

Patogenetski značaj mutacija u genu PIK3CA u bolesnica s rakom dojke

Čular, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:522958>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-14**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Katarina Čular

**Patogenetski značaj mutacija u genu
PIK3CA u bolesnica s rakom dojke**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za Patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu i Klinici za Onkologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom doc. dr. sc. Natalije Dedić Plavetić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

POPIS KRATICA

ABC- uznapredovali rak dojke, engl. *advanced breast cancer*

AKT- Protein kinaza B

BCRP- protein za rezistenciju tumora dojke, engl. *breast cancer resistance protein*

CDK- kinaze ovisne o ciklinu, engl. *cyclin dependent kinases*

CI- interval pouzdanosti, engl. *confidence interval*

CTC- cirkulirajuće tumorske stanice, engl. *circulating tumor cells*

ctDNA- cirkulirajuća tumorska DNA, engl. *circulating tumor DNA*

EGFR- receptor za epidermalni čimbenik rasta, engl. *epidermal growth factor receptor*

EMA- Europska agencija za lijekove, engl. *European Medicines Agency*

ER- estrogenski receptori

ESMO- Europska organizacija za onkologiju, engl. *European Society for Medical Oncology*

FDA- Agencija za hranu i lijekove, engl. *U.S. Food and Drugs Agency*

HER2- humani epidermalni receptor 2

INK4- inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 4, engl. *inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*

MAPK- mitogenom aktivirana proteinska kinaza, engl. *mitogen-activated protein kinases*

mBC- metastatski rak dojke engl. *metastatic breast cancer*

mTOR- meta za rapamicin, engl. *mammalian target of rapamycin*

OS- ukupno preživljenje, engl. *overall-survival*

PCR- polimerazna lančana reakcija, engl. *polymerase chain reaction*

PFS- preživljenje bez progresije engl. *progression-free survival*

PI3K- fosfoinozimid 3-kinaza, engl. *phosphoinositide 3-kinases*

PIP- fosfatidil fosfat, engl. *Phosphatidylinositol phosphate*

PgR- progesteronski receptori

PTEN- Homolog fosfataze i tenzina, engl. *phosphatase and tensin homolog*

SE- standardna pogreška, engl. *standard error*

TTF- vrijeme do neuspjeha terapije, engl. *time to treatment failure*

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	vii
SUMMARY	viii
1. UVOD	1
1.1 EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA DOJKE	1
1.2 PODJELA KARCINOMA DOJKE	2
1.3 PI3K/AKT/mTORC SIGNALNI PUT.....	3
1.3.1 ULOGA PI3K U KARCINOMU DOJKE.....	4
1.3.2 PIK3CA MUTACIJE	4
1.3.3 DETEKCIJA PIK3CA MUTACIJA	5
1.3.4. PI3K INHIBITOR	6
1.4 KINAZE OVISNE O CIKLINU 4 I 6	7
1.4.1 CDK 4/6 INHIBITORI.....	7
2. HIPOTEZA	9
3. CILJ RADA.....	10
4. ISPITANICI I METODE.....	11
4.1 ISPITANICI	11
4.2 ANALIZA PIK3CA MUTACIJA.....	11
4.3 ANALIZA PODATAKA	12
5. REZULTATI	13
6. RASPRAVA	20
7. ZAKLJUČAK.....	22
8. ZAHVALE	24
9. LITERATURA	25

