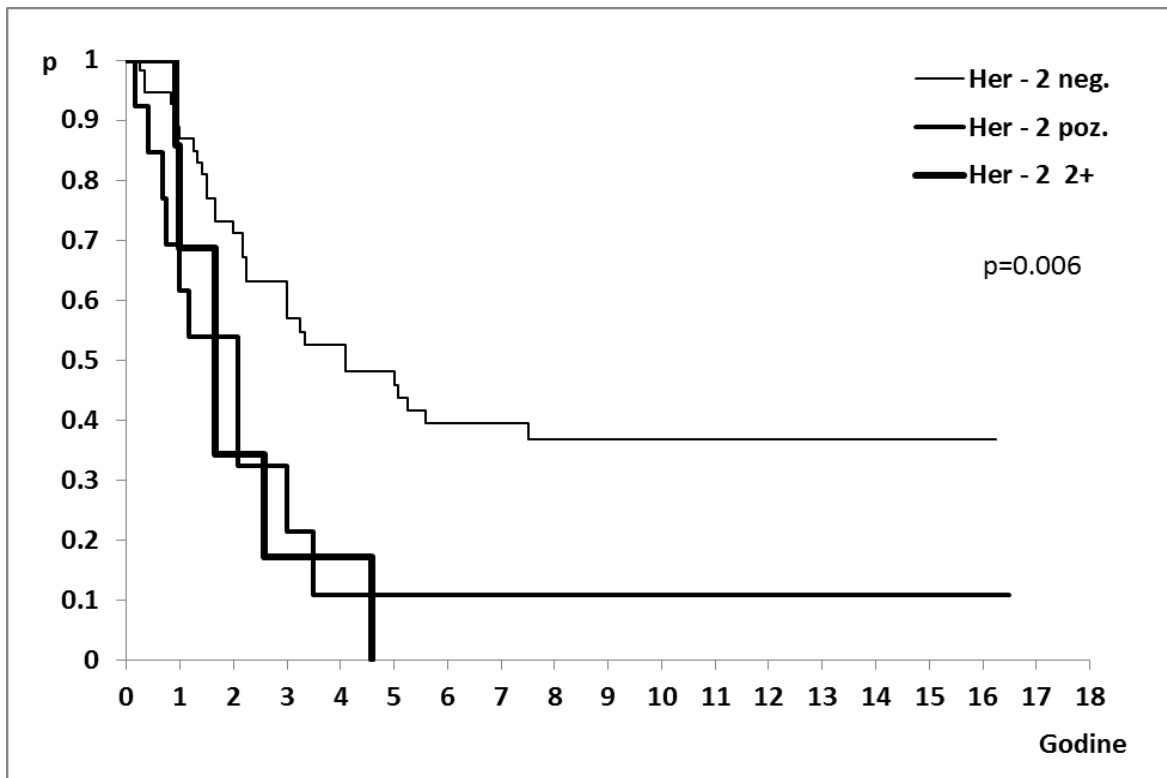


Grafikon 32. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) kod bolesnica sa pozitivnim, negativnim i neodređenim HER-2 statusom pre PRT

Isto tako je i analizom DFI dobijena statistički značajna razlika između bolesnica sa HER-2 negativnim, HER-2 pozitivnim i HER-2 2+ tumorima (Tabela 32a).

Dodatnim testiranjem između parova opisanih grupa dobijena je statistički značajna razlika između bolesnica sa HER-2 negativnim i HER-2 pozitivnim tumorima, dok je između bolesnica sa HER-2 negativnim i HER-2 2+ tumorima razlika bila na granici statističke značajnosti (Tabela 32b, Grafikon 33).

Stopa petogodišnjeg DFI bolesnica sa HER-2 negativnim tumorima iznosila je 45.9% (95%CI:34-62%), sa HER-2 pozitivnim tumorima 10.8% (95%CI:1-66%) i sa HER-2 2+ tumorima nije dostignuta.



Grafikon 33. Vremenski interval bez bolesti (DFI) kod bolesnica sa pozitivnim, negativnim i neodređenim HER-2 statusom pre PRT

Generalno, bolesnice sa HER-2 negativnim tumorima imaju duže ukupno preživljavanje i preživljavanje bez znakova bolesti kao i vremenski interval bez bolesti u odnosu na bolesnice sa HER-2 pozitivnim i HER-2 nalazom 2+ tumorima. (Tabela 32a).

Analiziran je i patohistološki odgovor tumora na PRT u odnosu na HER-2 status pre PRT i nije potvrđena statistički značajna razlika između bolesnica sa HER-2 pozitivnim, HER-2 negativnim i HER-2 2+ tumorima. (Fisher Exact test, $p=0.778$) (Tabela 33).

Tabela 33. Patohistološki odgovor tumora na PRT kod bolesnica sa pozitivnim, negativnim i neodređenim HER-2 statusom

<i>Patohistološki odgovor</i>	<i>HER-2 neg.</i>	<i>HER-2 poz.</i>	<i>HER-2 2+</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
pCR	7 (12.3%)	0 (0%)	1 (12.5%)	4 (7.3%)	12 (9%)
pNCR	5 (8.8%)	2 (14.3%)	1 (12.5%)	0 (0%)	8 (6%)
pPR	37 (64.9%)	11 (78.6%)	5 (62.5%)	10 (18.2%)	63 (47.0%)
pNC	8 (14.0%)	1 (7.1%)	1 (12.5%)	1 (1.8%)	11 (8.2%)
NA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	40 (72.7%)	40 (29.8%)
<i>Ukupno</i>	<i>57 (100%)</i>	<i>14 (100%)</i>	<i>8 (100%)</i>	<i>55 (100%)</i>	<i>134 (100%)</i>

pCR: patohistološki kompletan odgovor; pNCR: patohistološki skoro kompletan odgovor; pPR: patohistološki parcijalni odgovor; pNC: patohistološki bez promene; NA: nepoznato

4.9.4. Analiza Ki-67 u inicijalnom tumoru

Kod 79 bolesnica određen je Ki-67 IHH metodom u inicijalnom tumoru pre započinjanja PRT. Nizak Ki 67 (≤ 14) imalo 29/79 bolesnica (36.7%), dok je 50/79 bolesnica (63.3%) imalo visok Ki-67 (> 14). Rezultati analize OS, DFS i DFI prikazani su na tabeli 34.

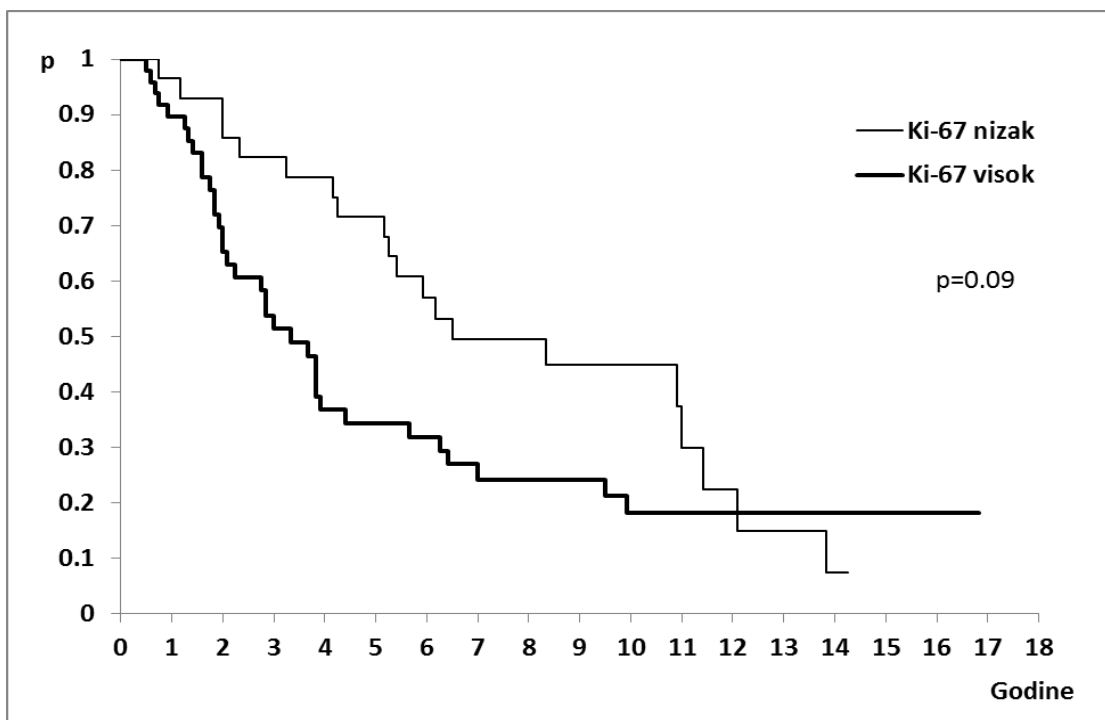
Tabela 34. OS, DFS i DFI u odnosu na vrednosti Ki-67 pre PRT

Vrednosti Ki-67 pre PRT	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
nizak Ki-67	29	78 (63-166)	$\chi^2_1=2.867$	55 (27-128)	$\chi^2_1=1.894$	55 (>27)	$\chi^2_1=1.577$
visok Ki-67	50	40 (27-68)	p=0.09	24 (18-36)	p=0.17	31 (20-61)	p=0.21

OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N: broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

Analizom OS nije dobijena statistički značajna razlika između bolesnika sa niskim i visokim nalazom Ki-67 (Tabela 34, Grafikon 34).

Stopa 5-godišnjeg preživljavanja bolesnika sa niskim nalazom Ki-67 bila je 71.5% (95%CI:56-90%), a sa visokim nalazom 34.2% (95%CI:22-51%).

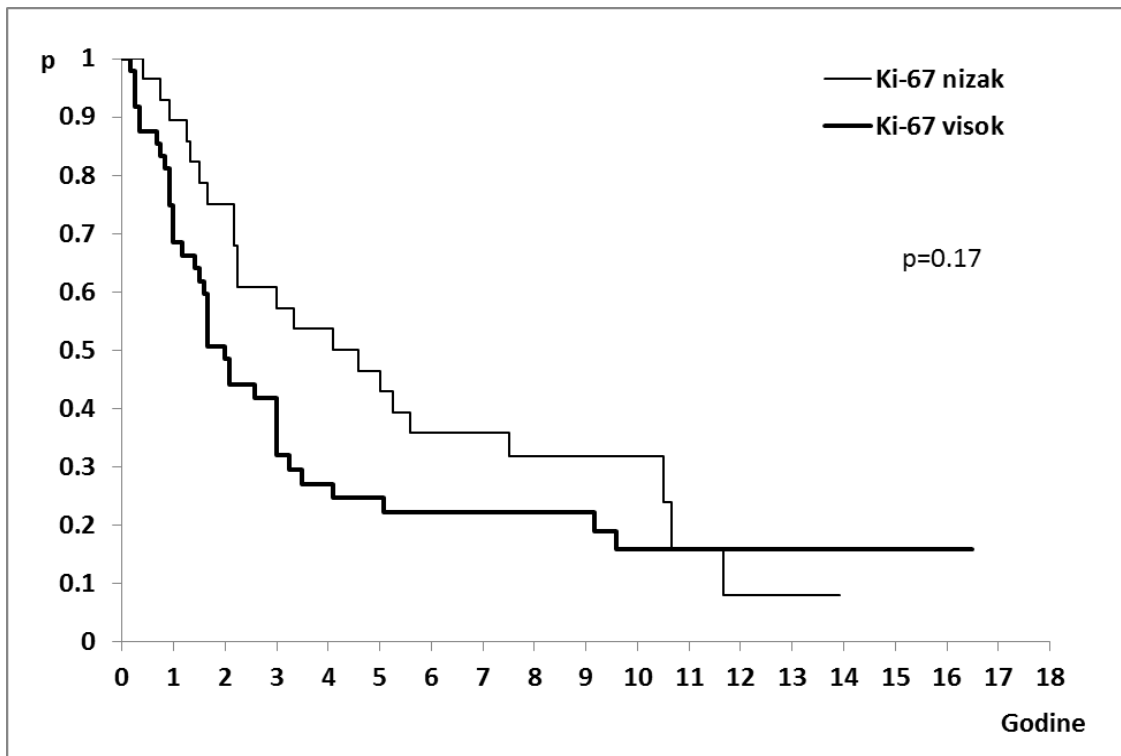


Grafikon 34. Ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na vrednosti Ki-67 pre PRT

Isto tako, analizom DFS nije dobijena statistički značajna razlika između ove dve grupe bolesnika (Tabela 34, Grafikon 35).

Stopa 5-godišnjeg preživljavanja bez relapsa bolesti kod bolesnika sa niskim Ki-67 bila je 42.9% (95%CI: 28-65%), a kod bolesnika sa visokim nalazom 24.6% (95%CI:14-41%).

Analizom DFI takodje nije dobijena statistički značajna razlika između ove dve podgrupe bolesnika (Tabela 34).



Grafikon 35. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na vrednosti Ki-67 pre PRT

Bolesnice sa niskim nalazom Ki-67 imaju duže ukupno preživljavanje i preživljavanje bez znakova bolesti, kao i duži vremenski interval bez bolesti u odnosu na bolesnice sa visokim vrednostima, ali ta razlika nije bila statistički značajna. (Tabela 34).

Analizom patohistološke procene odgovora tumora na PRT u odnosu na vrednosti Ki-67 pre PRT statistički nije potvrđena razlika između bolesnica sa niskim i visokim vrednostima Ki-67. (Fisher Exact test, $p=0.18$) (Tabela 35). Međutim, može se videti da bolesnice sa visokim vrednostima Ki-67 imaju veći procenat postizanja pCR 6/50 (12%) i pNCR 7/50 (14%) u odnosu na bolesnice sa niskim vrednostima KI-67 gde je pCR registrovan kod 2/29 (6.9%), a pNCR kod 1/29 (3.4%) bolesnica.

Tabela 35. Patohistološki odgovor tumora na PRT u odnosu na vrednosti Ki-67 pre PRT

<i>Patohistološki odgovor</i>	<i>Nizak Ki-67</i>	<i>Visok Ki-67</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
pCR	2 (6.9%)	6 (12%)	4 (7.3%)	12 (9%)
pNCR	1 (3.4%)	7 (14%)	0 (0%)	8 (6%)
pPR	24 (82.8%)	29 (58.0%)	10 (18.2%)	63 (47.0%)
pNC	2 (6.9%)	8 (16.0%)	1 (1.8%)	11 (8.2%)
NA	0 (0%)	0 (0%)	40 (72.7%)	40 (29.8%)
<i>Ukupno</i>	<i>29 (100%)</i>	<i>50 (100%)</i>	<i>55 (100%)</i>	<i>134 (100%)</i>

pCR: patohistološki kompletan odgovor; pNCR: patohistološki skoro kompletan odgovor; pPR: patohistološki parcijalni odgovor; pNC: patohistološki bez promene; NA: nepoznato

4.10. ANALIZA PROMENE BIOLOŠKIH MARKERA POSLE SPROVEDENE PREOPERATIVNE RT I UTICAJ NA ISHOD BOLESTI

4.10.1. Analiza ER pre i posle PRT

Kod 74 bolesnice analizirane su vrednosti receptora za estrogen (ER) u tumoru pre PRT i u rezidualnom tumoru posle PRT. Pacijenti su podeljeni u tri grupe: 1) grupa sa negativnim vrednostima ER (< 3) i pre i posle PRT – 29/74 bolesnica (39.2%); 2) grupa sa pozitivnim vrednostima pre PRT, a negativnim posle PRT – 4/74 bolesnice (5.4%) i 3) grupa sa pozitivnim vrednostima ER (≥ 3) i pre i posle PRT – 41/74 bolesnica (55.4%). Analizirani su OS, DFS i DFI, a rezultati su prikazani na tabeli 36a i 36b.

Tabela 36a. OS, DFS i DFI u odnosu na vrednosti ER pre i posle PRT

Vrednosti ER pre i posle PRT	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
Negativni i pre i posle PRT (1)	29	33 (22-47)		16 (11-36)		25 (>12)	
Pozitivni pre, a negat. posle PRT (2)	4	23 (>21)	$\chi^2_2=12.157$ p=0.002	16 (>2)	$\chi^2_2=8.729$ p=0.012	16 (>2)	$\chi^2_2=11.516$ p=0.0031
Pozitivni i pre i posle PRT (3)	41	84 (68-137)		49 (26-115)		55 (>27)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS:preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N:broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

Dodatnim testiranjem parova kategorija dobijeni su rezultati prikazani na tabeli 36b.

Tabela 36b. Rezultati testiranja vrednosti OS, DFS i DFI izmedju parova kategorija

Parovi kategorija vrednosti ER pre i posle PRT	Log-rank test		
	OS	DFS	DFI
1 vs 2	$\chi^2_1=0.213$; p*=0.644	$\chi^2_1=1.013$; p*=0.314	$\chi^2_1=1.587$; p*=0.208
1 vs 3	$\chi^2_1=7.818$; p*=0.005	$\chi^2_1=4.065$; p*=0.044	$\chi^2_1=5.08$; p*=0.024
2 vs 3	$\chi^2_1=13.548$; p*=0.0002	$\chi^2_1=9.799$; p*=0.002	$\chi^2_1=13.105$; p*=0.0003

**Bonferroni korekcija: 0.05/3=0.0167*

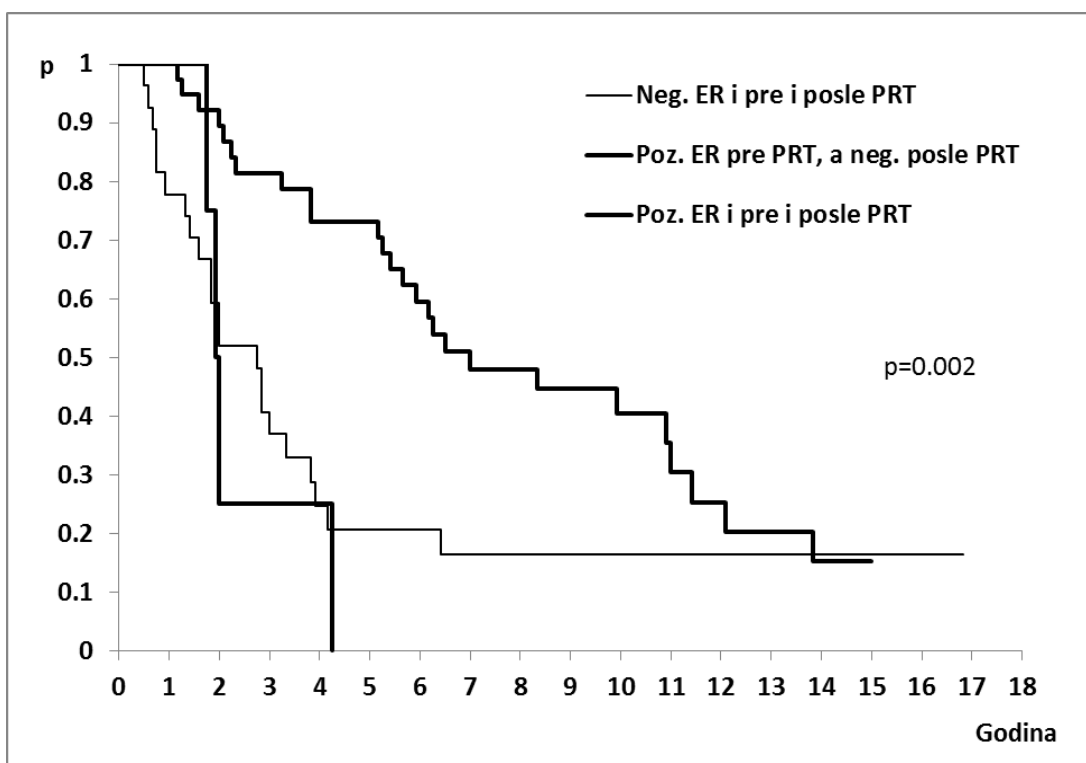
Analizom OS pokazano je da postoji statistički značajna razlika izmedju ove tri grupe bolesnica. (Tabela 36a, Grafikon 36).

Petogodišnja stopa OS bolesnica u prvoj grupi bila je 20.6% (CI:9-44%), u drugoj grupi nije dostignuta, a u trećoj grupi 73.2% (CI:60-89%).

Dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa potvrđena je statistički značajna razlika izmedju bolesnica koje su pre i posle PRT imale negativne ER i onih koje su pre i posle PRT imale pozitivne ER. Bolesnice sa pozitivnim ER imale su duže OS u odnosu na bolesnice sa negativnim ER. (Tabela 36b)

Takodje je potvrđena značajna razlika i izmdju bolesnica koje su imale pozitivne ER pre PRT a negativne posle i onih koje su imale pozitivne ER i pre i posle PRT. Bolesnice sa pozitivnim

ER pre i posle PRT imaju duži OS u odnosu na bolesnice sa promenom ER iz pozitivnog u negativni nalaz. (Tabela 36b)

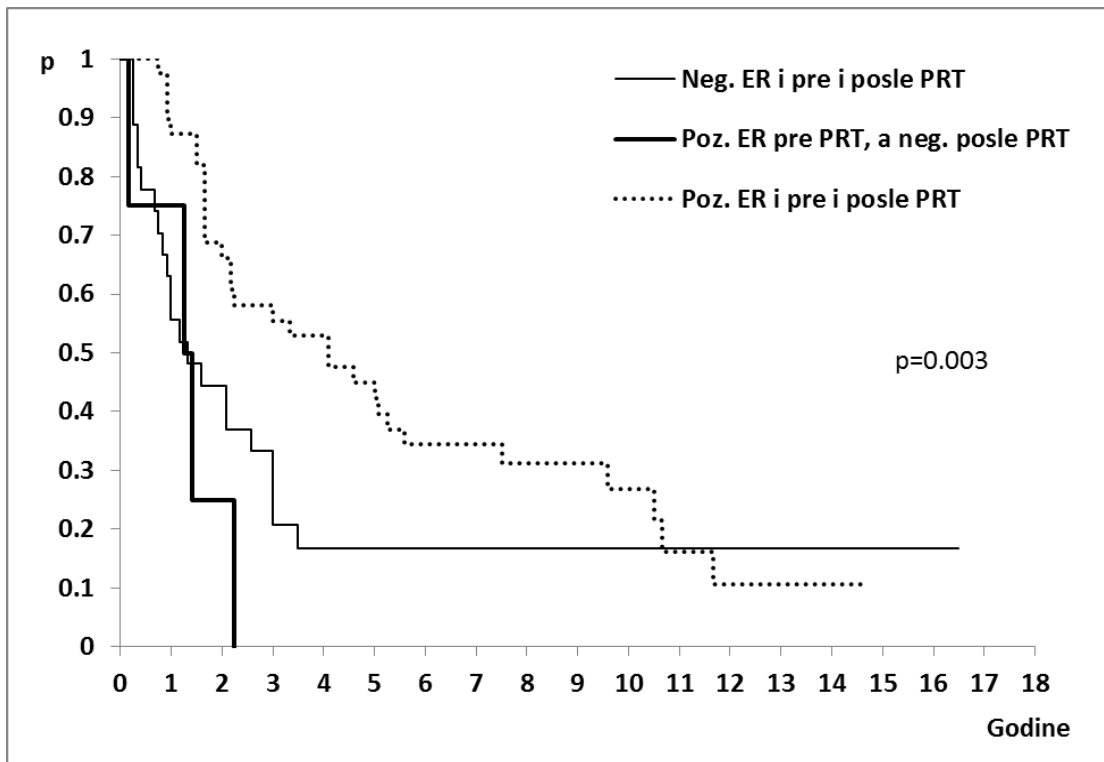


Grafikon 36. Ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na vrednosti ER pre i posle PRT

Analizom DFS, takodje je dobijena statistički značajna razlika izmedju ove tri grupe bolesnica (Tabela 36a, Grafikon 37).