10. ŽIVOTOPIS.....	33
--------------------	----

SAŽETAK

Patogenetski značaj mutacija u genu PIK3CA kod bolesnica s rakom dojke

Katarina Čular

Karcinom dojke je maligna bolest s najvećom incidencijom i prevalencijom na svjetskoj razini. Predstavlja glavni uzrok smrti od malignih bolesti kod žena u svijetu, a njegova incidencija i dalje raste. Jedan od čimbenika za nastanak karcinoma su PIK3CA mutacije koje dovode do pretjerane aktivacije PI3K/AKT/mTOR signalnog puta koji može nizvodno aktivirati mnoštvo drugih signalnih puteva koji dovode do nastanka karcinoma dojke. PIK3CA mutacije su povezane s razvojem rezistencije na endokrinu terapiju i kemoterapiju te s agresivnijom kliničkom slikom i lošijom prognozom. Pretjerana aktivacija CDK 4/6 kompleksa također dovodi do nastanka karcinoma dojke, a njegova aktivacija može biti potaknuta PIK3CA mutacijama. Provedena je retrospektivna kohortna studija s 203 pacijentice koje su terapiju CDK 4/6 inhibitorima započele u KBC-u Zagreb od 01.08.2018. do 01.10.2020. Kod 76 pacijentica je provedena molekularna analiza za PIK3CA mutacije. Cilj istraživanja bio je usporediti agresivnost kliničke slike i odgovora na terapiju CDK 4/6 inhibitorima između pacijentica s potvrđenom mutacijom i pacijentica bez mutacije. Kod 32 pacijentice je identificirana PIK3CA mutacija, a najčešća mutacija je bila H1047X mutacija u eksonu 20. Utvrđeni su povećani relativni rizici kod pacijentica s PIK3CA mutacijom za isključivo visceralnu bolest (3,208) i za infiltraciju koštane srži (4,125). Relativni rizik za inicijalno metastatsku bolest je također bio povećan (1,455). Sva tri čimbenika odraz su agresivnije kliničke slike. Medijan vremena do neuspjeha terapije kod pacijentica s mutacijom (21 mjesec) je bio 5 mjeseci kraći nego kod pacijentica bez mutacije (26 mjeseci), a rizik za progresiju bolesti je iznosio 1,372. Preživljenje je također bilo kraće kod pacijentica s mutacijom, 30,32 mjeseca naspram 32,35 mjeseci. Dobiveni podaci podupiru hipotezu da pacijentice s PIK3CA mutacijom imaju težu kliničku sliku s kraćim odgovorom na terapiju CDK 4/6 inhibitorima i kraćim sveukupnim preživljenjem.

Ključne riječi: karcinom dojke, PIK3CA mutacije, CDK 4/6 inhibitori, liječenje

SUMMARY

The pathogenetic role of PIK3CA gene mutations in breast cancer patients

Katarina Čular

Breast cancer is the malignant disease with the highest incidence and prevalence in the world. It is the main cause of death from malignant diseases among women in the world and its incidence is still on the rise. PIK3CA mutations are an important factor in tumour formation. They lead to an overactivation of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway which can activate many other pathways downstream that can cause breast cancer. PIK3CA mutations have been associated with resistance to endocrine therapy and chemotherapy and with a more aggressive disease and worse prognosis. Overactivation of the CDK 4/6 complex can also lead to breast cancer, and its activation can be caused by PIK3CA mutations. A retrospective cohort study was performed with 203 patients that started therapy with CDK 4/6 inhibitors at KBC Zagreb between August 2020. and October 2020. A molecular analysis for PIK3CA mutations was performed in 76 patients. The goal of the study was to compare the outcome and clinical presentation of patients with the mutation to the ones without it. A PIK3CA mutation was identified in 32 patients, and the most common subtype was the H1047X mutation in exon 20. Patients with the mutation had an increased relative risks for visceral-only disease (3.208) and bone marrow infiltration (4.125). The relative risk of *de novo* metastatic disease was also increased (1.455). All three factors depict a more aggressive disease. The time to treatment failure median was 5 months shorter in patients with a mutation (21 months) than in those without it (26 months) and the risk for disease progression was 1.372. Overall survival was also shorter, 30.32 months compared to 32.35 months. The results of the study support the hypotheses that patients with PIK3CA mutations have a more aggressive disease with a shorter response to therapy with CDK 4/6 inhibitors and shorter overall survival.

Keywords: breast cancer, PIK3CA mutations, CDK 4/6 inhibitors, treatment

1. UVOD

Karcinom dojke je najčešća maligna bolest u ženskoj populaciji te najčešći uzrok smrti od malignih bolesti u žena. Sistemsko liječenje karcinoma dojke pretežito je određeno karakteristikama karcinoma, prvenstveno ekspresijom estrogenskih receptora (ER), progesteronskih receptora (PgR) i receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2, engl. *human epidermal growth factor receptor 2*). U zadnje vrijeme se sve veća važnost pridaje i genetskim karakteristikama tumora. Međutim, unatoč postojanju mnogih terapijskih opcija, uznapredovali karcinom dojke (ABC, engl. *advanced breast cancer*) je i dalje neizlječiva bolest. Najčešći podtip karcinoma je ER+/HER2 negativan tumor. Primarno liječenje za te tumore je već duže vrijeme endokrina terapija, ali se sve više zamjećuje endokrina rezistencija zbog koje izostaje odgovor na terapiju. U novije vrijeme, pronađene su nove terapijske opcije koje odgađaju i smanjuju pojavu endokrinu rezistenciju te terapijske opcije koje kao metu imaju druge čimbenike nastanka tumora kao što su kinaze ovisne o ciklinu (CDK, engl. *cyclin dependent kinsae*) 4/6 i PI3K (engl. *phosphoinositide 3-kinases*) enzim. Aktivirajuće mutacije u PI3K signalnom putu se nalaze u 30-40% pacijentica s karcinomom dojke, te su povezane s rezistencijom na endokrinu terapiju i na kemoterapiju (1). Stoga je inhibicija PI3K signalnog puta postala vrlo aktualna tema u zadnjem desetljeću.