Stopa 5-godišnjeg DFS u prvoj grupi bila je 16.7% (CI: 6-40%), u drugoj grupi nije dostignuta i u trećoj grupi 42.3% (CI:29-61%).

Dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa potvrđena je statistički značajna razlika izmedju bolesnica koje su imale pozitivne ER pre PRT, a negativne posle PRT i onih koje su imale pozitivne ER i pre i posle PRT. Bolesnice koje su imale pozitivne ER i pre i posle PRT imaju duži DFS u odnosu na bolesnice kod kojih je registrovana promena ER statusa. (Tabela 36b).



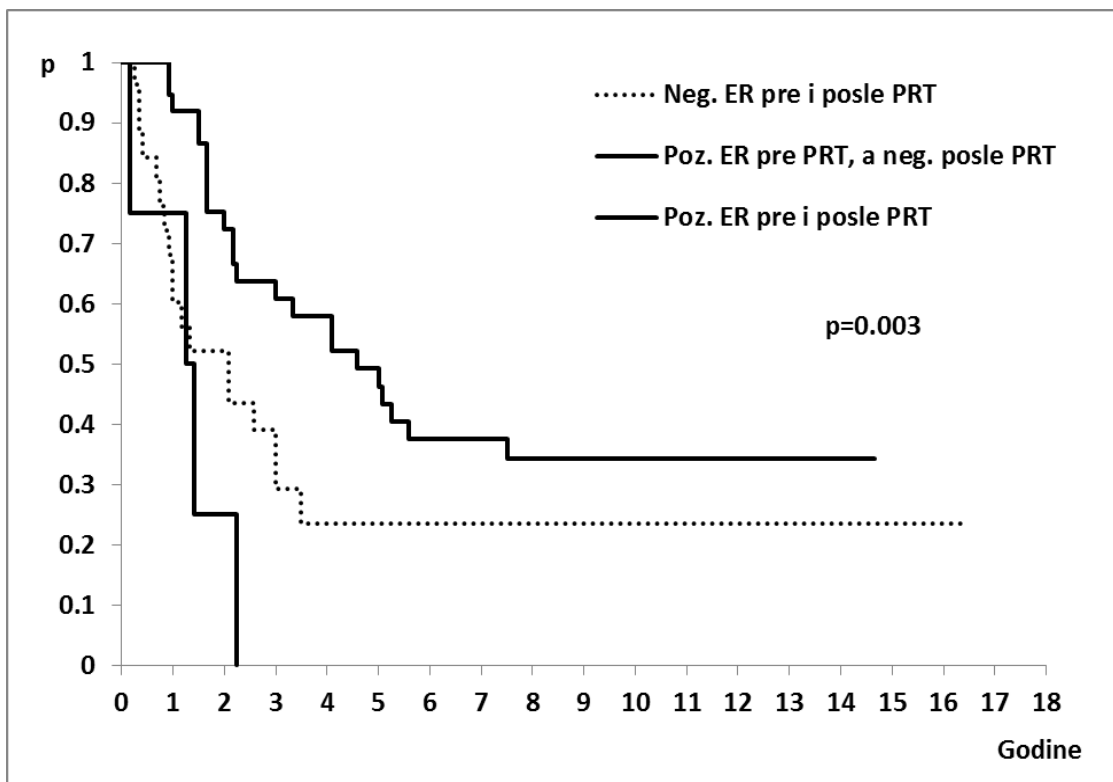
Grafikon 37. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na vrednosti ER pre i posle PRT

Analizom DFI takodje je dobijena statistički značajna razlika izmedju ove tri grupe bolesnica (Tabela 36a, Grafikon 38).

Stopa 5-godišnjeg DFI u prvoj grupi bila je 23.5% (CI: 10-50%), u drugoj grupi nije dostignuta i u trećoj grupi 46.3% (CI:32-66%).

Dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa potvrđjena je statistički značajna razlika izmdju bolesnica koje su imale pozitivne ER pre PRT a negativne posle i onih koje su imale pozitivne ER i pre i posle PRT. Bolesnice sa pozitivnim ER i pre i posle PRT imaju duži DFI u odnosu na bolesnice kod kojih je promenjen status ER (Tabela 36b).

Pacijenti koji su imali pozitivne ER i pre i posle PRT imaju statistički značajno duže ukupno preživljavanje, preživljavanje bez znakova bolesti i vremenski interval bez bolesti (Tabela 36a).



Grafikon 38. Vremenski interval bez bolesti (DFI) u odnosu na vrednosti ER pre i posle PRT

Analiziran je i klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na vrednosti ER pre i posle PRT. Statistički nije potvrđena razlika u odnosu na klinički odgovor tumora na PRT i vrednosti ER. (Fisher Exact test, $p=0.46$) (Tabela 37).

Ipak su bolesnice sa negativnim ER imale veći procenat cCR 6/29 (20.7%) u odnosu na one sa ER pozitivnim tumorima 4/41 (9.8%)

Tabela 37. Klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na vrednosti ER pre i posle PRT

Klinički odgovor	neg. ER pre i posle PRT	ER poz. pa neg.	Poz. ER pre i posle PRT	NA	Ukupno
cCR	6 (20.7%)	0 (0%)	4 (9.8%)	19 (31.7%)	29 (21.6%)
cPR	18 (62.1%)	4 (100%)	26 (63.4%)	27 (45.0%)	75 (56.0%)
cSD	5 (17.2%)	0 (0%)	11 (26.8%)	14 (23.3%)	30 (22.4%)
Ukupno	29 (100%)	4 (100%)	41 (100%)	63(100%)	134 (100%)

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalna odgovor; cSD: klinički stabilna bolest; NA: nepoznato

Takodje je analiziran i patohistološki odgovor tumora na PRT u odnosu na status ER pre i posle sprovedene PRT. Statistički nije potvrđena razlika u odnosu na patohistološki odgovor tumora na PRT i vrednosti ER. (Fisher Exact test, $p=0.199$). Ali su bolesnice sa negativnim ER imale veći procenat ostvarenog pCR 3/29 (10.3%) i pNCR 5/29 (17.2%) u odnosu na bolesnice sa ER pozitivnim tumorima gde je pCR registrovan kod 2/41 (4.9%), a pNCR kod 1/41 (2.4%) bolesnica (Tabela 38).

Tabela 38. Patohistološka procena odgovora tumora na PRT u odnosu na vrednosti ER pre i posle PRT

<i>Patohistološki odgovor</i>	<i>neg. ER pre i posle PRT</i>	<i>ER poz. pa neg.</i>	<i>Poz.ER pre i posle PRT</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
pCR	3 (10.3%)	0 (0%)	2 (4.9%)	7 (11.7%)	12 (9%)
pNCR	5 (17.2%)	0 (0%)	1 (2.4%)	2 (3.3%)	8 (6%)
pPR	16 (55.2%)	4 (100%)	33 (80.5%)	10 (16.7%)	63 (47%)
pNC	5 (17.2%)	0 (0%)	5 (12.2%)	1 (1.7%)	11 (8.2%)
NA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	40 (66.7%)	40 (29.8%)
<i>Ukupno</i>	29 (100%)	4 (100%)	41 (100%)	63(100%)	134 (100%)

pCR: patohistološki kompletan odgovor; pNCR: patohistološki skoro kompletan odgovor; pPR: patohistološki parcijalni odgovor; pNC: patohistološki bez promene; NA: nepoznato

4.10.2. Analiza PgR pre i posle PRT

Kod 74 bolesnice analizirane su vrednosti steroidnog receptora za progesteron (PgR) u tumoru pre i posle PRT. Pacijenti su podeljeni u četiri grupe: 1) grupa sa negativnim vrednostima PgR (< 3) i pre i posle PRT – 31/74 bolesnica (41.9%), 2) grupa sa negativnim vrednostima pre PRT a pozitivnim posle – 5/74 bolesnica (6.8%), 3) grupa sa pozitivnim vrednostima pre PRT, a negativnim posle PRT – 4/74 bolesnice (5.4%) i 4) grupa sa pozitivnim vrednostima PgR (≥ 3) i pre i posle PRT – 34/74 bolesnice (45.9%).

Analizirani su OS, DFS i DFI, a rezultati su prikazani na tabeli 39a i 39b.

Tabela 39a. OS i DFS u odnosu na vrednosti PgR pre i posle PRT

Vrednosti PgR pre i posle PRT	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
Negativni i pre i posle PRT (1)	31	27 (19-46)		16 (12-36)		25 (12-63)	
Negativni pre, a pozit. posle PRT (2)	5	62 (>50)	$\chi^2_3=9.107$ p=0.03	36 (>15)	$\chi^2_3=3.881$ p=0.27	36 (>15)	$\chi^2_3=4.207$ p=0.24
Pozitivni pre a negativni posle PRT (3)	4	37 (>23)		28 (>2)		28 (>2)	
Pozitivni i pre i posle PRT (4)	34	100 (68-145)		49 (26-115)		49(>27)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS:preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: vremenski interval bez bolesti; N:broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

Dodatnim testiranjem parova kategorija, dobijeni su rezultati prikazani na tabeli 39b.

Tabela 39b. Rezultati testiranja vrednosti OS, DFS i DFI izmedju parova kategorija

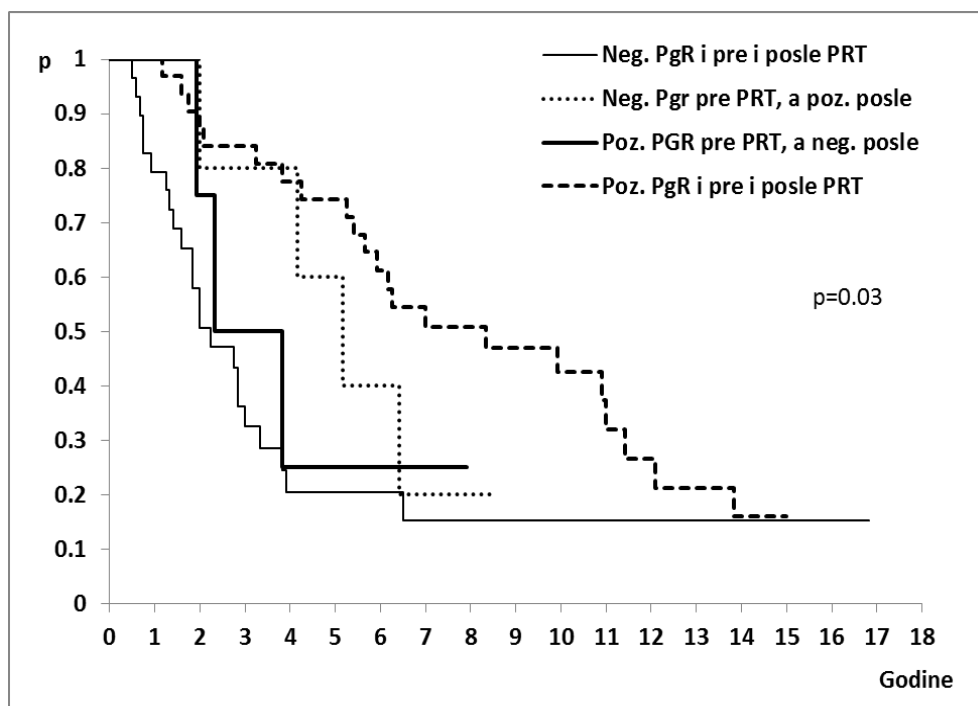
Parovi kategorija vrednosti PgR pre i posle PRT	Log-rank test		
	OS	DFS	DFI
1 vs 2	$\chi^2_1=1.355$; p*=0.244	$\chi^2_1=0.45$; p*=0.502	$\chi^2_1=0.058$; p*=0.809
1 vs 3	$\chi^2_1=0.451$; p*=0.502	$\chi^2_1=0.238$; p*=0.626	$\chi^2_1=0.01$; p*=0.918
1 vs 4	$\chi^2_1=8.304$; p*=0.004	$\chi^2_1=3.885$; p*=0.049	$\chi^2_1=4.096$; p*=0.043
2 vs 3	$\chi^2_1=0.266$; p*=0.606	$\chi^2_1=0.009$; p*=0.924	$\chi^2_1=0.009$; p*=0.924
2 vs 4	$\chi^2_1=1.451$; p*=0.228	$\chi^2_1=0.631$; p*=0.427	$\chi^2_1=0.942$; p*=0.332
3 vs 4	$\chi^2_1=2.07$; p*=0.15	$\chi^2_1=0.406$; p*=0.524	$\chi^2_1=0.656$; p*=0.418

*Bonferroni korekcija: $0.05/6=0.0083$

Analizom ukupnog preživljavanja, pokazano je da postoji statistički značajna razlika izmedju ove četiri grupe. (Tabela 39a, Grafikon 39).

Stopa 5-godišnjeg OS bolesnica u prvoj grupi bilo je 20.4% (95%CI:9-43%), u drugoj grupi 60% (95%CI: 29-100%), u trećoj grupi 25% (95%CI: 4-100%) i u četvrtoj grupi 74.3% (95%CI:60-91%).

Dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa potvrđena je statistički značajna razlika izmedju bolesnica koje su pre i posle PRT imale negativne PgR i onih koje su pre i posle PRT imale pozitivne PgR. (Tabela 39b). Bolesnice sa pozitivnim PgR i pre i posle PRT imale su duži OS u odnosu na bolesnice sa negativnim PgR pre i posle PRT.



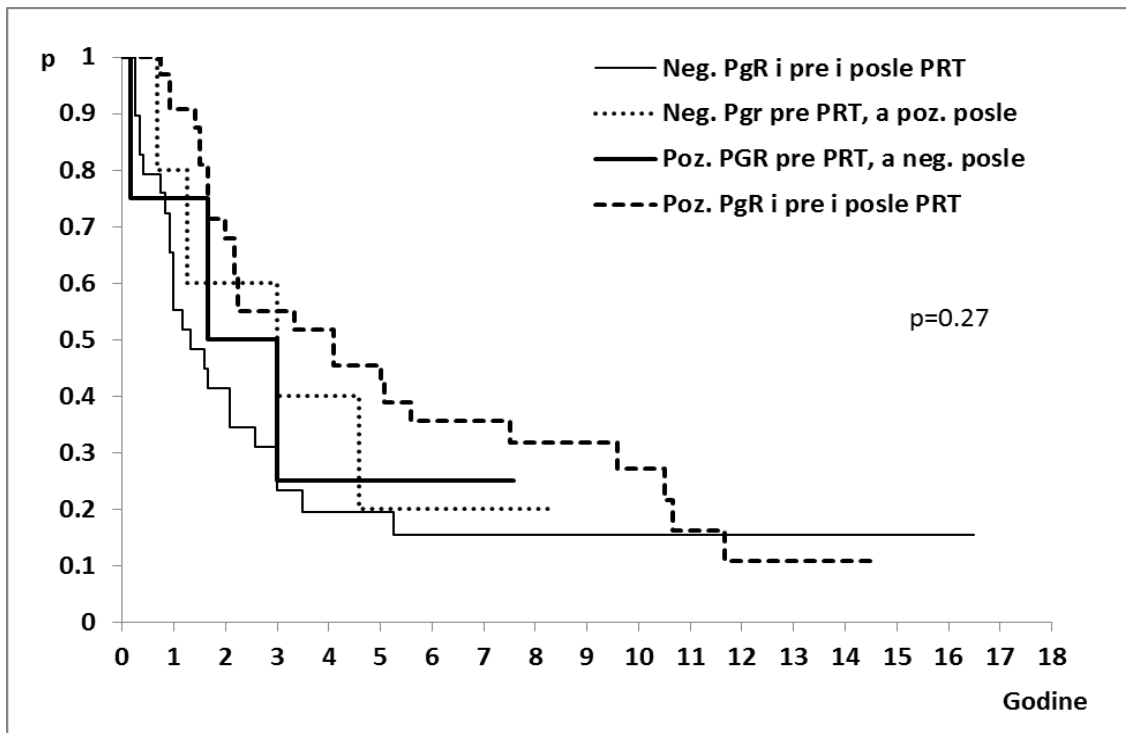
Grafikon 39. Ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na vrednosti PgR pre i posle PRT

Analizom DFS nije dobijena statistički značajna razlika izmedju ove četiri grupe bolesnica (Tabela 39a, Grafikon 40).

Stopa 5-godišnjeg DFS u prvoj grupi bila je 19.4% (CI: 9-41%), u drugoj grupi 20% (CI:3-100%), u trećoj grupi 25% (CI: 4-100%) i u četvrtoj grupi 42.1% (CI:28-63%).

Dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa nije potvrđena je statistički značajna razlika.(Tabela 39b)

Takodje nije bilo statistički značajne razlike izmedju ove 4 grupe bolesnica ni prilikom analize DFI (Tabela 39a)



Grafikon 40. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na vrednosti PgR pre i posle PRT

Bolesnice koje su imale pozitivne PgR pre i posle PRT imaju značajno duže OS u odnosu na ostale tri podgrupe bolesnica. (Tabela 39a)

Analiziran je i klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na vrednosti PgR pre i posle PRT. Statistički nije potvrđena razlika u odnosu na klinički odgovor tumora na PRT i vrednosti PgR. (Fisher Exact test, $p=0.84$) (Tabela 40). Međutim bolesnice koje su imale negativne PgR bolje su odgovorile na PRT (16% cCR) u odnosu na bolesnice sa pozitivnim nalazom (8.8% cCR).

Tabela 40. Klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na vrednosti PgR pre i posle PRT

<i>Klinički odgovor</i>	<i>neg. PgR pre i posle PRT</i>	<i>PgR neg. pa poz.</i>	<i>PgR poz. pa neg.</i>	<i>Poz. PgR pre i posle PRT</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
cCR	5 (16.1%)	1 (20%)	1 (25%)	3 (8.8%)	19 (31.7%)	29 (21.6%)
cPR	20 (64.5%)	3 (60%)	2 (50%)	23 (67.7%)	27 (45%)	75 (56.0%)
cSD	6 (19.4%)	1 (20%)	1 (25%)	8 (23.5%)	14 (23.3%)	30 (22.4%)
<i>Ukupno</i>	31 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	34 (100%)	60 (100%)	134 (100%)

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalna odgovor; cSD: klinički stabilna bolest; NA: nepoznato

Takodje je analiziran i patohistološki odgovor tumora na PRT u odnosu na vrednosti PgR pre i posle PRT. Statistički nije potvrđena razlika u odnosu na patohistološki odgovor tumora na PRT i vrednosti PgR. (Fisher Exact test, $p=0.24$) (Tabela 41). Medjutim pacijenti sa negativnim PgR su imali veći procenat pCR (9.7%) i pNCR (16%) u odnosu na pacijente sa pozitivnim PgR (pCR- 2.9%, a pNCR- 2.9%).

Tabela 41. Patohistološka procena odgovora tumora na PRT u odnosu na vrednosti PgR pre i posle PRT

<i>Patohistološki odgovor</i>	<i>neg. PgR pre i posle PRT</i>	<i>PgR neg. pa pozit.</i>	<i>PgR poz. pa negativni</i>	<i>Poz. PgR pre i posle PRT</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
pCR	3 (9.7%)	0 (0%)	1 (25%)	1 (2.9%)	7 (11.7%)	12 (9%)
pNCR	5 (16.1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.9%)	2 (3.3%)	8 (6%)
pPR	17 (54.8%)	5 (100%)	3 (75%)	28(82.4%)	10(16.7%)	63 (47%)
pNC	6 (19.4%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (11.8%)	1 (1.7%)	11 (8.2%)
NA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	40(66.6%)	40 (29.8%)
<i>Ukupno</i>	31 (100%)	5 (100%)	4 (100%)	34 (100%)	60 (100%)	134 (100%)

pCR: patohistološki kompletan odgovor; pNCR: patohistološki skoro kompletan odgovor; pPR: patohistološki parcijalni odgovor; pNC: patohistološki bez promene; NA: nepoznato

4.10.3. Analiza HER-2 statusa pre i posle PRT

Kod 74 bolesnica analiziran je HER-2 status u tumoru pre i posle PRT. Rezultati su pokazali da u primarnom tumoru (pre otpočinjanja PRT) i u rezidualnom tumoru negativan nalaz HER-2 je imalo 52/74 bolesnica (70.3%), pozitivan HER-2 status imalo 14/74 bolesnica (18.9%) i HER-2 nalaz 2+ je zabeležen kod 8/74 bolesnica (10.8%). Nije zabeležena promena statusa HER-2 nakon sprovedene PRT ni kod jedne bolesnice.

Analizirani su OS, DFS i DFI, a dobijeni rezultati su prikazani na tabeli 42a i 42b.

Tabela 42a. OS, DFS i DFI u odnosu na HER-2 status pre i posle PRT

Vrednosti HER-2 pre i posle PRT	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
HER-2 negativni	52	75 (51-132)		36 (26-90)		49 (>27)	
HER-2 pozitivni	14	33 (>23)	$\chi^2_2=11.824$ p=0.002	19 (>9)	$\chi^2_2=8.509$ p=0.014	25 (>9)	$\chi^2_2=8.653$ p=0.013
HER2 2+	8	27 (>19)		20 (>11)		20 (>12)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: slobodni interval; N: broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

Dodatnim testiranjem parova kategorija, dobijeni su rezultati prikazani na tabeli 42b.

Tabela 42b. Rezultati testiranja vrednosti OS, DFS i DFI izmedju parova kategorija

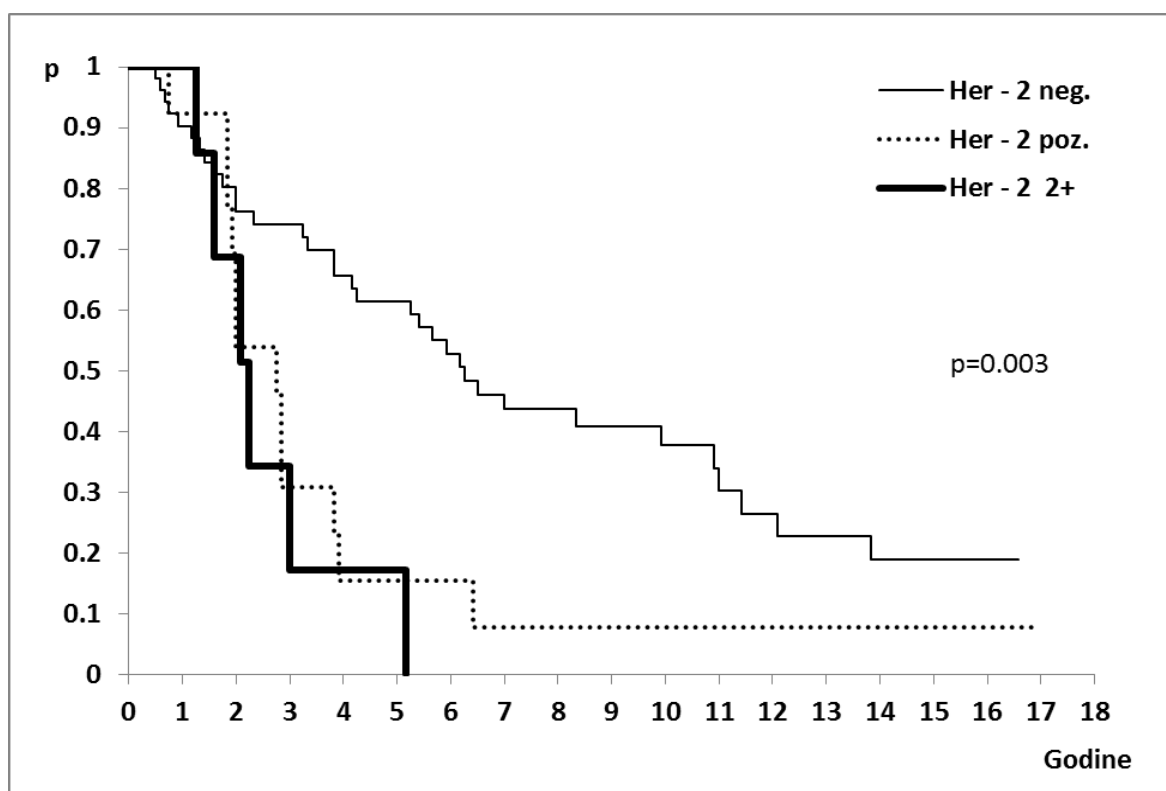
Parovi kategorija vrednosti HER2 pre i posle PRT	Log-rank test		
	OS	DFS	DFI
HER-2 neg. vs HER-2 poz.	$\chi^2_1=5.908$; p*=0.015	$\chi^2_1=5.271$; p*=0.022	$\chi^2_1=5.605$; p*=0.018
HER-2 neg. vs HER2 2+	$\chi^2_1=8.147$; p*=0.004	$\chi^2_1=5.122$; p*=0.024	$\chi^2_1=4.727$; p*=0.03
HER-2 poz. vs HER2 2+	$\chi^2_1=0.352$; p*=0.055	$\chi^2_1=0.001$; p*=0.976	$\chi^2_1=0.006$; p*=0.94

*Bonferroni korekcija: $0.05/3=0.0167$

Analizom ukupnog preživljavanja, pokazano je da postoji statistički značajna razlika izmedju ove tri podgrupe bolesnica. (Tabela 42a, Grafikon 41).

Stopa 5-godišnjeg OS bolesnica sa HER-2 negativnim tumorima bila je 61.3% (CI:49-77%), sa HER-2 pozitivnim tumorima 15.4% (CI:4-55%) i sa tumorima HER-2 2+ 17.1% (CI:2-100%).

Dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa dobijena je statistički značajna razlika izmedju HER-2 negativnih i HER-2 pozitivnih bolesnica i izmedju HER-2 negativnih i HER-2 2+ bolesnica (Tabela 42b). Bolesnice sa HER-2 negativnim tumorima imaju duži OS u odnosu na bolesnice sa HER-2 pozitivnim i HER-2 2+ nalazom.

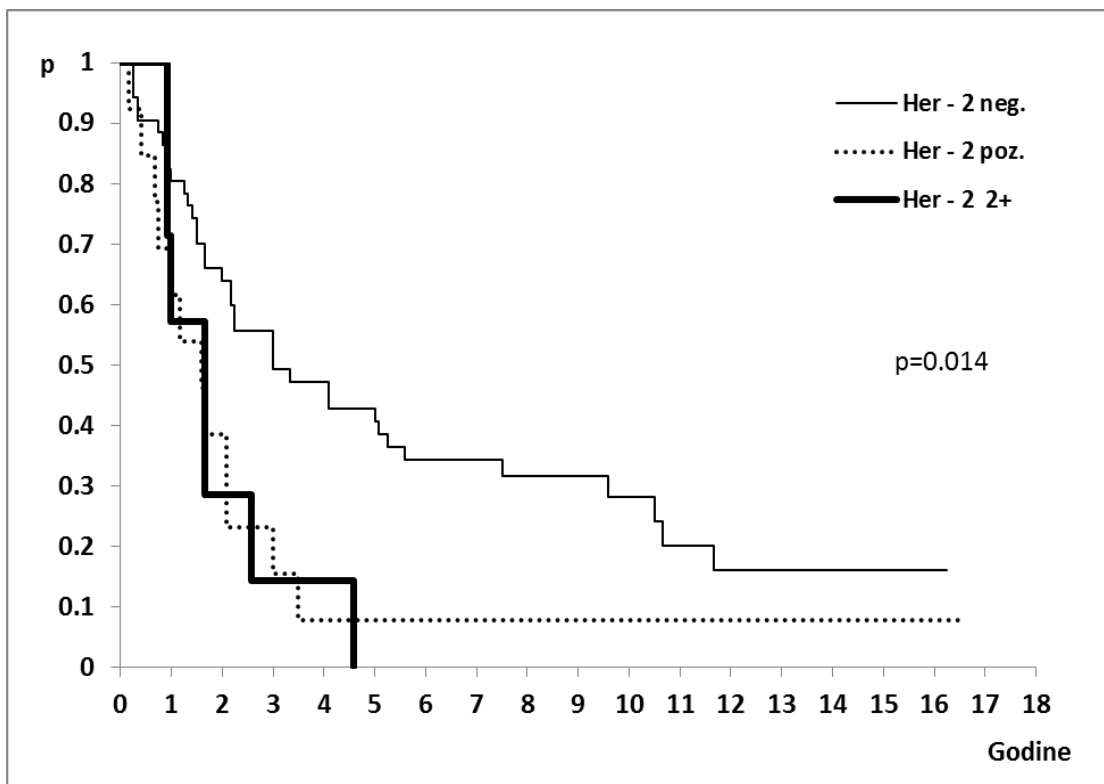


Grafikon 41. Ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na HER-2 status pre i posle PRT

Analizom DFS takodje je dobijena statistički značajna razlika izmedju ove tri podgrupe bolesnica (Tabela 42a, Grafikon 42).

Stopa 5-godišnjeg DFS kod HER-2 negativnih bolesnica bila je 40.7% (CI: 29-57%), kod HER-2 pozitivnih 7.7% (CI:1-50%) i kod bolesnica sa nalazom HER-2 2+ nije dostignuta.

Dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa nije dobijena statistički značajna razlika izmedju HER-2 negativnih i HER-2 pozitivnih bolesnica i izmedju HER-2 negativnih i HER-2 2+ bolesnica, kao ni izmedju HER-2 pozitivnih i HER-2 2+ (Tabela 42b).



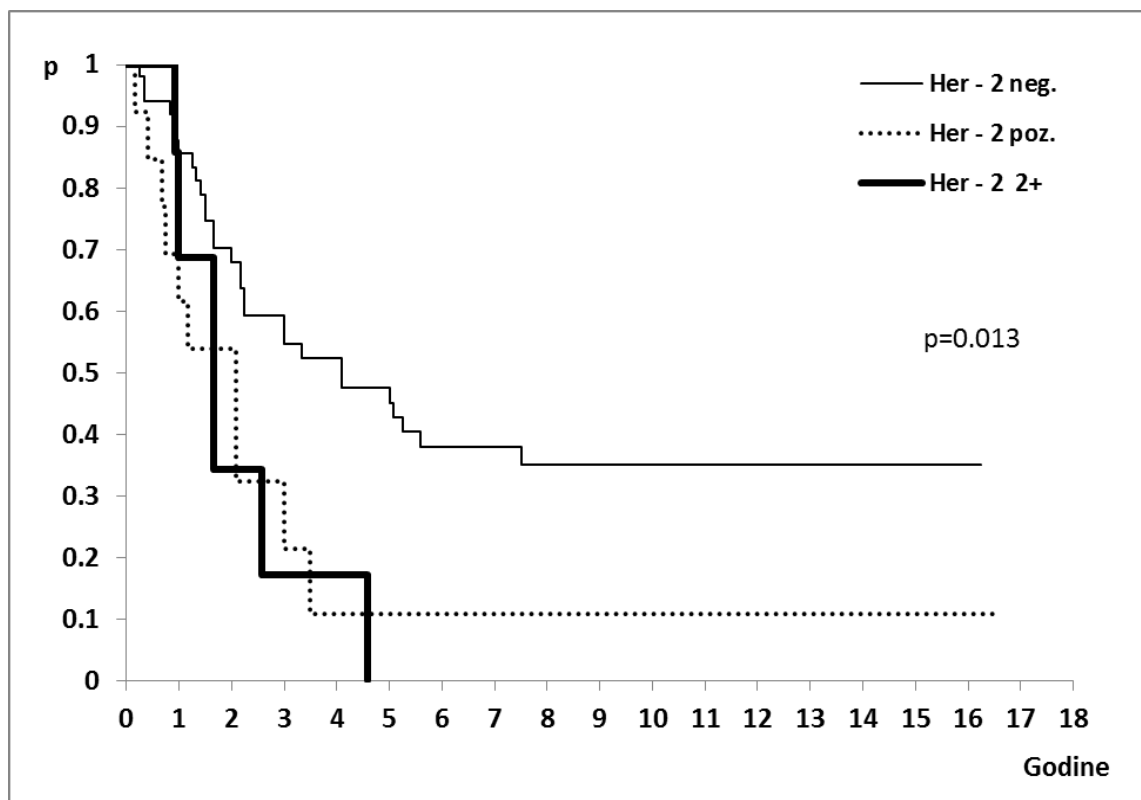
Grafikon 42. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na HER-2 status pre i posle PRT

Analizom DFI takodje je dobijena statistički značajna razlika izmedju ove tri podgrupe bolesnica (Grafikon 43).

Stopa 5-godišnjeg DFI bolesnica sa HER-2 negativnim tumorima bila je 45.1% (CI: 33-62%), sa HER-2 pozitivnim 10.8% (CI:2-66%) i sa HER-2 2+ nije dostignuta.

Dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa nije dobijena statistički značajna razlika izmedju HER-2 negativnih i HER-2 pozitivnih bolesnica i izmedju HER-2 negativnih i HER-2 2+ bolesnica, kao ni izmedju HER-2 pozitivnih i HER-2 2+ (Tabela 42b).

Bolesnice koje su imale negativan HER-2 status pre i posle PRT imaju značajno duže ukupno preživljavanje, preživljavanje bez znakova bolesti i vremenski interval bez bolesti u odnosu na bolesnice sa HER-2 pozitivnim nalazom i HER-2 2+. (Tabela 42a)



Grafikon 43. Slobodni interval (DFI) u odnosu na HER-2 status pre i posle PRT

Analiziran je i klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na HER-2 status pre i posle PRT. Statistički nije potvrđena razlika u odnosu na klinički odgovor tumora na PRT i HER-2 status. (Fisher Exact test, $p=0.66$) (Tabela 43).

Tabela 43. Klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na HER-2 status pre i posle PRT

Klinički odgovor	HER-2 neg.	HER-2 poz.	HER2 2+	NA	Ukupno
cCR	8 (15.4%)	1 (7.1%)	1 (12.5%)	19 (31.7%)	29 (21.6%)
cPR	33 (63.5%)	11 (78.6%)	4 (50%)	27 (45%)	75 (56.0%)
cSD	11 (21.1%)	2 (14.3%)	3 (37.5%)	14 (23.3%)	30 (22.4%)
Ukupno	51 (100%)	14 (100%)	8 (100%)	60 (100%)	134 (100%)

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalna odgovor; cSD: klinički stabilna bolest; NA: nepoznato

Takodje je analizirana i patohistološka procena odgovora tumora na PRT u odnosu na HER-2 status pre i posle PRT i nije dobijena statistički značajna razlika (Fisher Exact test, p=0.64) (Tabela 44).

Tabela 44. Patohistološka procena odgovora tumora na PRT u odnosu na HER-2 status pre i posle PRT

<i>Patohistološki odgovor</i>	<i>HER-2 neg.</i>	<i>HER-2 poz.</i>	<i>HER2 2+</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
pCR	4 (7.7%)	0 (0%)	1 (12.5%)	7 (11.7%)	12 (9%)
pNCR	3 (5.8%)	2 (14.3%)	1 (12.5%)	2 (3.3%)	8 (6%)
pPR	37 (71.1%)	11 (78.6%)	5 (62.5%)	10 (16.7%)	63 (47%)
pNC	8 (15.4%)	1 (7.1%)	1 (12.5%)	1 (1.7%)	11 (8.2%)
NA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	40 (66.6%)	40 (29.8%)
<i>Ukupno</i>	<i>52 (100%)</i>	<i>14 (100%)</i>	<i>8 (100%)</i>	<i>60 (100%)</i>	<i>134 (100%)</i>

pCR: patohistološki kompletan odgovor; pNCR: patohistološki skoro kompletan odgovor; pPR: patohistološki parcijalni odgovor; pNC: patohistološki bez promene; NA: nepoznato

4.10.4. Analiza Ki-67 pre i posle PRT

Kod 74 bolesnice analizirane su vrednosti markera proliferacije Ki-67 u tumoru pre i posle PRT.

Pacijenti su podeljeni u tri grupe: 1) grupa je imala niske vrednosti Ki-67 (< 14) i pre i posle zračne terapije – 29/74 bolesnice (39.2%), 2) grupa je imala visoke vrednosti pre zračne terapije a niske posle - 20/74 bolesnice (27%), i 3) grupa je imala visoke vrednosti i pre i posle PRT – 25/74 bolesnice (33.8%).

Analizirani su OS, DFS i DFI, a rezultati su prikazani na tabeli 45a i 45b.

Tabela 45a. OS, DFS i DFI u odnosu na vrednosti Ki-67 pre i posle PRT

Vrednosti Ki-67 pre i posle PRT	N	Medijana, u mesecima, sa 95% CI i rezultati testiranja					
		OS	Log-rank test	DFS	Log-rank test	DFI	Log-rank test
Nizak i pre i posle PRT (1)	29	78 (63-166)		55 (27-128)		55 (>27)	
Visok pre, a nizak posle PRT (2)	20	46 (>34)	$\chi^2_2=10.01$ p=0.007	25 (>17)	$\chi^2_2=5.035$ p=0.08	28 (>17)	$\chi^2_2=2.753$ p=0.25
Visok i pre i posle PRT (3)	25	25 (22-47)		20 (11-42)		20 (>12)	

OS: ukupno preživljavanje; DFS: preživljavanje bez znakova bolesti; DFI: slobodni interval; N: broj pacijenata; 95%CI: 95% interval poverenja;

Dodatnim testiranjem parova kategorija, dobijeni su rezultati prikazani na tabeli 45b.

Tabela 45b. Rezultati testiranja vrednosti OS, DFS i DFI izmedju parova kategorija

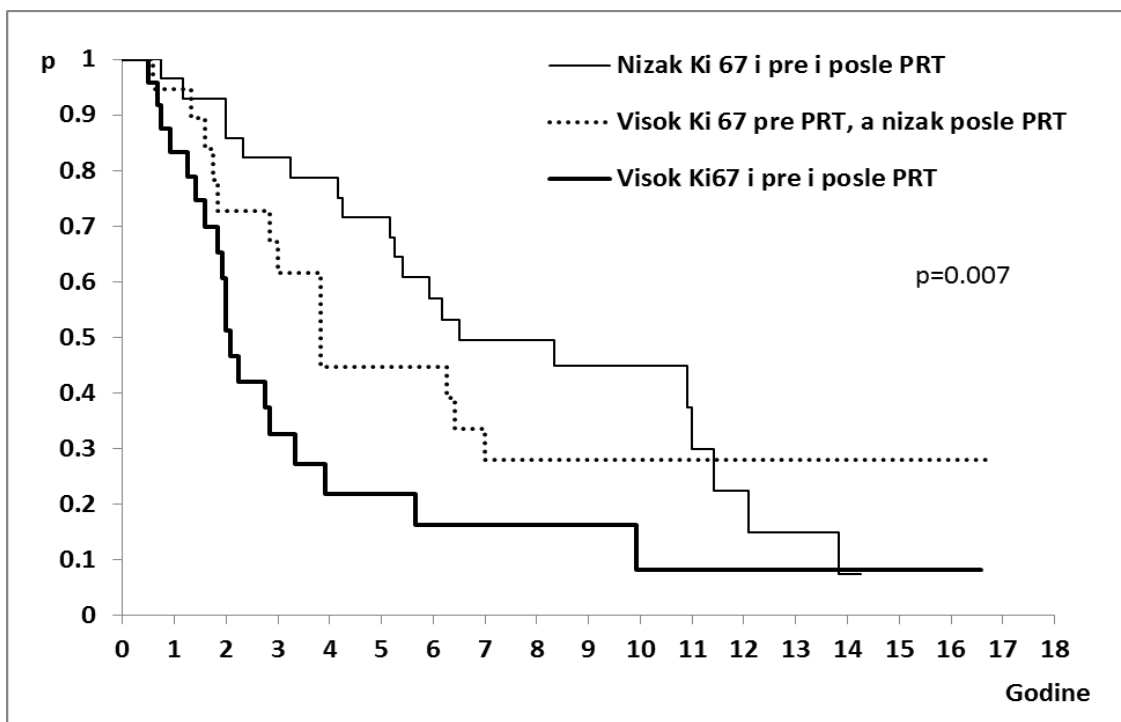
Parovi kategorija vrednosti Ki-67 pre i posle PRT	Log-rank test		
	OS	DFS	DFI
1 vs 2	$\chi^2_1=0.13$; p*=0.719	$\chi^2_1=0.646$; p*=0.421	$\chi^2_1=1.886$; p*=0.169
1 vs 3	$\chi^2_1=9.149$; p*=0.002	$\chi^2_1=5.042$; p*=0.025	$\chi^2_1=2.163$; p*=0.141
2 vs 3	$\chi^2_1=3.444$; p*=0.063	$\chi^2_1=1.062$; p*=0.303	$\chi^2_1=0.015$; p*=0.901

**Bonferroni korekcija: 0.05/3=0.0167*

Analizom ukupnog preživljavanja, pokazano je da postoji statistički značajna razlika izmedju ove tri grupe bolesnica. (Tabela 45a, Grafikon 44).

Stopa 5-godišnjeg OS bolesnica u prvoj grupi bila je 71.5% (CI:56-90%), u drugoj grupi 44.7% (CI:26-74%), a u trećoj grupi 21.7% (CI:9-49%).

Dodatnim testiranjem izmedju parova opisanih grupa potvrđena je statistički značajna razlika izmedju bolesnica koje su pre i posle PRT imale nizak Ki-67 i onih koje su pre i posle PRT imale visok Ki-67 (Tabela 45b). Bolesnice sa niskim vrednostima Ki-67 i pre i posle PRT imaju duži OS u odnosu na bolesnice sa visokim vrednostima Ki-67 i pre i posle PRT.