1.1 EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA DOJKE

Procijenjeno je da su tijekom 2020. godine, u svijetu, utvrđena 2.3 milijuna nova slučaja karcinoma dojke među ženama te da je 685 000 žena umrlo od karcinoma dojke. Rak dojke čini 24,5% novootkrivenih malignih bolesti kod žena te 15,5% uzroka smrti od malignih bolesti kod žena. Karcinom dojke je maligna bolest s najvećom incidencijom i prevalencijom na svjetskoj razini. Petogodišnja prevalencija karcinoma dojke među ženama na kraju 2020. je iznosila 7 milijuna slučaja, to jest 201 slučaj na 100 000 žena (2).

Karcinom dojke je najčešće sijelo malignih bolesti kod žena u Hrvatskoj te je 2018. godine predstavljao 24% novih slučajeva raka kod žena, te su te godine zabilježena 2845 nova slučaja među ženama. Mortalitet od raka dojke među ženama je iznosio 789 pacijentica, te je bio drugi uzrok smrti od malignih bolesti kod žena, nakon raka traheje, bronha i pluća. Omjer mortaliteta i incidencije je iznosio 0,28. Standardizirana stopa incidencije za svjetsko stanovništvo je bila

69,7/100 000 žena s kumulativnom incidencijom (0-74) od 8,0. 2018. godine, 39,7% slučajeva raka dojke otkriveno je u lokaliziranom stadiju, 22,0% u regionalno proširenom stadiju, a 4,4% u stadiju udaljenih metastaza, dok je za ostatak stadij bio nepoznat (3). U posljednjih 25 godina u Hrvatskoj se bilježi porast dobno-standardizirane incidencije raka dojke, dok su trendovi stope mortaliteta stabilni (4).

1.2 PODJELA KARCINOMA DOJKE

Na temelju molekularne klasifikacije tumori dojke se mogu podijeliti na 4 podtipa: luminalni A, luminalni B, slični bazalnim stanicama i HER2 pojačani. Luminalni A tumori imaju visoku izraženost epitelnih gena i jak signalni put estrogena, dok luminalni B tumori imaju manju izraženost epitelnih gena i nizak signalni put estrogena, ali veću razinu gena za proliferaciju i HER2 povezanih gena. Slični bazalnim tumori imaju visoku izraženost bazalnih epitelnih gena i gena za proliferaciju, a nisku razinu HER2 i ER povezanih gena. HER2 pojačani tumori imaju visoku izraženost gena povezanih s HER2, a nisku izraženost ER povezanih gena (5). Imunohistokemijske karakteristike luminalnih A tumora su ER+, PgR \geq 20%, HER2 negativni s niskim Ki67, a luminalnih B ER+, PgR < 20% s visokim Ki67 (>30%) (6). Slični bazalnim tumori su ER-, PgR-, HER2-, zbog čega se još nazivaju i trostruko negativnima, a HER2 pojačani tumori su ER-, PgR-, HER2+. Najčešće mutacije luminalnih A tumora su PIK3CA (45%), GATA3 (14%), MAP3K1 (13%) i TP53 (12%) mutacije, luminalnih B tumora PIK3CA (29%), TP53 (29%) i MAP3K1 (5%), sličnih bazalnim TP53 (80%) i PIK3CA (9%), a HER2 pojačanih TP53 (72%), PIK3CA (39%) i PIK3R1 (4%) mutacije (7).

Karcinom dojke se također može podijeliti s obzirom na uznapređovalost bolesti. Rani rak dojke je tumor koji se nije proširio van dojke ili aksilarnih limfnih čvorova. Primarna terapija kod tih pacijentica je operacija s ili bez neoadjuvantnog i adjuvantnog liječenja. Lokalno uznapređovali rak dojke je tumor koji se proširio u obližnje limfne čvorove, a kada postoje metastaze u udaljenim mjestima riječ je o metastatskom karcinomu dojke (mBC, engl. *metastatic breast cancer*). Uznapređovali rak dojke je naziv koji obuhvaća lokalno uznapređovali neoperabilni rak dojke i metastatski rak dojke. Temeljna terapija kod tih karcinoma je sustavna terapija (8).