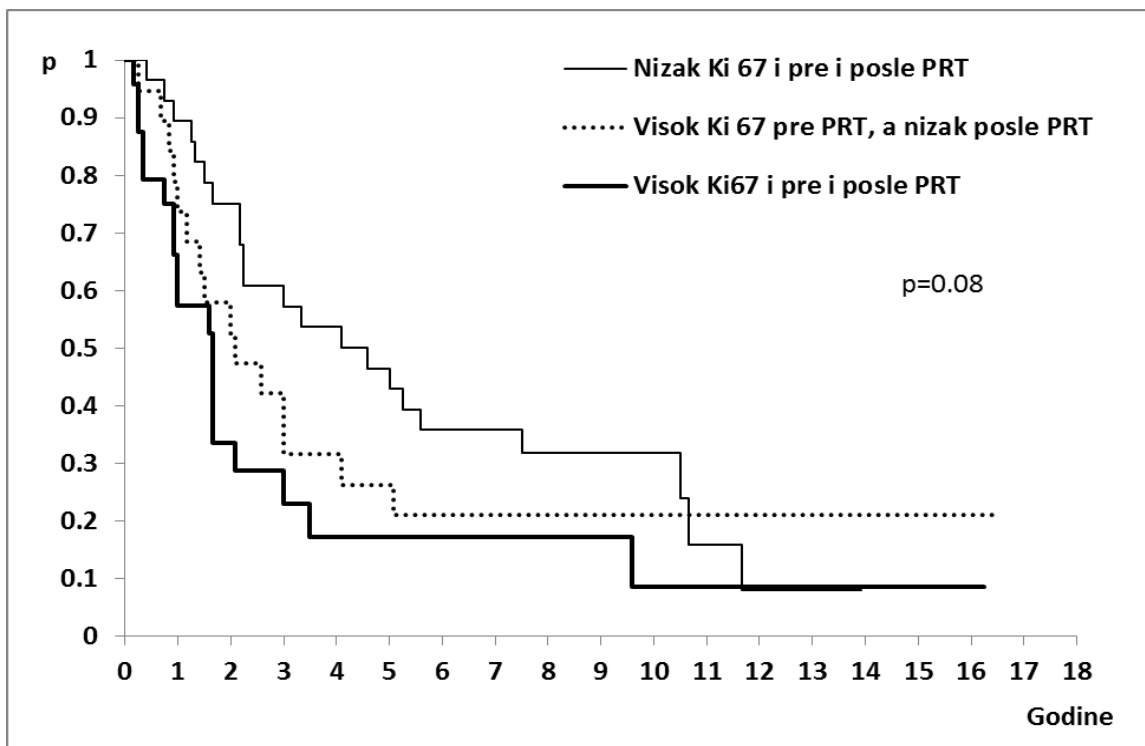
Grafikon 44 . Ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na vrednosti Ki-67 pre i posle PRT

Analizom DFS nije dobijena statistički značajna razlika između ove tri grupe bolesnika (Tabela 45a, Grafikon 45).

Stopa 5-godišnjeg DFS u prvoj grupi bila je 42.9% (CI:28-65%), u drugoj grupi 26.3% (CI:12-55%) i u trećoj grupi 17.2% (CI:6-45%).

Takođe nije dobijena statistički značajna razlika ni u dužini DFI (Tabela 45a).

Bolesnice koje su imale nizak Ki-67 i pre i posle PRT imale su značajno duže preživljavanje u odnosu na ostale dve kategorije bolesnika. Takođe je i preživljavanje bez relapsa bolesti kod ovih bolesnika je bilo duže, ali to nije bilo statistički značajno. Tabela 45a.



Grafikon 45. Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na vrednosti Ki-67 pre i posle PRT

Analiziran je i klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na vrednosti Ki-67 pre i posle PRT. Statistički nije potvrđena razlika u odnosu na klinički odgovor tumora na PRT i vrednosti Ki-67. (Fisher Exact test, $p=0.51$) (Tabela 46).

Tabela 46. Klinički odgovor tumora na PRT u odnosu na vrednosti Ki-67 pre i posle PRT

Klinički odgovor	Nizak Ki-67 pre i posle PRT	Visok Ki-67 pre PRT a nizak posle	Visok Ki-67 i pre i posle PRT	NA	Ukupno
cCR	6 (20.7%)	1 (5.0%)	3 (12.0%)	19 (31.7%)	29 (21.6%)
cPR	16 (55.2%)	14 (70.0%)	18 (72.0%)	27 (45.0%)	75 (56.0%)
cSD	7 (24.1%)	5 (25.0%)	4 (16.0%)	14 (23.3%)	30 (22.4%)
Ukupno	29 (100%)	20 (100%)	25 (100%)	63 (100%)	134 (100%)

cCR: klinički kompletan odgovor; cPR: klinički parcijalna odgovor; cSD: klinički stabilna bolest; NA: nepoznato

Analizom patohistološke procene odgovora tumora na PRT u odnosu na promene vrednosti Ki-67 posle primenjene PRT, takodje nije potvrđena statistički značajna razlika (Fisher Exact test, $p=0.23$) (Tabela 47). Medjutim može se uočiti da bolesnice koje su imale visoke vrednosti Ki-67 i pre i posle PRT imaju bolji odgovor na PRT u smislu većeg postizanja pCR i pNCR (24%) u odnosu na bolesnice sa niskim vrednostima KI-67 pre i posle PRT (10.3%).

Tabela 47. Patohistološka procena odgovora tumora na PRT u odnosu na vrednosti Ki-67 pre i posle PRT

<i>Patohistološki odgovor</i>	<i>Ki-67 nizak pre i posle PRT</i>	<i>Ki-67 visok pre, a nizak posle PRT</i>	<i>Ki-67 visok pre i posle PRT</i>	<i>NA</i>	<i>Ukupno</i>
pCR	2 (6.9%)	1 (5%)	2 (8%)	7 (11.7%)	12 (9%)
pNCR	1 (3.4%)	1 (5%)	4 (16%)	2 (3.3%)	8 (6%)
pPR	24 (82.8%)	16 (80%)	13 (52%)	10 (16.7%)	63 (47%)
pNC	2 (6.9%)	2 (10%)	6 (24%)	1 (1.7%)	11 (8.2%)
NA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	40 (66.6%)	40 (29.8%)
<i>Ukupno</i>	29 (100%)	20 (100%)	25 (100%)	60 (100%)	134 (100%)

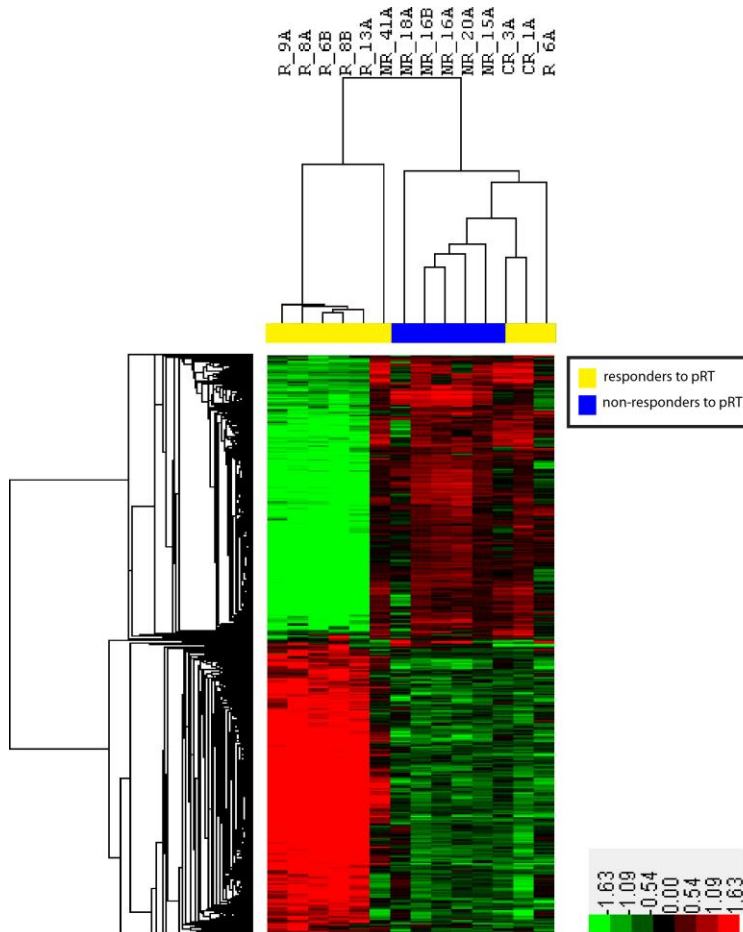
pCR: patohistološki kompletan odgovor; pNCR: patohistološki skoro kompletan odgovor; pPR: patohistološki parcijalni odgovor; pNC: patohistološki bez promene; NA: nepoznato

4.11. REZULTATI GENSKE ANALIZE

Za analizu genske ekspresije uzeto je 43 uzoraka tumora koji su nasumično izabrani (vodeći računa o ravnomernoj zastupljenosti sve tri vrste kliničkog odgovora na PRT (CR, PR, SD). Zbog lošeg kvalitete izolovane RNK iz FFPE, samo 23 uzoraka je odabrano za microarray hibridizaciju. Na osnovu kontrole kvaliteta (QC), 14 uzoraka je prošlo QC i bilo uključeno u naknadne analize podataka. Od tih 14 uzoraka koji su dalje analizirani, 8 je procenjeno kao non-responderi (NR) (kod bolesnica je registrovana stabilna bolest na PRT) dok je 6 uzoraka procenjeno kao responderi (R) (2 bolesnice su imale pCR a 4 PR).

4.11.1. Klaster analiza pre RT i post RT uzoraka tumora

Analiza prirodnog grupisanja (korišćenjem Pearson-ove korelacije) 20% najviše izmenjenih gena pokazala je jasno razdvajanje između non-respondera i respondera. Klaster analiza parova uzoraka pre i posle primenjene PRT pokazala je da se i pre-PRT i post-PRT uzorci grupišu prema svom odgovoru na radioterapiju (Slika 7). Klaster analiza koja je uključivala samo pre-RT uzorke takodje je potvrdila odvajanje respondera i non-respondera.



Slika 7. Nesupervizovana hijerarhijska klaster analiza 20% najviše izmenjenih gena kod 14 FFPE uzoraka

4.11.2. Različito eksprimirani geni između radio-senzitivnih i radio-rezistentnih tumora

Da bi proučili biološke osnove različitog odgovora na PRT analizirali smo samo uzorke tumora pre sprovedene RT, tražeći razlike u osnovnom transkripcionom profilu (ekspresije celokupne iRNK) između radio-senzitivnih (pCR i PR) i radio-rezistentnih (SD) tumora. Poređenjem transkriptoma radio-senzitivnih vs radio-rezistentnih tumora dojke, korišćenjem

t-testa (limma), identifikovano je 192 značajno različito eksprimiranih mRNK transkripata sa više od dva puta većom razlikom u apsolutnim vrednostima i stopu lažnih otkrića (false discovery rate: FDR) od < 0.1, uključujući i 89 gena koji kodiraju proteine i 76 dugih nekodirajućih RNK (long non-coding RNA-lncRNA). Ukupno 17 mRNA transkripata imalo je FDR < 0,05 i stepen promene > 2, uključujući 8 protein kodirajućih gena (PCG). Od toga u radiosensitivnim tumorima, samo 7 gena je bilo pojačano regulisano, dok je većina gena (185) bila smanjeno regulisana. Dvadeset različito eksprimiranih protein kodirajućih gena je prikazano u Tabeli 48.

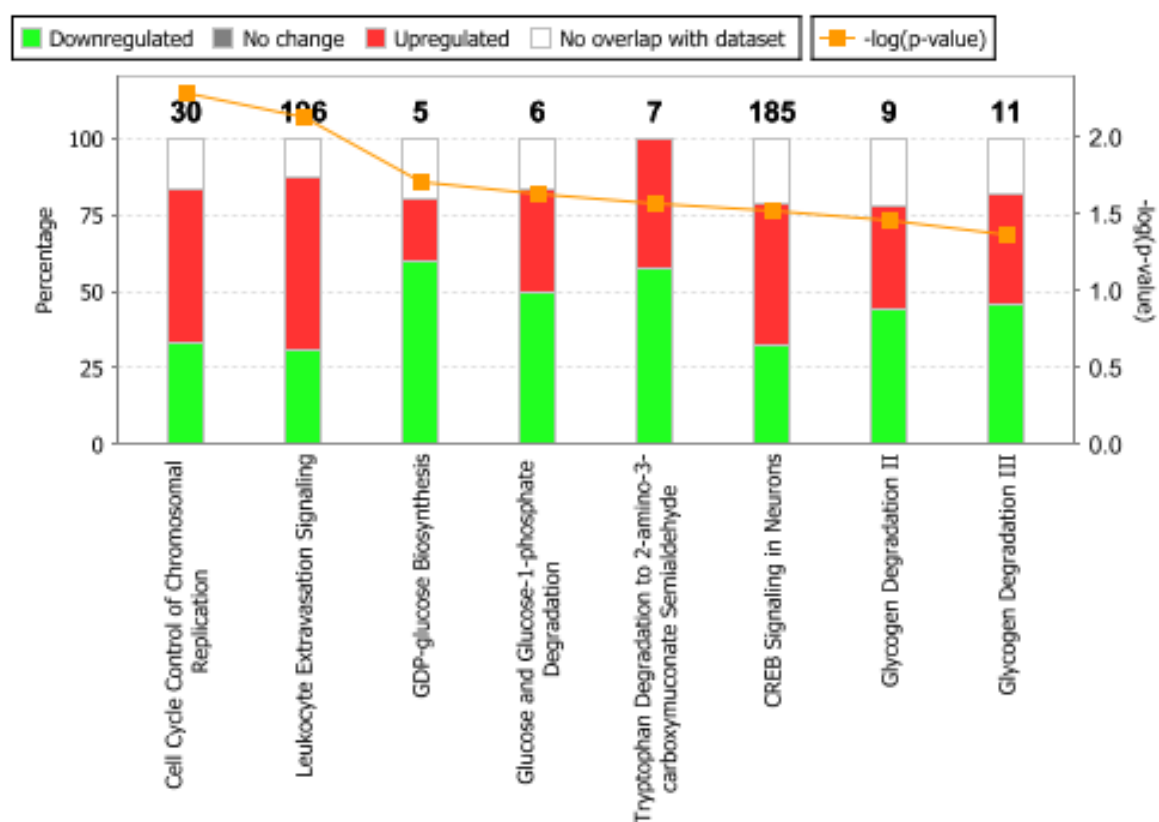
Tabela 48. Top 20 značajno različito eksprimiranih protein kodirajućih gena

Table 1. Top 20 significantly differentially expressed protein coding genes between radio-sensitive and radioresisten preRT tumor samples												
Gene #	Gene Symbol	Gene Name	Cytoband	unadjusted p-value	FDR-adjusted	log2(FC)	Fold Change	Radiosensitiv Mean	sd	Radioresistan Mean	sd	Super-Pathways
1	ST3GAL4	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4	11q24.2	0.00000	0.03715	-3.33	0.10	8.23	0.72	11.56	0.89	<i>protein glycosylation</i>
2	C6orf105 (ADTRP)	chromosome 6 open reading frame 105 (Androgen-Dependent TFPI-Regulating Protein)	6p24.1	0.00000	0.03715	-2.55	0.17	8.69	0.37	11.24	0.73	No Data Available
3	RAP1GAP2	RAP1 GTPase activating protein 2	17p13.3	0.00001	0.03781	-2.50	0.18	8.96	0.47	11.46	0.75	<i>Immune System</i>
4	A1CF	APOBEC1 complementation factor	10q11.23	0.00001	0.03874	-2.55	0.17	8.30	0.59	10.85	0.70	<i>mRNA Editing and Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA</i>
5	MAP3K4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	6q26	0.00001	0.03874	-2.00	0.25	8.41	0.28	10.41	0.53	<i>MAPK signaling pathway</i>
6	CHD5	chromodomain helicase DNA binding protein 5	1p36.31	0.00002	0.05133	-2.69	0.15	9.73	0.89	12.43	0.56	<i>ATP-dependent helicase activity</i>
7	LAS1L	LAS1-like (S. cerevisiae)	Xq12	0.00002	0.05209	-2.40	0.19	9.95	0.68	12.35	0.61	<i>biogenesis of the 60S ribosomal subunit.</i>
8	DEFB128	defensin, beta 128	20p13	0.00003	0.05781	-1.81	0.29	9.02	0.40	10.83	0.42	<i>Immune System</i>
9	ENHO	energy homeostasis associated cat eye syndrome chromosome region, candidate 9 (non-protein coding)	9p13.3	0.00003	0.05781	-2.11	0.23	7.56	0.56	9.67	0.56	<i>metabolism</i>
10	CECR9	region, candidate 9 (non-protein coding)	22q11.1	0.00003	0.05781	-2.32	0.20	8.32	0.74	10.64	0.58	<i>unknown</i>
11	IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	8p11.21	0.00004	0.05781	-2.35	0.20	8.97	0.72	11.32	0.63	<i>Tryptophan metabolism</i>
12	LRRCS5	leucine rich repeat containing 55	11q12.1	0.00004	0.05788	-2.88	0.14	9.65	0.99	12.53	0.84	<i>ion channel</i>
13	ROGDI	rogdi homolog (Drosophila)	16p13.3	0.00004	0.05788	-1.95	0.26	8.67	0.44	10.62	0.58	<i>unknown</i>
14	KRT25	keratin 25	17q21.2	0.00004	0.05796	-2.20	0.22	7.78	0.50	9.98	0.77	<i>cytoskeleton</i>
15	LAMA4	laminin, alpha 4	6q21	0.00005	0.05798	-1.98	0.25	7.52	0.36	9.50	0.70	<i>Focal Adhesion, ECM-receptor interaction</i>
16	PLA2G2C	phospholipase A2, group IIC	1p36.12	0.00005	0.05798	-2.71	0.15	9.30	0.94	12.01	0.79	<i>alpha-Linolenic acid metabolism and Glycerophospholipid biosynthesis</i>
17	CCDC114	coiled-coil domain containing 114	19q13.33	0.00005	0.05798	-2.00	0.25	7.86	0.58	9.85	0.53	<i>cell motility</i>
18	CNGB1	cyclic nucleotide gated channel beta 1	16q21	0.00005	0.05798	-1.87	0.27	7.89	0.59	9.76	0.32	<i>cAMP binding and intracellular cAMP activated cation channel activity</i>
19	PRSS53	protease, serine, 53	16p11.2	0.00006	0.05798	-1.72	0.30	7.76	0.15	9.49	0.60	<i>serine-type endopeptidase activity</i>
20	GSG1	germ cell associated 1	12p13.1	0.00006	0.05798	-2.21	0.22	7.70	0.68	9.90	0.65	<i>RNA polymerase binding</i>

4.11.3. Funkcionalna analiza radio-senzitivnog genskog zapisa

Da bi utvrdili koji su to biološki procesi i signalni putevi povezani sa radiorezistencijom, primenili smo funkcionalnu analizu genskog zapisa korišćenjem Ingenuity Pathways Analysis softvera. Najviše izmenjeni signalni putevi bili su povezani sa sledećim biološkim

funkcijama: metabolizmom lipida, molekularnim transportom, biohemijom malih molekula, replikacijom DNK, rekombinacijom i popravkom, kancerom (Slika 8).



Slika 8. Značajno izmenjeni signalni putevi

Nije iznenađujuće da se signalni putevi (Fisher-ov test, $p < 0,05$), uključuju kontrolu ćelijskog ciklusa hromosomske replikacije, kao i signalni putevi koji se odnose na metabolizam glukoze i de novo biosintezu NAD-a (nikotin amid dinukleotid), različito aktiviraju između RT rezistentnih i RT osetljivih tumora, što ukazuje na to da bioraspoloživost NAD-a može imati važnu ulogu u mehanizmu radiosenzitivnosti.

4.11.4. Validacija gena kandidata kvantitativnim Real-Time PCR-om (qRT PCR)

Kandidati biomarkeri radiorezistencije izabrani su između različito eksprimiranih gena na osnovu statistički značajnih visokih nivoa ekspresije u tumorskom tkivu i mogućih bioloških funkcija. Deset značajno različito eksprimiranih gena (CHEK2, XRCC2, MCM6, MAP3K4, MMP14 APOA1, WHSC1L1, IDO1, ST3Gal-4 i A1CF) odabrani su za validaciju qRT-PCR

u nezavisnom setu 60 LABC pre-RT FFPE uzoraka tumora. Uzorci gde je > 70% testova bilo neuspešno su odbačeni, a 42/60 uzoraka je bilo validno za statističke analize. Razlike u ekspresiji gena između radio-senzitivnih (n = 30), i radio-rezistentnih tumora (n = 12) su procenjavane ili t-testom za normalno distribuirane gena ili Mann-Whitney neparametrijskim testom. Rezultati su prikazani u Tabeli 49. Pokazane su značajne razlike u ekspresiji za APOA1 gen, dok su MAP3K4 i MMP14 geni ispoljili trend ka više od dva puta smanjenoj ekspresiji u radio-senzitivnim tumorima. Nakon stratifikacije prema statusu receptora za estrogen, za sva 3 gena je pokazano da su značajno smanjeno regulisani u radio-rezistentnim ER pozitivnim tumorima, dok nije uočena značajna razlika u ekspresiji kod ER negativnih tumora.

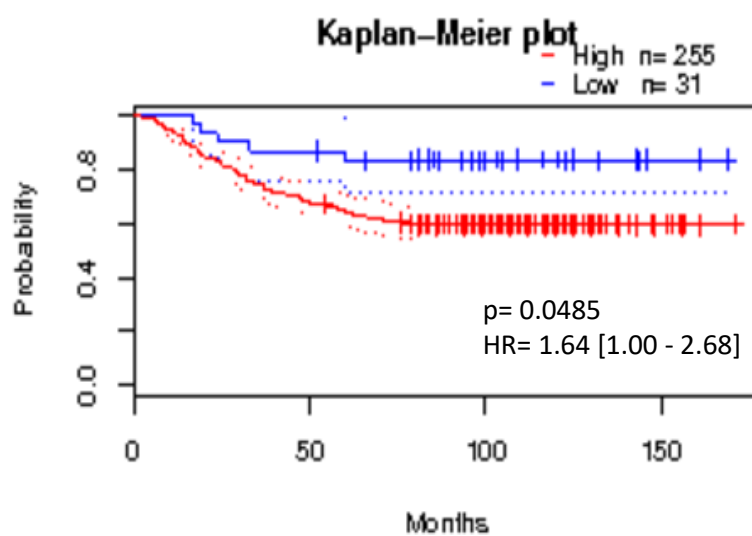
Tabela 49. Kvantitativna Real-Time PCR analiza 10 gena kandidata

		qRT-PCR data (n=42)				t-test	Wilcoxon rank-sum	CHANGE	
		radiosensitive (RS) (n=30)		radioresistant (RR) n=12					
#	Gene Symbol	Amplicon Length	mean	sd	mean	sd	p-value	p-value	log2(FC)
1	APOA1	63	5.99	1.96	7.55	1.37	0.0161**	0.018*	-1.56
2	CHFK2	109	-4.63	1.69	-4.18	1.06	0.3901	0.2102	-0.46
3	IDC1	106	1.06	2.87	0.63	2.87	0.6620	0.4691	0.43
4	MAP3K4	89	-3.00	1.99	-1.78	1.28	0.0582*	0.1190	-1.21
5	MCM6	109	-5.12	1.98	-4.88	2.34	0.7406	0.7594	-0.24
6	MMP14	97	7.85	2.85	9.61	2.03	0.0596*	0.0481*	-1.76
7	ST3GAL4	60	-3.95	2.68	-3.38	3.32	0.5655	0.3730	-0.57
8	WHSC111	67	-0.98	3.90	-1.16	4.61	0.8981	0.9334	0.18
9	XRCC2	66	-4.68	2.08	-4.04	2.13	0.3788	0.3438	-0.64

Gene expression was determined by qRT-PCR in independent test set of 60 FFPE breast tumors, of which 42 were retained for data analysis. Represented data are normalized to β -Actin and standardized mean values with standard deviation. p-values = level of significance according to the Student's t-test or Mann-Whitney test; FC: fold change difference in gene expression comparing radiosensitive (R) to radioresistant (RR) tumors measured by qRT-PCR.

4.11.5. Eksterna validacija prediktivne vrednosti kandidat gena za odgovor na radioterapiju

Dostupnost objavljenih microarray podataka kod kancera pruža priliku za povezivanje ekspresije gena sa prognozom bolesti. Da bi procenili da li ekspresija APOA1, MAP3K4 i MMP14 gena ima uticaj na DFS koristili smo u literaturi već opisanu kohortu nodus negativnih pacijenata kod kojih je učinjena radikalna mastektomija. (Erasmus-GSE2034) u okviru PrognoScan baze podataka. Samo smanjena ekspresija MMP14 gena (cutoff= 0.11) bila je značajno povezana sa boljim DFS (p = 0,048; HR = 1,64, 95% CI [1,00-2,88]) Slika 9.



Slika 9. Kaplan-Meier krive preživljavanja za grupe sa visokom i niskom ekspresijom MMP14 gena

5. DISKUSIJA

Prema sadašnjim preporukama, većina pacijenata sa LOKD se danas tretira kombinovanim pristupom, tako što se lečenje započinje primarnom ili neoadjuvantnom hemioterapijom (PHT), a potom sledi lokoregionalna terapija – hirurgija i/ili radioterapija (3,7,11,22,38,52). Generalno cilj neoadjuvantne HT je da se smanji veličina primarnog tumora i postigne resektabilnost, u smislu omogućavanja izvodjenja radikalne mastektomije. Međutim, indikacije za PHT su se danas proširile i na velike operabilne tumore, sa ciljem da se omogući manje ekstenzivna hirurgija, odnosno poštena operacija dojke (11,27-29,43). PHT se obično sastoji od primene 6-8 ciklusa kombinacije antraciklina i taksana, kao i HER-2 ciljane terapije (trastuzumaba) u slučaju HER-2 pozitivnog tumora. U tom kontekstu, mesto preoperativne RT u današnjem vremenu, bi bilo u daljem smanjivanju tumora koji nije adekvatno odreoagovao na primenjenu neoadjuvantnu HT, a u cilju omogućavanja što bezbednije operacije (52,141).

Nekoliko decenija ranije, pre uvođenja neoadjuvantne HT u lečenje LOKD, preoperativna RT se obično primenjivala kao inicijalna terapija za lokalno uznapredovale tumore. U skorašnjoj literaturi ima vrlo malo podataka o rezultatima PRT kao inicijalne terapije LOKD. Jedna od retkih publikacija, objavljena 2017.g. je rad Rieta i sar. iz Instituta Gustave Roussy iz Pariza, koji su prikazali rezultate preoperativne RT nakon 32 godine praćenja kod 187 pacijenata sa LOKD (142). Zračna terapija je sprovedena u periodu od 1970 – 1984.g. sa TD 45 Gy u 18 frakcija na regiju dojke i regionalnih limfatika (supraklavikularnih, aksilarnih i limfnih čvorova uz a. mamariju internu). Nakon zračne terapije kod svih pacijenata je učinjena radikalna mastektomija i sprovedena adjuvantna hemioterapija i/ili hormonska terapija. Patohistološki CR u dojci i aksili posle sprovedene PRT zabeležen je kod 10% pacijenata, a pojava lokoregionalnog recidiva kod 8%. Stopa 10-godišnjeg, 20-godišnjeg i 30-godišnjeg DFS iznosila je 47% , 35% i 27%, dok je stopa 10- , 20- i 30-godišnjeg OS bila 55%, 41% i 25%. Zahvaćenst aksilarnih limfnih čvorova bila je negativni prognostički faktor za DFS i OS ($p=0.002$, $p=0.0002$)

Još jedan rad francuskih autora prikazao je rezultate preoperativne RT kao inicijalne terapije T2 i T3 tumora, ali u cilju sprovođenja poštena operacije. Calitchi E. i sar. su

objavili rezultate preoperativne RT kod 74 pacijenata zračenih u periodu od 1977 - 1992. g. sa TD 45 Gy u 25 frakcija na regiju dojke i svih regionalnih limfatika (143). Posle učinjene tumorektomije dodat je boost na ležište tumora sa TD 20 Gy intersticijalnom brahiterapijom. Kompletna patohistološka regresija tumora u dojci registrovana je kod 11% pacijenata. Adjuvantna hemioterapija i/ili hormonska terapija primenjene su nakon operativnog lečenja prema protokolu Ustanove. Srednje vreme praćenja bilo je 10 godina. Relaps bolesti je zabeležen kod 47% pacijenata, od toga 12% je imalo lokalni recidiv.

Rezultati naše analize 134 bolesnica sa LOKD su pokazali da je pCR u dojci ostvaren kod 15% bolesnica, a pCR istovremeno u dojci i aksili kod 6.7%. Relaps bolesti je registrovan kod 61,9% bolesnica, dok je 7.5% dobilo lokalni recidiv. Petogodišnje i 10-godišnje stope ukupnog preživljavanja (OS) bile su 56% i 37,8%, dok su 5-godišnje i 10-godišnje stope preživljavanja bez relapsa bolesti (DFS) bile 39,2% i 27%. Naši rezultati lokalne kontrole su slični rezultatima prethodne dve pomenute publikacije. Medjutim stopa pojave relapsa bolesti je veća, dok je preživljavanje manje u odnosu na podatke iz literature. Mogući razlog za to možemo naći u velikom broju bolesnica sa zahvaćenim aksilarnim limfnim čvorovima. Naime, 88% bolesnica u našoj studiji je inicijalno imala klinički N2 nalaz u aksili, dok je nakon učinjene mastektomije 83% imalo pN-pozitivan nalaz, što može da objasni niže stope preživljavanja (OS i DFS) u odnosu na podatke iz literature. Riet i sar. su objavili da je u njihovoj seriji pacijenata 60% imalo pozitivne limfne čvorove u aksili nakon sprovedene PRT i mastektomije (142). U izveštaju Calitchi-a i sar. od 74 analiziranih pacijentkinja, samo je jedna imala klinički N2 nalaz, dok je 75% bilo klasifikovano kao cN0 i 14% cN1 (143). U našoj seriji bolesnica većina je imala klinički zahvaćene limfne čvorove u aksili (N2), te je bilo i očekivano lošije preživljavanje.

Kako se danas preoperativna RT kao inicijalna mono-terapija rutinski ne sprovodi, nešto više podataka u literaturi ima o kombinovanom HT-RT neoadjuvantnom tretmanu LOKD. Preoperativna RT je kombinovana sa HT sekvencijalno ili konkomitantno. Medjutim, bez obzira što se danas kombinovana HT-RT standardno primenjuje u lečenju lokalno uznapredovalih tumora mnogih organa (tumora glave i vrata, pluća, rektuma, jednjaka), u lečenju LOKD još uvek nije našla široku primenu. Imajući u vidu da su pacijenti sa LOKD od samog početka u visokom riziku za pojavu relapsa bolesti (i lokoregionalnog i udaljenog), smatra se da istovremena primena sistemske i lokoregionalne terapije može da donese veliku korist (76,77,144).

Najveći izveštaj o neoadjuvantnoj HT-RT lokalno uznapredovalih tumora dojke dolazi iz Južne Indije. Shanta i sar. su prikazali rezultate velike retrospektivne serije od 1117

pacijenata sa LOKD koji su lečeni u periodu od 1990-1999. g. (145). Pacijenti su primali konkomitantnu HT (CMF ili FAC ili FEC) i PRT sa dozom od 40 Gy u 20 frakcija na regiju dojke i regionalnih limfatika, a 3-6 nedelja po završenoj RT učinjena je radikalna mastektomija. Pokazan je veoma visok procenat pCR tumora u dojci (45,1%) i vrlo nizak procenat lokalnog recidiva (7%). Stopa 5-godišnjeg i 10-godišnjeg preživljavanja (OS) bila je 75,6% i 63,9%, dok je 5-godišnja i 10-godišnja stopa DFS bila 64,5% i 52,6%. Autori su naveli da je najduže preživljavanje zabeleženo kod pacijenata koji su ostvarili pCR nakon neoadjuvantne kombinovane HT-RT.

U rezultatima naše studije je takodje zabeležena niska stopa lokalnog recidiva (7.5%) i to bez primenjene neoadjuvantne HT, što govori u prilog tome da RT ima važniju ulogu u lokalnoj kontroli od sistemske terapije.

Isti autori su u svom ranijem izveštaju prikazali rezultate poredjenja konkomitantne PHT-PRT sa samo PRT, nakon čega je sledila mastektomija (146). Jedna grupa pacijenata (N=211) primala je HT po režimu CMF kombinovano sa RT dojke i regionalnih limfatika sa TD 40 Gy u 20 frakcija, dok je druga grupa (N=164) tretirana samo primenom PRT. Kompletna tumorska regresija u dojci je postignuta kod 42.1% pacijenata u konkomitantnoj HT-RT grupi, i 18.9% u PRT grupi. Autori su zabeležili značajnu prednost u preživljavanju u kombinovanoj HT-RT grupi. Petogodišnja stopa DFS je bila 60.6% u HT-RT grupi vs 47.5% u PRT grupi ($p < 0.005$).

Još jedno poredjenje kombinovane HT-RT sa samo PRT prikazano je u radu Semiglazova i sar.(147). On je objavio rezultate randomizovane faze III studije, gde je poredjena konkomitantna PHT-PRT sa samo PRT u 271 pacijenta sa LOKD (stadijuma IIB-III A). Neoadjuvantna HT se sastojala od kombinacije citostatika: tiotepa, metotreksata i 5-fluorouracila, dok je PRT podrazumevala primenu TD 60 Gy/2 Gy po frakciji na regiju dojke i TD 40 Gy na regionalne limfne čvorove. Posle završenog preoperativnog lečenja, kod svih pacijenata je učinjena radikalna mastektomija i sprovedena adjuvantna HT po istom protokolu kao i pre hirurgije. Patohistološki CR u dojci je registrovan kod 29.1% pacijenata u kombinovanoj grupi i 19.4% u PRT grupi ($p < 0.05$). Petogodišnja stopa preživljavanja (OS) bila je 86.1% u kombinovanoj grupi i 78.3% u PRT grupi (Log-Rank test, $p > 0.05$), dok je 5-godišnja stopa DFS bila 81% vs 71.6% (Log-Rank test, $p < 0.05$).

Alvarado-Miranda i sar. prikazali su rezultate konkomitantne HT-RT na 112 pacijenata sa LOKD (stadijuma IIB-III B), koji su tretirani neoadjuvantnom HT (FAC ili AC), a potom kombinacijom RT-HT (TD 60 Gy na regiju dojke i nedeljna primena Mitomicina, 5-FU i deksametazona ili cisplatin, gemcitabin i deksametazon) (112). Po završenom

neoadjuvantnom lečenju, kod svih pacijenata je učinjena radikalna mastektomija. Patohistološki CR u dojci registrovan je u 42% pacijenata, a pCR u dojci i aksili u 29.5% pacijenata. Petogodišnja stopa DFS i OS bila 76.9% i 84.2%. Pojava lokoregionalnog recidiva zabeležena je samo kod jednog pacijenata (1%).

Ipak, u poslednjih deset godina, najviše je ispitivana kombinacija taksana i istovremene primene PRT. Većina izveštaja o konkomitantnoj primeni taksana i PRT je bila na relativno malom broju pacijenata (do 44), a rezultati su pokazali da je pCR ostvarivan u rasponu od 16-34% (76). Primena paklitaksela u kombinaciji sa preoperativnom RT istraživana je i u radu Adamsa i sar. na 105 pacijenata sa LOKD (stadijuma IIB-IIIC) (113). Paklitaksel je primenjivan u intervalu 10-12 nedelja sa istovremenom primenom PRT na regiju dojke i regionalnih limfatika sa TD 45 Gy (1,8 Gy po frakciji) i „boost“ dozom na regiju tumora sa TD 14 Gy (2 Gy po frakciji). Odgovor na HT-RT (pCR i pPR) postignut je u 34% pacijenata i bio je udružen sa značajno boljim DFS i OS. Petogodišnja stopa DFS i OS bila je 61.4% i 71.6%.

Poredjenjem rezultata postignutog pCR u dojci kod bolesnica inicijalno tretiranih samo PRT (11-19%) i bolesnica tretiranih konkomitantnom HT-RT (16-45%), može se videti da je kod kombinovanog neoadjuvantnog pristupa pCR više od dva puta veći, a takodje su zabeležene i veće stope OS i DFS.

Opisivana toksičnost kombinovane HT-RT je bila prihvatljiva, a manifestovala se neutropenijom GR I-II i radioepitelitisom GR II-III (112,145). U literaturi je takodje pokazano da primena PRT ne povećava postoperativni morbiditet posle učinjene mastektomije, kao ni komplikacije kod pacijenata sa učinjenom primarnom rekonstrukcijom (148).

Neoadjuvantna HT kao indukciona ili preoperativna terapija LOKD se primenjuje unazad već nekoliko decenija. Pored toga, primena neoadjuvantne HT je proširena i na velike operabilne tumore, sa ciljem postizanja bolje loko-regionalne kontrole i omogućavanja poštredne operacije dojke. Poznato je da pacijenti koji postignu pCR na neoadjuvantnu HT antraciklinima imaju značajno veći DFS i OS u poredjenju sa non-responderima (4,11,30). Medjutim procenat pCR koji se postiže nakon standardne HT je relativno nizak i kreće se od 7-31% (46,149). Izuzetak čine pacijenti sa HER-2 pozitivnim karcinomom dojke gde se pCR postiže i u do 50% slučajeva ukoliko se u neoadjuvantnom pristupu primenjuje HER-2 ciljana terapija kao što je trastuzumab i lapatinib (35,150), ili trastuzumab i pertuzumab (36,151).

Samim tim se pCR pojavio kao novi prediktivni faktor ishoda bolesti, odnosno preživljavanja (30). Tako je poboljšanje stope pCR-a postao osnovni cilj svih neoadjuvantnih tretmana sa očekivanjem i poboljšanja preživljavanja.

Medjutim, sama definicija pCR je dosta kontroverzna, kao što su i metode njene evaluacije, pa i sama prediktivna vrednost pCR-a kod pacijenata sa različitim biološkim podtipovima karcinoma dojke.

U literaturi se može naći nekoliko patohistoloških klasifikacija odgovora na neoadjuvantnu terapiju. U nekim studijama se pCR odnosio samo na tumor u dojci, dok su druge uključivale i žlezde u aksili (152,153). Pojedine studije su uključivale prisustvo fokusa invazivnog karcinoma (154) ili rezidue u vidu DCIS, ali najviše prihvaćena definicija pCR podrazumeva da nema invazivnog tumora u dojci (ypT0) i da nema zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova (ypN0) (155). Neki autori ipak sugerišu da pacijenti sa rezidualnim DCIS mogu da se smatraju da imaju pCR (156,157).

Odnos pCR-a i dugoročnog ishoda bolesti prikazan je u zbirnoj analizi 12 internacionalnih neoadjuvantnih trajala, koja je uključila 11955 pacijenata kod kojih je primenjivana neoadjuvantna HT na bazi antraciklina i taksana (tri studije su uključile i primenu trastuzumaba kod HER-2 pozitivnih pacijenata) (158). Poredjene su tri načešće definicije pCR: ypT0 ypN0 (odsustvo invazivnog ili in situ karcinoma u dojci i aksilarnim limfnim čvorovima), ypT0/is ypN0 (odsustvo invazivnog karcinoma u dojci i aksilarnim limfnim čvorovima, bez obzira na DCIS) i ypT0/is (odsustvo invazivnog karcinoma u dojci bez obzira na DCIS ili zahvaćenost aksilarnih limfnih čvorova). Pokazano je da je ukupna učestalost pCR bila niska i da je njena vrednost opadala sa povećanjem strogoće kriterijuma definicije pCR-a: 22% u pacijenata sa ypT0/is, 18% kod ypT0/is ypN0 i 13% kod ypT0 ypN0. Pacijenti koji su postigli pCR imaju duže EFS (event-free survival) i OS u odnosu na pacijente sa rezidualnim invazivnim karcinomom. Takođe je primećeno da je eradikacija tumora u dojci i u limfnim čvorovima (ypT0 ypN0 ili ypT0/is ypN0) imala veću udruženost sa poboljšanjem EFS i OS u odnosu na eradikaciju samo tumora u dojci (ypT0/is). Pored toga, ova analiza je pokazala da prisustvo ili odsustvo DCIS nije uticalo na dugoročni ishod bolesti.

Sličnu analizu prikazala je i nemačka grupa autora na 6377 pacijenata u okviru sprovedenih 7 neoadjuvantnih trajala u kojima je primenjivana HT na bazi antraciklina i taksana (u dva trajala je primenjivan i trastuzumab kod HER-2 pozitivnih pacijenata) (159). Medjutim oni su pokazali da pacijenti sa ypT0 ypN0 imaju bolji DFS u odnosu na pacijente sa ypT0/is ypN0 (HR:1.74; 95%CI:1.28-2.36; p<0.001), a pokazan je i trend ka boljem OS (HR:1.41; 95%CI:0.87-2.29; p=0.166). Pacijenti sa ypT0/is ypN+ su imali najlošiji OS i DFS.

Takodje su i rezultati kombinovane HT-RT u neoadjuvantnom pristupu zabeležili bolje preživljavanje (OS i DFS) kod bolesnica koje su postigle pCR na terapiju (113,145,146).

Naši rezultati su isto tako potvrdili da bolesnice koje su postigle kompletan klinički odgovor (cCR) kao i kompletan patohistološki odgovor u dojci (pCR) na PRT, imaju bolji OS i DFS u odnosu na bolesnice koje su nakon PRT procenjene kao PR ili SD. Desetogodišnja stopa ukupnog preživljavanja (OS) kod bolesnica sa postignutim cCR bila je 56%, dok je kod onih sa cPR i cSD bila 31% odnosno 36%, što je statistički bila značajna razlika ($p=0,038$). Takodje je i 10-godišnja stopa DFS bila bolja u cCR grupi i iznosila je 46% u odnosu na cPR (22%) i cSD (16%), ali bez statističke značajnosti. To isto je pokazano i za bolesnice koje su imale patohistološku procenu odgovora na PRT. Bolesnice koje su postigle pCR+pNCR+pN0 su imale 10-godišnju stopu ukupnog preživljavanja (OS) 60%, u odnosu na sve ostale bolesnice, kod kojih je OS iznosila 36% ($p=0.096$). I 10-godišnja stopa DFS je bila veća u toj grupi i iznosila je 50.8% u odnosu na ostale bolesnice - 25.1% ($p=0.056$), ali u oba slučaja, ova razlika nije pokazano kao statistički značajna (najverovatnije zbog malog broja bolesnica). Medjutim, u pogledu dužine DFI, dobijena je statistički značajna razlika. Desetogodišnja stopa DFI za bolesnice sa pCR+pNCR+pN0 bila je 63.5% u odnosu na ostale bolesnice - 30.3% ($p=0.033$).

Pored postizanja pCR-a, jedan od najvažnijih prognostičkih faktora posle neoadjuvantne terapije je nalaz veličine rezidualnog tumora i status aksilarnih limfnih čvorova nakon mastektomije. Rezidualni tumor zapravo predstavlja široki spektar nalaza, počev od pNCR- skoro kompletnog odgovora, odnosno minimalnog nalaza rezidualne bolesti, pa sve do minimalne regresije tumora na neoadjuvantnu terapiju.

Symmans i sar. su razvili sistem gradiranja rezidualne bolesti na osnovu patohistološke veličine zaostalog primarnog tumora i metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima (160). Pokazali su da bolesnice sa minimalnim rezidualnim tumorom u dojci imaju isto petogodišnje preživljavanje kao i one koje su postigle pCR.

Buchholz i sar. iz MD Anderson Cancer Center-a su analizirali patohistološku veličinu tumora i broj pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova nakon neoadjuvanten HT kod 150 pacijenata, stadijuma IIA-IIIB (u većini slučajeva primenjen doksorubicin, a kod manjeg broja pacijenata paklitaksel) (161). Veličina rezidualnog tumora posle primenjene neoadjuvantne HT bila je : ≤ 2 cm kod 49% pacijenata, od 2-5 cm kod 37% i > 5 cm kod 9% pacijenata, dok je negativan nalaz u aksili zabeležen u 41% pacijenata, pozitivna 1-3 limfna čvora u 28% i

pozitivno > 4 limfna čvora u 27 % pacijenata. Autori su pokazali da veličina rezidualnog tumora kao i broj zahvaćenih limfnih čvorova pozitivno korelira sa stopom pojave lokalnog recidiva ($p=0.0048$, $p<0.0001$).

I u analizi 7 velikih neoadjuvantnih studija nemačkih autora isto tako je utvrđeno da veličina rezidualnog tumora nakon PHT, statistički je značajno povezana sa prognozom, naročito za ypT3 i ypT4 tumore ($p<0.001$), koji imaju najlošiju prognozu. Slično je i sa nalazom u aksili. Pacijenti sa ypN2 i ypN3 imaju medijanu DFS 70 meseci, odnosno 30 meseci (159).

Rezultati naše studije su takodje pokazali da postoji statistički značajna razlika u pogledu OS i DFS i veličine rezidualnog tumora nakon PRT. Pacijenti kod kojih je ostvarena kompletna regresija tumora, ili koji su imali mikroskopske fokuse tumora u dojci imaju znatno duže preživljavanje (OS i DFS) u odnosu na pacijente koji su imali rezidualni tumor u dojci veći od 20 mm ($p=0.009$ i $p=0.01$). Analizom nodalnog statusa posle sprovedene PRT na nalazu mastektomije, pokazano je da postoji statistički značajna razlika izmđu bolesnica sa negativnim nalazom u aksili i sa pozitivnim nalazom u odnosu na OS, DFS i DFI ($p=0.0004$, $p=0.001$ i $p=0.002$). Naime bolesnice sa negativnom aksilom imaju statistički značajno duže ukupno preživljavanje, preživljavanje bez znakova bolesti i duži slobodni interval.

RT se danas rutinski sprovodi posle poštedne operacije ranog karcinoma dojke i kod pacijenata sa povećanim rizikom za relaps bolesti nakon radikalne mastektomije, a sa ciljem da se smanji verovatnoća pojave LR. Međutim, poznato je da nemaju svi pacijenti koristi od postoperativne RT, zato što će neki i uprkos sprovedenoj RT dobiti lokalni recidiv bolesti. Imajući u vidu heterogenost karcinoma dojke, pokazano je da različiti biološki podtipovi imaju različite verovatnoće pojave LR (162). U jednoj retrospektivnoj analizi operabilnih karcinoma dojke na 2118 pacijenata, zabeleženo je da je rizik za pojavu relapsa bolesti bio najmanji kod pacijenata sa luminal A tumorima, gde je stopa relapsa iznosila 12.7% ($p<0.001$), dok je za luminal B, HER-2 pozitivne i za „basal like“ bila 15.7%, 19.1% i 20.1% (163). Autori su pokazali da za luminal A podtip tumora adjuvantna RT značajno redukuje rizik za relaps ($p=0.005$).

Uticaj bioloških podtipova tumora na odgovor na postoperativnu RT nakon mastektomije ispitan je od strane danske kooperativne grupe za karcinom dojke, koristeći podatke 1000 pacijenata koji su bili uključeni u veliku dansku postoperativnu studiju

(DBCG– trajal 82 b i c) (106). Autori su pokazali da je primenom postoperativne RT posle mastektomije značajno poboljšano preživljavanje (OS) samo kod pacijenata sa luminal A podtipom tumora, dok kod ER/PgR-negativnih i HER2-pozitivnih tumora, nije bilo signifikantnog poboljšanja u OS, što sugerise da je postoperativna RT posebno efikasna za luminal A podtipove (106). Što se tiče redukcije loko-regionalnog recidiva (LRR), uočeno je da postoperativna RT redukuje stopu LRR kod svih potipova tumora, ali je ta redukcija bila najizraženija u pacijenata sa luminal A podtipom tumora, dok su HER-2 pozitivni i trostruko negativni podtipovi tumora pokazali najmanju redukciju stope LRR. Povećana ekspresija HER-2 u kombinaciji sa ER/PgR-negativnim nalazom je bila povezana sa povećanom verovatnoćom pojave LR ($p=0.01$) i udaljenih metastaza ($p=0.02$) i posle primene postoperativne RT, što ukazuje na moguću radiorezistenciju (106). Takođe, i trostruko negativni podtip tumora je bio udružen sa povećanim rizikom za LR, udaljenim metastazama i povećanim mortalitetom kod pacijenata tretiranih RT.

Podaci koji ukazuju na uticaj molekularnih podtipova tumora na pojavu LR kod pacijenata lečenih poštudnom operacijom i postoperativnom RT prikazani su u Harvardskoj analizi (110). U ovoj analizi, koja je uključila 793 pacijenta, incidenca 5-godišnje stope LR bila je 0.8% za luminal A podtipove tumora, 1.5% za luminal B, 8.4% za HER-2 pozitivne tumore i 7.1% za trostruko negativne, što opet sugerise na povećanu stopu LR kod HER-2 pozitivnih i trostruko negativnih podtipova tumora u odnosu na luminal A i B.

U našem istraživanju kod 71 bolesnice je određena biološka klasifikacija tumora. Najviše bolesnica je bilo luminal B podtipa (35,2%), potom trostruko negativnih (28.2%), pa luminal A (21.1%) i HER-2 pozitivnih (15.5%). Uočeno je da pacijenti sa luminal A potipom tumora imaju statistički značajno ($p=0.047$) najduže preživljavanje (stopa 5-godišnjeg OS je bila 92.9%), dok je za luminal B, trostruko negativni i HER-2 pozitivni iznosila 56.5%, 30.6% i 20%. Isto tako je i stopa 5-godišnjeg DFS bila najveća u luminal A podtipu (57.1%) u odnosu na luminal B, trostruko negativni i HER-2 pozitivni (35%, 30.6% i 10%), ali bez statistički značajne razlike ($p=0.22$).

Analiziranjem kliničkog odgovora tumora na PRT, pokazano je da je cCR postignut u 40% bolesnica sa trostruko negativnim tumorom, u odnosu na 6.7% kod bolesnica sa luminal A tumorima. Sa druge strane cSD se najviše opisivao u luminal A tumorima (26.6%) u odnosu na ostale podtipove gde se javljao u rasponu od 15-18%.

Patohistološka procena odgovora tumora na PRT je takođe pokazala da se pCR najviše javljao u trostruko negativnim tumorima (25%) u odnosu na luminal A (6.7%), što je i statistički bilo značajno ($p=0.024$). I pNCR je u najvećem procentu bio zastupljen u trostruko

negativnim tumorima (15%) i HER-2 pozitivnim tumorima (18.2%). Slični rezultati su dobijeni i u radu francuskih autora (142), gde je u 26% pacijenata sa trostruko negativnim tumorima postignut pCR na preoperativnu RT.

Naši rezultati ukazuju da visok procenat odgovora na PRT kod trostruko negativnih tumora korelira sa postizanjem visokog procenta pCR-a i na neoadjuvantnu HT, što je pokazano u mnogobrojnim neoadjuvantnim studijama (158,159,164).

U literaturi ima mnogo više podataka o različitoj stopi postizanja pCR na neoadjuvantnu HT u odnosu na biološki podtip tumora. Poznato je da su luminal A podtipovi tumora slabo osetljivi na HT (165), te stoga imaju niske stope postizanja pCR (0%-7.5%) (126). Za razliku od njih, luminal B podtipovi tumora su osetljiviji na HT sa većim procentom postizanja pCR (1%-16.2%). HER2-pozitivni podtipovi tumora imaju znatno veću osetljivost na HT i anti-HER2 terapiju sa mogućnošću postizanja pCR u 22%-48% kod luminal HER2 podtipova i 33%-70% kod non-luminal HER2 podtipova tumora (126). Kod trostruko negativnih (TN) podtipova tumora kao vrlo agresivnih, stopa pCR se kreće od 20%-56% (126).

Kako se generalno smatra da pacijenti koji postignu pCR imaju bolji ishod lečenja u odnosu na one sa zaostalim rezidualnim tumorima, prognostička vrednost pCR je različita za različite biološke podtipove tumora (30,166). Bez obzira što pacijenti sa luminal A podtipovima tumorima imaju nisku stopu pCR-a, za koju je pokazano da nije udružena sa poboljšanjem OS i DFS, njihova ukupna prognoza je povoljna (158,159). Nasuprot tome pacijenti sa trostruko negativnim karcinomima imaju visoku stopu pCR-a a ipak imaju nepovoljnu prognozu. Najveća udruženost između pCR i dugoročnog ishoda bolesti pokazana je kod pacijenata sa agresivnim podtipovima tumora (trostruko negativni i HER-2 pozitivni/HR negativni).

I u zbirnoj analizi 12 neoadjuvantnih trajala je pokazano da je incidenca i prognostička uloga pCR-a varirala u odnosu na različite podtipove karcinoma dojke (158). Učestalost pCR-a bila je niska kod pacijenata sa niskim gradusom tumora i HR pozitivnim tumorima, a udvostručena kod HR pozitivnih tumora visokog gradusa. Agresivniji podtipovi, kao što su HER-2 pozitivni i trostruko negativni tumori imali su povećanu učestalost postizanja pCR-a. U okviru populacije HER-2 pozitivnih tumora, pCR se češće javljao kod HR negativnih tumora u odnosu na HR pozitivne i uz dodatak trastuzumaba.

Slične rezultate je prikazao i von Minckwitz u analizi 7 neoadjuvantnih trajala sprovedenih u Nemačkoj (159). Prognostički značaj pCR-a i u nemačkoj analizi bio je najveći

u HER-2 pozitivnim (nonluminal) i trostruko negativnim tumorima, gde pacijenti koji postignu pCR pokazuju prognozu koja je komparabilna sa pacijentima sa luminal A tumorima.

ER i PgR su bili prvi biološki markeri koji su ukazivali na prognozu bolesti i istovremenu predikciju odgovora na endokrinu terapiju. Pored toga što je status ER i PgR vrlo važan prediktivni faktor za primenu hormonske terapije, pokazalo se da su ovi biološki markeri važni i u predikciji odgovora na neoadjuvantnu HT, odnosno na postizanje pCR. Naime, poznato je da se kompletan odgovor na neoadjuvantnu HT češće javlja kod HR negativnih tumora u odnosu na HR pozitivne tumore (158,159,167,168).

Sa druge strane, postoji malo podataka o povezanosti statusa ER i PgR sa odgovorom na RT.

Naši rezultati su pokazali da je receptorski status značajno uticao na odgovor tumora u dojci na PRT ($p=0.039$). Bolesnice sa negativnim ER imale su bolji odgovor na PRT u smislu većeg postizanja pCR i pNCR u odnosu na bolesnice sa ER-pozitivnim tumorima (34.4% vs 10.6%). Praktično isti nalaz je dobijen i analizom statusa PgR u inicijalnom tumoru. Bolesnice sa negativnim PgR su ostvarile isto tako bolji odgovor na PRT, odnosno veći procenat pCR i pNCR (31.7%) u odnosu na PgR-pozitivne (7.9%).

U literaturi se takodje mogu naći podaci o korelaciji HR i odgovora na kombinovanu neoadjuvantnu HT-RT, odnosno da pacijenti sa negativnim nalazom SR imaju bolji odgovor na kombinovanu neoadjuvantnu terapiju. U radu Alvarado-Mirande i sar. je uočeno da pacijenti sa negativnim nalazom ER imaju bolje ostvareni pCR na neoadjuvantnu HT-RT u odnosu na pacijente sa ER pozitivnim tumorima ($p=0.016$) (112). Slične rezultate je objavio i Adams sa sar. gde je nakon preoperativne konkomitantne HT-RT sa paklitakselom zabeležen pCR kod 54% pacijenata sa HR negativnim tumorima u odnosu na HR pozitivne-18%. ($p<0.0001$) (113).

HER-2 amplifikacija je takodje postala vrlo informativni prognostički i prediktivni faktor u lečenju karcinoma dojke. Poznato je da kod HER-2 pozitivnih tumora primena HER-2 ciljane terapije kao što je neoadjuvantni trastuzumab, rezultira u boljoj stopi ostavrenog pCR i da pacijenti sa HER-2 pozitivnim tumorima koji ostvare pCR imaju bolju prognozu u odnosu na one sa rezidualnim tumorom (31). HER-2 status za sada predstavlja jedini prediktivni faktor odgovora na trastuzumab i drugu HER-2 ciljanu terapiju. Takodje, pokazano je da HER-2 status može biti prediktivni faktor odgovora na hemioterapiju koja

sadrži antracikline (169), mada postoje i podaci da je HER-2 negativan, a ne HER-2 pozitivan status prediktor odgovora na neoadjuvantnu primenu antraciklina (170).

Uticaj HER-2 statusa na efekat primenjene RT je znatno manje ispitivan, ali se na osnovu prekliničkih podataka HER-2 pozitivnost tumora povezuje sa radiorezistencijom. U literaturi se mogu naći podaci o povezanosti efekta RT i HER-2 statusa kod ranog karcinoma dojke. Danska analiza postoperativne RT posle mastektomije (DBCG studija) je pokazala da primena postoperativne RT nije uticala na poboljšanje ukupnog preživljavanja kod HER-2 pozitivnih/HR-negativnih tumora, za razliku od HER-2 negativnih/HR-pozitivnih tumora (106). Slične rezultate je pokazala i grupa autora iz Koreje analizirajući 11 552 pacijenta sa ranim karcinomima dojke (171). Poboljšanje u preživljavanju nakon postoperativne RT je uočeno samo kod pacijenata sa HER-2 negativnim tumorima ($p=0.037$). U jednom izveštaju francuskih autora, gde je HER-2 status određivan kod bolesnica koje su primale preoperativnu HT ili RT, uočeno je da je kompletan odgovor na preoperativnu RT zabeležen kod 54% bolesnica sa HER-2 pozitivnim tumorima i 41% kod bolesnica sa HER-2 negativnim tumorima ($p=0.2$) (172). U našoj analizi takodje nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru na preoperativnu RT između bolesnica sa HER-2 negativnim i HER-2 pozitivnim tumorima ($p=0.778$), mada je pCR registrovan kod 12.3% bolesnica sa HER-2 negativnim tumorima, dok kod HER-2 pozitivnih tumora nije zabeležen pCR ni kod jedne bolesnice.

Ki-67 kao jedan od bioloških markera koji se najčešće koristi u kliničkoj praksi, pored toga što ukazuje na povećanu agresivnost bolesti, može da korelira i sa odgovorom na neoadjuvantnu terapiju.

U našem radu, Ki-67 je određen kod 79 bolesnica u inicijalnom tumoru. Od toga je 50 bolesnica (63.3%) imalo visoke vrednosti Ki-67 ($>15\%$), dok je 29 bolesnica (36.7%) imalo nizak ($<15\%$) Ki-67. Ovaj odnos je i očekivan, imajući u vidu da su analizirane bolesnice sa lokalno uznapredovalim tumorima, koji su obično karakterišu povišenim vrednostima Ki-67. Analizom OS i DFS je pokazano da bolesnice sa niskim Ki-67 imaju duže i OS i DFS, mada ne statistički značajno u odnosu na bolesnice sa visokim Ki-67 (OS: $p=0.09$, DFS: $p=0.17$). Procenom patohistološkog odgovora na PRT u odnosu na vrednosti Ki-67 je pokazano da ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na bolesnice sa niskim i visokim vrednostima Ki-67 ($p=0.18$). Međutim, bolesnice sa visokim vrednostima Ki-67 imaju bolji odgovor na PRT: pCR i pNCR je ostvaren kod 12%, odnosno 14% bolesnica sa visokim Ki-67, u odnosu na 6.9% i 3.4% kod bolesnica sa niskim Ki-67.

Prema našim saznanjima, podataka o odgovoru na RT u zavisnosti od ekspresije Ki-67 u literaturi nema, dok se može naći povezanost sa odgovorom na neoadjuvantnu HT. Pokazano je da je odgovor na neoadjuvantnu HT kod pacijenata sa visokim Ki-67 (>30%) bolji u odnosu na pacijente sa niskim Ki-67 (173). Pored toga, pacijenti sa visokim Ki-67 u rezidualnom tumoru posle neoadjuvantne HT imaju lošiju prognozu u smislu veće stope relapsa bolesti i mortaliteta.

U jednoj analizi vrednosti Ki-67 i odgovora na neoadjuvantnu HT, uočeno je da su pacijenti koji su postigli pCR na neoadjuvantnu HT imali visoke srednje vrednosti Ki-67 ($37.4 \pm 24\%$) u odnosu na pacijente sa pPR ($34.7 \pm 25.5\%$) i pSD ($33.8 \pm 25.8\%$), ali nije pokazana statistički značajna razlika ($p=0.896$) (174). Isti autori su pokazali da postoji značajna razlika u vrednostima Ki-67 kod trostruko negativnih tumora (60.4 ± 18.3), HER-2 pozitivnih ($25.4 \pm 12.6\%$) i luminalnih tumora ($22 \pm 19.5\%$) ($p < 0.0001$). U okviru luminalnih tumora je pokazano da su pacijenti sa pCR imali prosečnu vrednost Ki-67 $50 \pm 36.5\%$ u odnosu na one bez pCR $18.1 \pm 12.9\%$ ($p=0.001$). U literaturi je takodje pokazano da pacijenti sa visokim Ki-67 (>25%) imaju lošiji OS i DFS u odnosu na niske vrednosti Ki-67 (175).

Preoperativna terapija karcinoma dojke je idealan model za evaluaciju prediktivne vrednosti promene ekspresije bioloških markera, imajući u vidu da se tumorsko tkivo može analizirati pre i posle primenjene terapije. U literaturi se analiza promene bioloških markera može naći uglavnom nakon primenjene neoadjuvantne hemioterapije (176,177).

Mi smo u našem radu kod 74 bolesnice analizirali promenu bioloških markera ER, PgR, HER-2 i Ki-67 pod uticajem PRT i to analizom iz primarnog tumora pre otpočinjanja PRT i u rezidualnom tumoru (ili rezidualnom limfnom čvoru u aksili kod postignutog pCR u tumoru) posle primenjene PRT.

Kvalitativne promene steroidnih receptora ER i PgR nakon sprovedene preoperativne RT zabeležene su kod 4/74 (5.4%) bolesnica, kod kojih je došlo do promene ER iz pozitivnog nalaza u negativan, kao i kod 4/74 (5.4%) bolesnica kod kojih je promenjen status PgR iz pozitivnog u negativan nalaz i 5/74 (6.8%) bolesnica gde je nalaz PgR promenjen iz negativnog u pozitivan. Status ER je ostao nepromenjen kod 70 (94.6%) bolesnica i to kod 55.4% bolesnica je bio i ostao pozitivan, a kod 39.2% bolesnica je bio negativan i pre i posle PRT. Status PgR je ostao nepromenjen kod 65 bolesnica (87.8%). Pozitivan nalaz PgR pre i posle PRT je registrovan kod 45.9% bolesnica, a negativan kod 41.9%.

Analizom OS je pokazano da bolesnice koje su imale pozitivan status ER i pre i posle PRT imaju statistički značajno duže OS u odnosu na bolesnice sa negativnim ER pre i posle PRT ($p=0.005$), kao i u odnosu na one koje su promenile status iz pozitivnih u negativne ($p=0.0002$). Procena DFS i DFI je pokazala statistički značajnu razliku između bolesnica sa pozitivnim ER pre i posle PRT i onih koje su prešle iz pozitivnih u negativne (DFS: $p=0.001$, DFI: $p=0.0002$). I analizom preživljavanja za PgR je pokazano da bolesnice sa pozitivnim nalazom PgR pre i posle PRT imaju najduži OS, DFS i DFI. Statistička značajnost dobijena je samo za OS između bolesnica sa pozitivnim PgR pre i posle PRT i onih sa negativnim PgR pre i posle PRT ($p=0.004$).

Analizom promene Ki-67 je pokazano da je kod 20/74 bolesnica (27%) došlo do konverzije iz visokih ($>14\%$) u niske vrednosti ($\leq 14\%$). Vrednosti Ki-67 ostale su nepromenjene kod 54 bolesnice (73%) i to: niske pre i posle PRT kod 29 bolesnica (39.2%) i visoke vrednosti pre i posle PRT kod 25 bolesnica (33.8%). Ukupno preživljavanje je bilo statistički bolje kod bolesnica sa niskim vrednostima Ki-67 pre i posle PRT u odnosu na bolesnice sa visokim vrednostima pre i posle PRT ($p=0.0024$). Bolesnice koje su pod dejstvom PRT promenile vrednosti Ki-67 iz visokih u niske imaju duže preživljavanje u odnosu na one sa visokim vrednostima pre i posle PRT, a kraće u odnosu na bolesnice sa niskim vrednostima, ali to nije bilo statistički značajno.

Promena u nalazu HER-2 statusa pod uticajem PRT nije zabeležena ni kod jedne bolesnice.

U literaturi se uglavnom mogu naći različiti podaci o promeni steroidnih receptora pod uticajem neoadjuvantne HT. Dede i sar. su objavili rezultate analize promene vrednosti bioloških markera ER, PgR, HER-2 i Ki-67 nakon primene neoadj. doze-densne HT sa doksorubicinom, ciklofosfamidom i potom paklitakselom (178). Promene u statusu steroidnih receptora ER i PgR nisu bile statistički značajne: 5.7% pacijenata koji su bili ER-pozitivni, prešli su posle neoadj. HT u ER-negativne ($p=0.500$), dok je za PgR 21% pacijenata posle neoadj HT postao PgR-negativan i 9% postao PgR-pozitivan ($p=0.549$). Autori su pokazali i sniženje vrednosti Ki-67 pod uticajem neoadjuvantne HT. Srednja vrednost Ki-67 je sa 10% pala na 1% nakon primenjene HT ($p<0.001$). Takođe su zapazili i promenu u HER-2 statusu kod 17% pacijenata ($p<0.001$).

Taucher i sar. su u grupi od 214 pacijenata pokazali da postoji statistički značajna razlika u promeni steroidnih receptora posle primene neoadj. HT, odnosno da inicijalno 14% pacijenata sa ER-pozitivnim tumorima i 51% sa PgR-pozitivnim tumorima prelaze u HR-negativne (za ER $p=0.02$, za PgR $p=0.0005$) (179).

Većina studija je pokazala promenu vrednosti Ki-67 posle neoadj. HT u smislu smanjenja vrednosti posle hemioterapije (178,180). Sniženje ekspresije Ki-67 tokom primene neoadjuvantne hormonske terapije predstavlja prediktor terapijskog odgovora i najavljuje duže preživljavanje ovih pacijentkinja (181).

Podaci o promeni HER-2 statusa posle neoadjuvantne HT su dosta različiti: neki autori su pokazali povećanu ekspresiju HER-2 posle neoadjuvantne HT (176), dok su drugi pokazali promenu HER-2 iz pozitivnog u negativni nalaz (180) ili nepromenjen nalaz (182).

Bez obzira što je poznato da radioterapija poboljšava lokalnu kontrolu i preživljavanje, i dalje postoje određene kategorije pacijenata kod kojih još uvek nije jasno utvrđena korist od RT. Kao rezultat toga je postojanje sve većeg interesovanja za proučavanjem biologije tumora koja može da predvidi koji pacijenti bi imali koristi od primene RT.

Jedna od takvih analiza je sprovedena kod pacijenata koji su bili uključeni u dansku studiju (Danish Breast Cancer Cooperative Group – DBCG 82b i c) u cilju predviđanja koristi od postoperativne RT nakon mastektomije, a sa pozitivnim nalazom limfnih čvorova u aksili (134). Radjena je genska analiza na 191 uzorku tumorskog tkiva, kojom je identifikovano 7 prediktivnih gena, na osnovu kojih su pacijenti bili podeljeni u dve grupe: sa "niskim" i sa "visokim" rizikom za loko-regionalni relaps (LRR). Rezultati su pokazali da postoperativna RT značajno redukuje rizik za pojavu LRR u grupi "visokog" rizika (57% vs 12% za 20 god. praćenja, $p < 0.0001$). U grupi pacijenata sa "niskim" rizikom postoperativna RT nije imala dodatne koristi u lokalnoj kontroli (8% vs 9%, $p = 0.93$).

Slično su i istraživači iz Univerziteta u Mičigenu nastojali da ustanove genski zapis radiosenzitivnosti u humanom karcinomu dojke, da bi identifikovali pacijente koji bi najverovatnije imali koristi od RT (135). Ispitivanje je radjeno na ćelijskim kulturama i pronadjeno je 147 gena koji su bili u korelaciji sa radiosenzitivnošću, a medju njima je izdvojen 51 gen sa snažnim prediktivnim informacijama.

Torres-Roca i sar. su razvili skor genske ekspresije za radiosenzitivnost i u kombinaciji sa prirodnim podtipovima karcinoma dojke, identifikovali su subgrupu pacijenata koja bi imala povećani rizik za lokalni relaps bolesti (183). Autori su izdvojili novu subpopulaciju trostruko negativnih i radiorezistentnih tumora koji imaju najveću verovatnoću za dobijanje lokalnog recidiva nakon poštedne operacije dojke i postoperativne RT, sugerišući da se kod takvih pacijenata razmatra eskalacija terapije.

U našoj analizi genske ekspresije na 14 uzoraka tumorskog tkiva, 8 je procenjeno kao non-responderi (NR) a 6 kao responderi (R) na PRT. Analiza prirodnog grupisanja 20%

najviše izmenjenih gena pokazala je jasno razdvajanje izmedju respondera i non-respondera. Klaster analiza parova uzoraka pre i posle primenjene PRT, pokazala je da se i pre-PRT i post-PRT uzorci grupišu prema svom odgovoru na RT. Pokazane su značajne razlike u ekspresiji za APOA1 gen, dok su MAP3K4 i MMP14 geni ispoljili trend ka više od dva puta smanjenom ekspresijom u radio-senzitivnim tumorima. Nakon stratifikacije prema statusu receptora za estrogen, za sva tri gena je pokazano da su značajno smanjeno regulisani u radio-rezistentnim ER pozitivnim tumorima, dok nije uočena značajna razlika u ekspresiji kod ER negativnih tumora.

Biološki markeri koji utiču na odgovor na RT u lečenju karcinoma dojke do sada nisu mnogo ispitivani, jer se RT često primenjuje uz sistemsku terapiju koja takodje utiče na OS i DFS.

Na osnovu literaturnih podataka može se videti da su biološki markeri potencijalne radiorezistencije karcinoma dojke do sada uglavnom ispitivani kod ranog karcinoma i pacijenata koji su primali adjuvantnu hemioterapiju i postoperativnu zračnu terapiju nakon poštredne operacije ili mastektomije. Takodje je vrlo malo podataka o ispitivanju bioloških markera kod lokalno odmakle bolesti gde je lečenje bilo kombinovano sa inicijalnom hemioterapijom a potom radioterapijom. Pored toga, do sada je uglavnom ispitivana veza bioloških markera i odgovora na primenjenu hemioterapiju.

Preoperativna RT kao jedini vid preoperativnog lečenja lokalno uznapredovalog karcinoma dojke koja se kod nas rutinski primenjivala u ranijem periodu, nije bila široko rasprostranjena u svetu, tako da praktično ne postoje grupe pacijenata u okviru kojih bi se moglo ispitivati uticaj markera na RT bez upliva drugih terapijskih modaliteta.

Time bi rezultati ovog istraživanja mogli da doprinesu boljoj selekciji pacijenata prilikom odlučivanja o sprovođenju radioterapije kako kod lokalno odmakle bolesti, tako i prilikom odluke o sprovođenju postoperativne radioterapije nakon mastektomije ili poštredne operacije ranog karcinoma dojke.

Prednost naše anallize:

1. neoadjuvantna platforma za ispitivanje RT:
 - a) ispitivan je terapijski odgovor RT bez upliva drugih modaliteta lečenja;
 - b) dostupnost tumorskog tkiva pre i posle primene samo RT omogućilo je ispitivanje značaja inicijalne ekspresije i promene ekspresije bioloških markera na terapijski odgovor RT;
 - c) analiza genske ekspresije

Nedostaci naše analize:

1. mali broj ispitivanih pacijenata
2. postojanje pacijenata izgubljenih u praćenju
3. primena adjuvantnih hemioterapijskih režima prve i druge generacije (bez kombinacije antraciklina i taksana) i/ili hromonske terapije bez inhibitora aromataze III generacije kod pacijentkinja kod kojih je uradjena radikalna operacija može da utiče na krajnji ishod lečenja
4. ograničena mogućnost analize bioloških markera

6. ZAKLJUČCI

1. Ustanovljena je značajnost vrste kliničkog odgovora tumora na sprovedenu PRT u odnosu na ukupno preživljavanje. Bolesnice koje su na PRT postigle cCR imale su značajno duže OS i trend ka dužem DFS i DFI u odnosu na one sa ostvarenim cPR i cSD. Postoji trend ka značajno dužem OS, DFS i DFI kod patohistološki procenjenog odgovora na PRT kao pCR+pNCR u odnosu na bolesnice koje su procenjene kao pPR i pNC .
2. Ustanovljena je značajnost uticaja nodalnog statusa i veličine rezidualnog tumora nakon sprovedene PRT na OS i DFS. Negativni nalaz aksilarnih limfnih čvorova je povezan sa značajno dužim OS, DFS i DFI u odnosu na pozitivni sa 1-3 limfna čvora i sa pozitivnim ≥ 4 limfna čvora. Bolesnice bez rezidualnog tumora su imale značajno duži OS, DFS i trend ka dužem DFI u odnosu na bolesnice sa rezidualnim tumorom >20 mm.
Godine starosti i menopauzni status nisu imali uticaja na OS, DFS i DFI. Godine starosti nisu imale uticaja na odgovor na PRT. Ustanovljena je razlika između pre i postmenopauzних bolesnica u kliničkom odgovoru na PRT, veći procenat premenopauzних bolesnica je imao cPR u dojci, a skoro 1/3 postmenopauzних bolesnica je procenjena kao cSD.
3. Zabeležena je značajnost biološke klasifikacije primarnog tumora u odnosu na ukupno preživljavanje. Luminal A tumori su bili povezani sa najdužim OS u odnosu na ostale podtipove tumora, a pokazan je trend ka dužem preživljavanju u odnosu na HER-2 pozitivne tumore. U odnosu na odgovor na PRT, kod bolesnica sa trostruko negativnim tumorima nadjen je statistički značajno najveći procenat postignutog pCR i pNCR.
Pokazano je da su bolesnice sa ER i PgR pozitivnim tumorima imale značajno duže OS u odnosu na ER i PgR negativne. Kod ER i PgR negativnih tumora postignut je značajno veći procenat pCR i pNCR odgovora na PRT u odnosu na ER i PgR pozitivne tumore.
Kod HER-2 negativnih tumora postoji značajno duži OS, DFS i DFI u odnosu na HER-2 pozitivne i HER-2 2+ tumore. HER-2 status nije imao uticaja na odgovor na PRT.
Vrednost Ki-67 nije imala statističkog značaja na OS, DFS i DFI, kao ni na odgovor tumora na PRT.

4. Ispitivanjem promene bioloških markera nakon PRT, pokazano je da:

Bolesnice sa pozitivnim ER i pre i posle PRT imaju značajno duže OS, DFS i DFI u odnosu na bolesnice sa negativnim ER ili kod promene statusa ER iz pozitivnog u negativni.

Pozitivni nalaz PgR pre i posle PRT je povezan sa značajno dužim OS u odnosu na negativni PgR ili promenjeni status PgR.

Kod bolesnica sa negativnim nalazom ER i PgR pre i posle PRT uočen je veći procenat ostvarenog pCR i pNCR u odnosu na pozitivne ER i PgR, ali bez statističke značajnosti.

Nije zabeležena nijedna promena HER-2 statusa posle primenjene PRT. Kod HER-2 negativnih tumora pre i posle PRT postojali su značajno duži OS, DFS i DFI. HER-2 status nije uticao na odgovor tumora na PRT.

Bolesnice sa niskim vrednostima Ki-67 pre i posle PRT imale su duže OS u odnosu na prisustvo visokog Ki-67 ili promenjenim Ki-67 iz visoke u nisku vrednost. Vrednosti Ki-67 nisu imale uticaja na odgovor tumora na PRT.

5. Analizom genske ekspresije primarnog tumora nadjena je jasna diferencijacija izmedju non-respondera i respondera na PRT.

Pokazane su značajne razlike u ekspresiji za APOA1 gen, dok su MAP3K4 i MMP14 geni ispoljili trend ka više od dva puta smanjenoj ekspresiji u radio-senzitivnim tumorima. Smanjena ekspresija MMP14 gena bila je značajno povezana sa boljim DFS. Ovi rezultati predstavljaju osnovu za dalje razumevanje molekularnog odgovora na radioterapiju i ističu gene koji bi potencijalno bili korisni kao prediktivni markeri odgovora na PRT.

Neophodna su dalja prospektivna istraživanja koja bi potvrdila prediktivni značaj ovih rezultata.

7. LITERATURA

1. Pekmezović T, Kisić-Tepavčević D. Epidemiologija karcinoma dojke. U: Džodić R, Nešković-Konstantinović Z, Gudurić B. Rak dojke. Zavod za udžbenike, Beograd 2014, ISBN 976-86-17-18795-6.
2. Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2012. Izveštaj broj 14. Registar za rak u centralnoj Srbiji, Institut za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, Beograd 2014.
3. Cardoso F, Costa A, Norton L. Et al. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2). *The Breast* 2014;23:489-502.
4. Yalcin B. Overview on locally advanced breast cancer: defining, epidemiology and overview on neoadjuvant therapy. *Exp Oncol* 2013;35(4):250-2.
5. Newman LA. Epidemiology of locally advanced breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2009;19:195-203.
6. Chia S, Swain SM, Byrd DR et al. Locally advanced and inflammatory breast cancer. *JClin Oncol*. 2008;26:786-90.
7. MacDonald SM, Haffty BG, Harris ER, Arthur DW, Bailey L, Bellon JR et al. ACR Appropriateness Criteria locally advanced breast cancer (online publication). Reston (VA):American College of Radiology (ACR);2011.13p.
8. Franceschini G, Terribile D, Magno S, et al. Update in the treatment of locally advanced breast cancer: a multidisciplinary approach. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2007;11:283-9
9. Whitman GJ, and Strom EA. Workup and staging of locally advanced breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2009;19:211-21.
10. International Union Against Cancer (UICC). Breast tumours in TNM Classification of Malignant Tumours, 7-th edition. Sobin LH, Gospodarowich MK , Wittekind Ch (eds). Wiley-Blackwel, UK, 2009, pp 181-93.
11. Tryfonidis K, Senkus E, Cardoso MJ, and Cardoso F. Management of locally advanced breast cancer – perspectives and future directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2015;12(3):147-62.
12. Londero V, Bazzocchi M, del Frate C et al. Locally advanced breast cancer: Comparison of mammography, sonography and MR imaging in evaluation of residual disease in women receiving neoadjuvant chemotherapy. *Eur Radiol* 2004;14:1371-1379.

13. Podkrajsek M, Music MM, Kadivec M et al. Role of ultrasound in the preoperative staging of patients with breast cancer. *Eur Radiol* 2005;15:1044-1050.
14. Topal U, Punar S, Tasdelen I et al. Role of ultrasound-guided core needle biopsy of axillary lymph nodes in the initial staging of breast carcinoma. *Eur J Radiol* 2005;56:382-385.
15. Morris EA. Breast cancer staging with MRI. *Radiol Clin North Am* 2002;40:443-466.
16. Kim HJ, Im YH, Han BK et al. Accuracy of MRI for estimating residual tumor size after neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. Relation to response patterns on MRI. *Acta Oncol* 2007;46:996-1003.
17. Julius T, Kemp SE, Kneeshav PJ et al. MRI and conservative treatment of locally advanced breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2005;31:1129-1134.
18. Sinn HP, Kreipe H. A brief overview of the WHO Classification of breast tumors, 4-th edition, focusing on issues and updates from the 3-rd edition. *Breast Care* 2013;8:149-154.
19. Huber KE, Carey LA, and Wazer DE. Breast cancer Molecular subtypes in patients with locally advanced disease: Impact on prognosis, patterns of recurrence and response to therapy. *Semin Radiat Oncol* 2009;19:204-210.
20. Milovanović Z, Jovičić Milentijević M. Patohistologija. U: Džodić R, Nešković-Konstantinović, Gudurić B. Rak dojke. Zavod za udžbenike, Beograd 2014, ISBN 976-86-17-18795-6.
21. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. 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;22:1736-1747.
22. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26(supp 5):8-30.
23. Giordano SH. Update on locally advanced breast cancer. *The Oncologist*. 2003;8:521-530.
24. Valero V, Buzdar AU et Hortobagyi GN. Locally advanced breast cancer. *The Oncologist*. 1996;1:8-17.
25. Mathew J, Asgeirsson KS, Cheung KL et al. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer: A review of the literature and future directions. *EJSO* 2009;35:113-22.
26. Wolff AC, Davidson NE. Preoperative therapy in breast cancer: Lessons from the treatment of locally advanced disease. *The Oncologist*. 2002;7:239-45.

27. Thompson AM, and Moulder-Thompson SL. Neoadjuvant treatment of breast cancer. *Ann Oncol* 2012;23(supp 10):231-36.
28. Untch M, Konecny GE, Paepke S, and Von Minckwitz G. Current and future role of neoadjuvant therapy for breast cancer. *The Breast* 2014;23:526-37.
29. Specht J. and Gralow JR. Neoadjuvant Chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2009;19:222-28.
30. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, et al. Preoperative chemotherapy: Updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B18 and B27. *J Clin Oncol* 2008;26:778-85.
31. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet* 2010;375:377-84.
32. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TEHNO trial of the AGO and GBG study groups. *J Clin Oncol* 2011;29:3351-57.
33. Bayraktar S, Gonzales-Angulo AM, Lei X, et al. Efficacy of neoadjuvant therapy with trastuzumab concurrent with anthracycline and nonanthracycline-based regimens for HER2 positive breast cancer. *Cancer* 2012;118:2385-93.
34. Kim MM, Allen P, Gonzales-Angulo AM. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab predicts predict for improved survival in women with HER2 overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 2013;24(8):1999-2004.
35. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised open-label multicentre phase 3 trial. *Lancet* 2012;379:633-40.
36. Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised open-label multicentre phase 2 trial. *Lancet* 2012;13:25-32.
37. Chia Y, Ellis M, Ma C, Neoadjuvant endocrine therapy in primary breast cancer: indications and use as a research tool. *Br J Cancer* 2010;103:759-64.

38. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2015. *Ann Oncol* 2015;26:1533-46.
39. Cataliotti L, Buzdar AU, Nouguchi S, et al. Comparison of anastrozole versus tamoxifen as preoperative therapy in postmenopausal women with hormone receptor –positive breast cancer. The pre-operative Arimidex compared to Tamoxifen (PROACT) trial. *Cancer* 2006;106:2095-103.
40. Ellis M, Suman VJ, Hoog J, et al. Randomized phase II neoadjuvant comparison between Letrozole, Anastrozole and Exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: clinical and biomarker outcomes and predictive value of baseline PAM50-based intrinsic subtype –ACOSOG Z1031. *J Clin Oncol* 2011;29(17):2342-9.
41. Lee MK, Newman LA. Management of patients with locally advanced breast cancer. *Surg Clin N Am* 2007;87:379-98.
42. Perez EA, Foo ML and Fulmer JT. Management of locally advanced breast cancer. *Oncology* 1997;11(suppl 9):9-17.
43. Buchholz TA, Mittendorf EA, Hunt KK. Surgical considerations after neoadjuvant chemotherapy: breast conservation therapy. *J Nat Cancer Inst Monogr* 2015; (51):11-14.
44. Alm El-Din MA. And Taghian AG. Breast conservation therapy for patients with locally advanced breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2009;19:229-35.
45. van Nes JG, Putter H, Julien JP, et al. Preoperative chemotherapy is safe in early breast cancer, even after 10 years follow-up: clinical and translational results from the EORTC trial 10902. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115:101-13.
46. Mamounas EP, Anderson SJ, Dignam JJ et al. Predictors of locoregional recurrence after neoadjuvant chemotherapy: Results from combined analysis of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 and B-27. *J Clin Oncol* 2012;30(32):3960-3966.
47. Eierman W, Peapke S, Apfelstaedt J, et al. Preoperative treatment of postmenopausal breast cancer patients with letrozole: a randomized double-blind multicenter study. *Ann Oncol* 2001;12:1527-32.
48. Bogusevicius A, Cepulienė D and Sepetauskiene E. The integrated evaluation of the results of oncoplastic surgery for locally advanced breast cancer. *Breast J* 2014;20:53-60.
49. Zucca Matthes AG et al. Feasibility of oncoplastic techniques in the surgical management of locally advanced breast cancer. *Int J Surg* 2012;10:500-505.

50. Lim W. et al. Oncological safety of skin sparing mastectomy followed by immediate reconstruction for locally advanced breast cancer. *J Surg Oncol* 2010;102:39-42.
51. Kuehn T, et al. Sentinel lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Oncol* 2013;14:609-618.
52. Budach W, Matuschek C, Bolke E, et al. DEGRO practical guidelines for radiotherapy of breast cancer V: Therapy for locally advanced and inflammatory breast cancer, as well as local therapy in cases with synchronous distant metastases. *Strahlenther Onkol* 2015;191:623-33.
53. Early Breast Cancer Trialists Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;366:2087-106.
54. Early Breast Cancer Trialists Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011;378:1707-16.
55. Early Breast Cancer Trialists Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet*. 2014;383:2127-35.
56. Fletcher GH. History of irradiation in the primary management of apparently regionally confined breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985;11:2133-42.
57. Montague ED. Radiation management of advanced breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1978;4:305-7.
58. Chu AM, Cope O, Doucette J, and Curran B. et al. Non-metastatic locally advanced cancer of the breast treated with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984;10:2299-304
59. Zaharia M, Caceres E, Valdivia S, et al. Radiotherapy in the management of locally advanced breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987;13:1179-82.
60. Danoff BF. The role of radiotherapy in the management of locally advanced nonmetastatic breast cancer. In Levitt S: *Syllabus. Categories course in breast cancer. RSNA Proceedings.* 1984.
61. Wallgren A, Arner O, Bergstrom J, et al. Preoperative radiotherapy in operable breast cancer: Results in the Stockholm Breast Cancer Trial. *Cancer* 1978;42:1120-25.

62. Amarlic R, Santamaria F, Robert F et al. Radiation therapy with or without primary limited surgery for operable breast cancer: a 20-year experience at the Marseilles Cancer Institute. *Cancer* 1982;49:30-34.
63. Sinacki M, Badzio A, Welnicka-Jaskiewicz M, et al. Pattern of care in locally advanced breast cancer: Focus on local therapy. *The Breast* 2011;20:145-50.
64. Bazan JG and White JR. The role of postmastectomy radiation therapy in patients with breast cancer responding to neoadjuvant chemotherapy. *Semin Radiat Oncol* 2016;26:51-58.
65. Jagsi R and Pierce L. Postmastectomy radiation therapy for patients with locally advanced breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2009;19:236-243.
66. Kishan AU and McCloskey SA. Postmastectomy radiation therapy after neoadjuvant chemotherapy: review and interpretation of available data. *Ther Adv Med Oncol* 2016;8(1):85-97.
67. Hoffman KE, Mittendorf EA, Buchholz TA. Optimising radiation treatment decisions for patients who receive neoadjuvant chemotherapy and mastectomy. *Lancet Oncol* 2012;13:e270-76.
68. Chapman CH and Jagsi R. Postmastectomy radiotherapy after neoadjuvant chemotherapy: a review of the evidence. *Oncology (Williston Park)* 2015;29:657-66.
69. Magrini SM, Buglione M, Costa L. Optimizing radiation treatment decisions for patients who receive neoadjuvant chemotherapy. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2015;51:9-10.
70. Fowble BL, Einck JP, Kim DN. et al. Role of postmastectomy radiation after neoadjuvant chemotherapy in stage II-III breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;83(2):494-503.
71. Mak KS, Harris JR. Radiotherapy issues after neoadjuvant chemotherapy. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2015;51:87-89.
72. Huang EH, Tucker SI, Strom EA. et al. Postmastectomy radiation improves local-regional control and survival for selected patients with locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and mastectomy. *J Clin Oncol* 2004;22:4691-4699.
73. Buchholz TA, Lehman CD, Harris JR. et al. Statement of the science concerning locoregional treatments after preoperative chemotherapy for breast cancer: a National Cancer Institute Conference. *J Clin Oncol* 2008;26:791-797.
74. Akyurek S, Yavis G. Role of postmastectomy radiation therapy after neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Exp Oncol* 2013;354267-71.

75. Wright JL, Takita C, Reis IM. et al. Predictors of locoregional outcome in patients receiving neoadjuvant therapy and postmastectomy radiation. *Cancer* 2013;119:16-25.
76. Mandilaras V, Bouganis N, Spayne J, et al. Concurrent chemoradiotherapy for locally advanced breast cancer-time for a new paradigm? *Curr Oncol* 2015;22:25-32.
77. Kaidar-Person O, Kuten A, Belkacemi Y, On behalf of AROME. Primary systemic therapy and whole breast irradiation for locally advanced breast cancer: A systematic review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2014;92:143-52.
78. Bollet MA, Sigal-Zafrani B, Gambotti L. et al. on behalf of the Institut Curie Breast Cancer Study Group. Pathological response to preoperative concurrent chemoradiotherapy for breast cancer: results of a phase II study. *Eur J Cancer* 2006;42:2286-95.
79. Gani MF, Amorim G, Arcuri RA. et al. A phase II study of second-line neoadjuvant chemotherapy with capecitabine and radiation therapy for anthracycline-resistant locally advanced breast cancer. *Am J Clin Oncol* 2007;30:78-81.
80. Skinner KA, Silberman H, Florentine B. et al. Preoperative paclitaxel and radiotherapy for locally advanced breast cancer: surgical aspects. *Ann Surg Oncol* 2000;7:145-9.
81. Lerouge D, Touboul E, Lefranc JP. et al. Combined chemotherapy and preoperative irradiation for locally advanced noninflammatory breast cancer: updated results in a series of 120 patients. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2004;59:1062-73.
82. Bates T, Williams NJ, Bendall S. et al. Primary chemo-radiotherapy in the treatment of locally advanced and inflammatory breast cancer. *The Breast* 2012;21:330-5.
83. Formenti SC, Volm M, Skinner KA et al. Preoperative twice-weekly paclitaxel with concurrent radiation therapy followed by surgery and postoperative doxorubicin-based chemotherapy in locally advanced breast cancer: a phase I/II trial. *J Clin Oncol* 2003;21:864-70.
84. Moran MS, Haffty BG. Radiation techniques and toxicities for locally advanced breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2009;19:244-255.
85. Chadhia M, Bailey L, Dutton SC et al. Locally advanced breast cancer (online publication). American College of Radiology (ACR) 2016; Available from: <https://acsearch.acr.org/docs/69346/Narrative/>
86. Poortmans P. Evidence based radiation oncology: Breast cancer. *Radiother Oncol.* 2007;84:84-101.
87. Barrett A, Dobbs J, Morris SI, Roques T. Practical radiotherapy planning. 4-th edition. London: Hodder Arnold, an imprint of Hodder Education; 2009.

88. Buchholz TA, Haffty B. Breast cancer: Locally advanced and recurrent disease, postmastectomy radiation and systemic therapies. In Perez and Brady's Principles and practice of radiation oncology, 5-th Edition. Philadelphia;Lippincott Williams and Wilkins;2008.
89. White J, Tai A, Arthur D, et al. RTOG breast cancer atlas for radiation therapy planning: Consensus definitions: Presented at the ASCO 2008 Breast Cancer Symposium, Washington DC,2008.
90. Gagliardi G, Constine LS, Moiseenko V, et al. Radiation dose-volume effects in the heart. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2010;76:s77-s85.
91. Marks LB, Bentzen SM, Deasy JO, et al. Radiation dose-volume effects in the lung. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2010;76:s70-s76.
92. Lee LJ, Harris JR. Innovations in radiation therapy (RT) for breast cancer. *The Breast* 2009;18:103-111.
93. McCormick B, Hunt M. Intensity-modulated radiation therapy for breast: is it for everyone ? *Semin Radiat Oncol* 2011;21:51-54.
94. Popescu CC, Olivotto IA, Beckham WA et al. Volumetric modulated arc therapy improves dosimetry and reduces treatment time compared to conventional intensity-modulated radiotherapy for locoregional radiotherapy of left-sided breast cancer and internal mammary nodes. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2010;76:287-95.
95. Pederson AN, Korreman S, Nystrom H, and Specht L. Breathing adapted radiotherapy of breast cancer: reduction of cardiac and pulmonary doses using voluntary inspiration breath-hold. *Radiotherapy and Oncology* 2004;72:53-60.
96. Cuaron JJ, Chon B, Tsai H et al. Early toxicity in patients treated with postoperative proton therapy for locally advanced breast cancer. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2015;92:284-91.
97. Pierce LJ. The use of radiotherapy after mastectomy: a review of the literature. *J Clin Oncol.* 2005;23:1706-17.
98. Truong PT, Olivotto IA, Whelan TJ, Levine M. Clinical Practice Guidelines for the Care and Treatment of Breast Cancer: 16. Locoregional post-mastectomy radiotherapy. *CMAJ.* 2004,170(8);1263-73.
99. Carter CL, Allen C, and Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-187.
100. Haffty BG and Buchholz TA. Molecular predictors of locoregional recurrence in breast cancer: Ready for prime time? *J Clin Oncol.* 2010;28:1627-29.

101. Reister O, Milas L and Ang KK. Use of molecular biomarkers for predicting the response to radiotherapy with or without chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007;25:4075-83.
102. Haffty BG and Glazer PM. Molecular markers in clinical radiation oncology. *Oncogene*. 2003;22:5915-25.
103. van der Leij F, Elkhuisen PHM, Bartelink H. and van de Vijver MJ. Predictive factors for local recurrence in breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2012;22:100-107.
104. Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Therasse P et al. Locally advanced/inflammatory breast cancers treated with intensive epirubicin-based neoadjuvant chemotherapy: are there molecular markers in the primary tumour that predict for 5-year clinical outcome? *Ann Oncol* 2003;14:406-413.
105. Montagna E, Bagnardi V, Rotmensz N et al. Factors that predict early treatment failure for patients with locally advanced (T4) breast cancer. *Br J Cancer* 2008;98:1745-52.
106. Kyndi M, Sorensen FB, Knudsen H et al. Estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2 and response to postmastectomy radiotherapy in high-risk breast cancer: The Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 2008;26:1419-26.
107. Fisher B, Bryant J, Dignam JJ. et al. Tamoxifen, radiation therapy or both for prevention of ipsilateral breast tumor recurrence after lumpectomy in women with invasive breast cancers of one centimeter or less. *J Clin Oncol*. 2002;20:4141-9.
108. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28:1684-91.
109. Millar EKA, Graham PH, O'Toole SA et al. Prediction of local recurrence, distant metastases and death after breast-conserving therapy in early-stage invasive breast cancer using a five-biomarker panel. *J Clin Oncol* 2009;27:4701-8.
110. Nguyen PL, Taghian AG, Katz MS et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol* . 2008;26:2373-8.
111. Gustavson MD, Petrillo SK, Graves L et al. Quantitative and standardized measurement of estrogen receptor predicts response to radiation therapy in breast cancer. *Cancer Research*. 2010;70(24 suppl.):131s (abstr.PD10-08).
112. Alvarado-Miranda A, Arrieta O, Gamboa-Vignolle C, et al. Concurrent chemoradiotherapy following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer.

Radiation Oncology 2009;4:24 doi:10.1186/1748-717x-4-24. Available from: <http://www.ro-journal.com/content4/1/24>.

113. Adams S, Chakravarthy AB, Donach M, et al. Preoperative concurrent paclitaxel-radiation in locally advanced breast cancer: pathologic response correlates with five-year overall survival. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124(3):723-32.
114. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP et al. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: Biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003;8:307-25.
115. Estava FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:109-118.
116. Jameel JKA., Rao VSR, Cawkwell L, Drew PJ. Radioresistance in carcinoma of the breast. *The Breast*. 2004,13(6):452-460.
117. Kunkler I. Radiation resistance in breast cancer. *Advances in breast cancer*. Sep 1, 2009;10-15.
118. Pietras RJ, Poen JC, Gallardo D, et al. Monoclonal antibody to HER-2/neu receptor modulates repair of radiation induced DNA damage and enhances radiosensitivity of human breast cancer cells overexpressing this oncogene. *Cancer Res* 1999;59:1347-55.
119. Formenti SC, Spicer D, Skinner K et al. Low HER-2/NEU gene expression is associated with pathological response to concurrent paclitaxel and radiation therapy in locally advanced breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;52:397-405.
120. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM et al. Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010;11:174-83.
121. Guarneri V, Piacentini F, Ficarra G et al. A prognostic model based on nodal status and Ki-67 predicts the risk of recurrence and death in breast cancer patients with residual disease after preoperative chemotherapy. *Annals of Oncology*. 2009;20:1193-8.
122. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr et al. Ki-67 as a prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96:1504-13.
123. Urruticoechea A, Smith IE, and Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:7212-20.
124. Dawood S, Hu R, Homes MD et al. Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126:185-92.
125. Haque R, Ahmed SA, Inzhakova G et al. Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2012;21:1848-55.

126. Wang-Lopez Q, Chalabi N, Abrial C et al. Can pathologic complete response (pCR) be used as a surrogate marker of survival after neoadjuvant therapy for breast cancer? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2015;95:88-104.
127. Braunstein LZ, and Taghian AG. Molecular phenotype, multigene assays and the locoregional management of breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2016;26:9-16.
128. Gianni L, Zambetti M, Clark K, et al. Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7265-77.
129. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of Tamoxifen – treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-26.
130. van de Vuver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(25):1999-2009.
131. Buyse M, Loi S, van't Veer LJ. Et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1183-92.
132. Straver ME, Glas AM, Hannemann J, et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;119(3):551-8.
133. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;28(8):1160-7.
134. Tramm T, Mohammed H, Myhre S, et al. Development and validation of a gene profile predicting benefit of postmastectomy radiotherapy in patients with high-risk breast cancer: A study of gene expression in the DBCG82bc Cohort. *Clin Cancer Res* 2014;20(20):5272-80.
135. Speers C, Zhao S, Liu M, Bartelink H, Pierse LJ and Feng FY. Development and validation of a novel radiosensitivity signature in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21(16):3667-77.
136. Nacionalni protokol dijagnostike i lecenja malignih tumora dojke, Knjiga Protokoli Instituta za onkologiju i radiologiju, Beograd, 1993.
137. Sahoo S and Lester SC. Pathology of breast carcinomas after neoadjuvant chemotherapy: An overview with recommendations on specimen processing and reporting. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:633-42.
138. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M et al. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:2784-95.

139. Wolff AC, Hammond EH, Hicks DG et al. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update: Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:241-56.
140. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D et al. Ki 67 index, HER 2 status and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:736-50.
141. Bourgier C, Calvo FA, Marsiglia H, and Martin M. Overview of preoperative radiochemotherapy in breast cancer: past or future? *Clin Transl Oncol* 2011;13:446-50.
142. Riet FG, Fayarad F, Arriagada R. et al. Preoperative radiotherapy in breast cancer patients: 32 years of follow-up. *Eur J Cancer* 2017;76:45-51.
143. Calitchi E, Kirova YM, Otmezguine Y, et al. Long-term results of neoadjuvant radiation therapy for breast cancer. *Int J Cancer (Radiat Oncol Invest)* 2001;96:253-9.
144. Matuschek C, Bolke E, Roth SL et al. Long-term outcome after neoadjuvant radiochemotherapy in locally advanced noninflammatory breast cancer and predictive factors for a pathologic complete remission. *Strahlenther Oncol* 2012;188:777-81.
145. Shanta V, Swaminathan R, Rama R, and Radhika R. Retrospective analysis of locally advanced noninflammatory breast cancer from Chennai, South India, 1990-1999. *Int J Rad Oncol Biol Phys.* 2008;70:51-8.
146. Shanta V, Krishnamurthi S. Preoperative multimodal therapy for locally advanced non-inflammatory breast cancer. *Clin Oncol* 1991;3:137-140.
147. Semiglazov VF, Topuzov EE, Bavli JL, et al. Primary (neoadjuvant) chemotherapy and radiotherapy compared with primary radiotherapy alone in stage IIb-IIIa breast cancer. *Ann Oncol* 1994;5:591-5.
148. Baltodano PA, Reinhardt ME, Flores JM et al. Preoperative radiotherapy is not associated with increased post-mastectomy short-term morbidity: Analysis of 77902 patients. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2017;5:e1108; doi: 10.1097/GOX.0000000000001108; Published online 13 March 2017.
149. Kaya OA, Coskun U, Buyukberber S et al. Efficacy and toxicity of preoperative chemotherapy with docetaxel and epirubicin in locally advanced breast cancer. *J BUON* 2010;15(2):248-54.
150. de Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *Lancet Oncol* 2014;15:1137-46.

151. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol* 2013; 24(9):2278-84.
152. Bear HD, Anderson S, Brown A et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclofosfamide. Preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 2003;21:4165-74.
153. Green MC, Buzdar AU, Smith T et al. Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every 3 weeks. *J Clin Oncol* 2005;23:5983-92.
154. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ et al. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: A determinant of outcome. *J Am Coll Surg* 1995;180:297-306.
155. von Minckwitz G, Rezai M, Loibl S et al. Capecitabine in addition to anthracycline/taxane-based neoadjuvant treatment in patients with primary breast cancer: The phase III GeparQuattro study. *J Clin Oncol* 2010;28:2015-23.
156. Baselga J, Bradbury I, Edtmann H et al. First results of the NeoALTTO trial (BIG 01-06/EGF106903): A phase III randomized open label, neoadjuvant study of lapatinib, trastuzumab and their combination plus paclitaxel in women with HER2-positive primary breast cancer. *Cancer Res* 2010;70(suppl:abstr S3-3).
157. Steger GG, Greil R, Jakesz R et al. A randomized phase III study comparing epirubicin, docetaxel and capecitabine (EDC) to epirubicin and docetaxel (ED) as neoadjuvant treatment for early breast cancer: First results of ABCSG-24. *Eur J Cancer* 2009;7(suppl:abstr 3).
158. Cortazar P, Zhang L, Untch M et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 2014;384:164–72.
159. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2012;30:1796-1804.
160. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007;25:4414-22.

161. Buchholz TA, Tucker SL, Masullo L et al. Predictors of loco-regional recurrence after neoadjuvant chemotherapy and mastectomy without radiation. *J Clin Oncol* 2002;20:17-23.
162. Langlands FE, Horgan K, Dodwell DD, and Smith L. Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation. *Br J Radiol* 2013;86:20120601.
163. Wang Y, Yin Q, Yu Q et al. A retrospective study of breast cancer subtypes: the risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130:489-98.
164. Wang J, Sang D, Xu B et al. Value of breast cancer molecular subtypes and Ki-67 expression for the prediction of efficacy and prognosis of neoadjuvant chemotherapy in a Chinese population. *Medicine* 2016;95(18):1-6. doi: 10.1097/MD.0000000000003518. Available from: www.md-journal.com.
165. Dawood S, Hu R, Homes MD et al. Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126:185-92.
166. Kong X, Moran MS, Zhang N et al. Meta-analysis confirms achieving pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy predicts favourable prognosis for breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2011;47:2084-90.
167. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D et al. Expression of ER, PgR, HER1,HER2 and response: a study of preoperative chemotherapy. *Ann Oncol* 2008;19:465-72.
168. Osako T, Nishimura R, Okumura Y et al. Predictive significance of the proportion of ER-positive or PgR-positive tumor cells in response to neoadjuvant chemotherapy for operable HER-2 negative breast cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2012;3:66-71.
169. Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, et al. HER2 Status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: A pooled analysis of randomized trials . *J Natl Cancer Inst* 2008;100 (1): 14-20.
170. Yao L, Liu Y, Li Z, et al. HER2 and response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol* 2011;22(6):1326-31.
171. Kim HA, Kim EK, Kim MS et al. Association of human epidermal growth factor receptor 2 with radiotherapy resistance in patients with T1N0M0 breast cancer. *J Breast Cancer* 2013;16(3):266-73.
172. Rosan S, Vincent-Salomon A, Zafrani B et al. No significant predictive value of c-erbB - 2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1998;79:27-33.

173. Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L et al. Ki-67, chemotherapy response and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer* 2011;11:article 486. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/486>.
174. Juhasz-Boss I, Mavrova R, Moga S et al. Can Ki-67 play a role in prediction of breast cancer patients response to neoadjuvant chemotherapy? *Bio Med research International* 2014; ID 628217, 7 pages; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/628217>.
175. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F et al. 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;139:539-52.
176. Adams AL, Eltoun I, Krontiras H et al. The effect of neoadjuvant chemotherapy on histologic grade, hormone receptor status, and HER2/neu status in breast carcinoma. *Breast J* 2008;14:141-146.
177. Miglietta L, Vanella P, Canobbio L et al. Clinical and pathological response to primary chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer grouped according to hormonal receptors, HER2 status, grading and Ki-67 proliferation index. *Anticancer Res* 2009;29:1621-1626.
178. Dede DS, Gumuskaya B, Guler G, Onat D, Altundag K, and Oyisik Y. Evaluation of changes in biologic markers ER, PR, HER-2 and Ki-67 index in breast cancer with administration of neoadjuvant dose dense doxorubicin, cyclophosphamide followed by paclitaxel chemotherapy. *J BOUN* 2013;18(2):366-371.
179. Taucher S, Rudas M, Gnant M et al. Sequential steroid hormone receptor measurements in primary breast cancer with and without intervening primary chemotherapy. *Endocr Relat Cancer* 2003;10:91-98.
180. Neubauer H, Gall C, Vogel U et al. Changes in tumor biological markers during primary systemic chemotherapy (PST). *Anticancer Res* 2008;28:1797-1804.
181. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, et al. Short-term changes in Ki-67 during neoadjuvant treatment of primary breast cancer with Anastrozole or Tamoxifen alone or combined. Correlate with recurrence-free survival. *Clinical Cancer Research* 2005;11(2):951-8.
182. Faneyte IF, Schrama JG, Peterson JL et al. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. *Br J Cancer* 2003;88:406-412.
183. Torres-Roca JF, Fulp WJ, Caudell JJ et al. Integration of a radiosensitivity molecular signature into the assessment of local recurrence risk in breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015;93(3):631-8.

SPISAK SKRAĆENICA

cCR - klinički kompletan odgovor

cPR - klinički parcijalan odgovor

cSD - klinički stabilizacija bolesti

CLD (central lung distance) - centralna udaljenost pluća

CTV (clinical target volume) - klinički ciljni volumen

DFI (disease free interval) - vremenski interval bez bolesti

DFS (disease free survival) - preživljavanje bez znakova bolesti

ER - estrogenski receptori

FFPE (formalin fixed paraffin embedded) - parafinski uzorak tumorskog tkiva

HER-2 - receptor humanog epidermalnog faktora rasta-2

HR - hormonski receptori

HT - hemioterapija

IHH - imunohistohemijski

IMRT (intensity modulated radiotherapy) - intenzitetom modulirana radioterapija

LOKD - lokalno odmakli karcinom dojke

LRR - lokoregionalni recidiv

MHD (maximal heart distance) - maksimalna udaljenost srca

NA - nepoznato

OS (overall survival) - ukupno preživljavanje

pCR - patohistološki kompletan odgovor

PgR - progesteronski receptori

pNCR - patohistološki skoro kompletan odgovor

pPR - patohistološki parcijalan odgovor

pNC - patohistološki bez promene

PHT - primarna (neoadjuvantna) hemioterapija

PRT - preoperativna radioterapija

RT - radioterapija

TCT - tele-kobalt terapija

TD - tumorska doza

VMAT (volumetric modulated arc therapy) - volumetrijski modulirana lučna terapija

BIOGRAFIJA

Jasmina Mladenović je rođena u Beogradu 07.09.1964. godine. Osnovnu školu i gimnaziju završila u Beogradu. Diplomirala na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 22.03.1989. godine sa srednom ocenom 8,07.

Zaposlena u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije od 15.06.1992. godine na Odseku radioterapije malignoma dojke.

Poslediplomske studije iz radiologije završila 17.05.1996. godine odbranom magistarske teze "Radioterapija karcinoma dojke kod žena starijeg životnog doba". Mentor Prof. dr Slobodan Čikarić.

Specijalizaciju iz radiologije završila 30.10.1998. godine sa odličnim uspehom.

Član je Radioterapijske i Kancerološke sekcije SLD-a i Evropskog udruženja radijacionih onkologa (ESTRO). Aktivno učestvuje u radu Radioterapijske i Kancerološke sekcije: u Radioterapijskoj sekciji bila na funkciji sekretara sekcije u periodu od 2003-2007., a u Kancerološkoj sekciji bila sekretar sekcije u periodu od 2007-2008.

Trenutno vrši funkciju načelnika Odeljenja radioterapije dojke na Klinici za radiološku onkologiju i dijagnostiku, Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

Aprila 2012. godine odobrena je izrada doktorske disertacije od strane Nastavno-naučnog veća na Medicinskom fakultetu u Beogradu, pod nazivom: "Korelacija bioloških markera sa odgovorom na preoperativnu radioterapiju lokalno odmaklog neinflamatornog karcinoma dojke", čiji je mentor Prof.dr Vesna Plešinac Karapandžić a komentor N.Sar. dr Snežana Šušnjar.

Tokom svog rada usavršavala se na brojnim kursevima (ESTRO, ESO) i mesec dana edukacije u Centru "Paul Strausse", Radioterapijsko odeljenje, Strasbur, Francuska, (13.06. – 08.07.2005.) u okviru projekta koji je finansirala Francuska vlada.

Prezentovala je više radova na sekcijama i kongresima u zemlji i inostranstvu.

Do sada je objavila 20 radova u domaćim i inostranim časopisima. Autor je poglavlja u 3 monografije, i poglavlja "Radioterapije karcinoma dojke" u knjizi "Rak dojke" objavljenoj

2014.g. Učestvovala je u izradi Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke objavljenog 2013.g. Takodje je bila jedan od autora monografije "Institut za onkologiju i radiologiju Srbije – od osnivanja do 2015. godine".

Aktivno govori engleski jezik.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a _____ Jasmina Mladenović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

"Korelacija bioloških markera sa odgovorom na preoperativnu radioterapiju lokalno odmaklog neinflamatornog karcinoma 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, 14.09.2017.

Jasmina Mladenović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jasmina Mladenović

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada "Korelacija bioloških markera sa odgovorom na preoperativnu
radioterapiju lokalno odmaklog neinflamatornog karcinoma dojke"

Mentor Prof. dr Vesna Plešinac Karapandžić,

Komentor N.Sar. dr Snežana Šušnjar

Potpisani Jasmina Mladenović

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, 14.09.2017.

Jasmina Mladenović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

”Korelacija bioloških markera sa odgovorom na preoperativnu radioterapiju lokalno odmaklog neinflamatornog karcinoma dojke”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima 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).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 14.09.2017.

Jasmina Mladenović