1.3 PI3K/AKT/mTORC SIGNALNI PUT

Ljudske stanice imaju tri razreda PI3K enzima. U ovom radu poseban značaj je posvećen prvom razredu koji ima 4 katalitičke izoforme, p110 α , β , γ i δ koje kodiraju geni PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG i PIK3CD. Prvi razred PI3K enzima mogu aktivirati fosforilirani unutarstanični dijelovi tirozin kinaza receptora, Ras-slični GTP-aza i heterotrimerički G proteini. Svaka izoforma ima domenu koja veže Ras-slične GTP-aza proteine. Posebnu skupinu razreda I, skupinu IA, čine p110 α , β i δ , koji imaju zasebnu SH2 regulatornu domenu koja se veže na receptore za faktore rasta ili adapter proteine. Skupina IB, koju čini p110 γ , ima regulacijske domene p101 i p87 koje se vežu na aktivirane heterotrimeričke G proteine (9). Enzimi razreda I kataliziraju fosforilaciju PtdIns-4,5-P₂ (PIP₂) u PtdIns-3,4,5-P₃ (PIP₃). Taj fosfolipid djeluje kao glasnik za usmjeravanje citoplazmatskih proteina na specifične dijelove endomembrane ili plazmatske membrane. Enzimi p110 α i β su ubikvitetni, a δ i γ se pretežito nalaze u imunološkim stanicama. Svaka katalitička podjedinica tvori dimer s regulacijskom podjedinicom koja određuje njihovu aktivnost i lokalizaciju. U normalnim stanicama reakcija fosforilacije je prolazno potaknuta faktorima za rast te se njen produkt, PIP₃, brzo metabolizira lipidnim fosfatima, uključujući tumor supresor PTEN, te se uklanjanjem 3'-fosfata prekida signalni put PI3K enzima. U tumorskim stanicama je povećana količina PIP₃ zbog pretjerane aktivacije PI3K enzima onkogenima uzvodno od PI3K gena ili mutacijom u samom PI3K genu. Gubitak PTEN funkcije također može dovesti do povećane količine PIP₃ zbog smanjenog metabolizma (10). PIK3CA i PTEN geni su ustanovljeni kao drugi i treći najviše mutirani geni u malignim bolestima (11).

Višestruki nizvodni signalni putevi mogu istovremeno biti aktivirani PI3K enzimom. Najčešće dolazi do aktivacije podjedinica AKT potporodice AGC serin/treonin kinaza. AKT1 signalna molekula inhibira apoptozu te time osigurava preživljenje stanice, a također može inducirati sintezu proteina i time rast tkiva. AKT2 je dio inzulinskog signalnog puta te je ključan za transport glukoze (12). Drugi važan efektor PI3K puta je mTOR. To je serin/treonin kinaza koja tvori dva stanična kompleksa, mTORC1 i mTORC2. Kompleks mTORC2 sudjeluje u regulaciji proliferacije, preživljenja i migracije stanice te remodeliranju citoskeleta (13). Kompleks mTORC1 promovira anabolički metabolizam (potiče glikolizu i biosintezu proteina, lipida i nukleotida) i rast i proliferaciju stanice. Također pokreće snažnu negativnu povratnu vezu za signalizaciju putem receptora za faktor rasta, stoga je njegovom inhibicijom povećana aktivacija PI3K signalnog puta (14).

1.3.1 ULOGA PI3K U KARCINOMU DOJKE

Najučinkovitija metoda liječenja karcinom s pozitivnim hormonskim receptorima je primjena endokrine terapije. Glavna prepreka tom liječenju je pojava primarne i sekundarne endokrine rezistencije u tumorskim stanicama. Primarna endokrina rezistencija se definira kao povrat bolesti unutar prve 2 godine adjuvantnog liječenja ili progresija unutar prvih 6 mjeseci endokrinog liječenja mBC-a. Sekundarna endokrina rezistencija je povrat bolesti tijekom ili 12 mjeseci nakon završetka adjuvantnog liječenja, ali nakon 2 godine od početka liječenja ili nakon 6 mjeseci endokrinog liječenja za mBC (15). Hiperekspresija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta potiče ovisnu i neovisnu transkripciju estrogenskih receptora unatoč njihove inhibicije endokrinom terapijom što pridonosi nastanku endokrine rezistencije te rastu tumora (16). *In vivo* istraživanja su pokazala da inhibicija PI3K i mTOR enzima može vratiti endokrinu osjetljivost (17).

U tumorima se također može pojaviti i kemorezistencija, to jest rezistencija na kemoterapiju. Istraživanja su pokazala da PI3K/AKT potiče nastanak kemorezistencije kroz različite mehanizme. Jedan od mehanizama je povećanje izlaska kemoterapijskih lijekova kroz ATP-vezujuće kazete. Nadalje, pretjerana ekspresija BCRP i P-gp proteina (čiji je izražaj određen PI3K/AKT/mTOR signalnim putem) posreduje izbacivanje taksana i antraciklina iz stanice. Još jedan mehanizam nastanka rezistencije je fosforilacija AKT-a koja je povezana s preživljenjem i migracijom stanica, a supresija AKT-a je povezana s apoptozom rezistentnih stanica.(18) Novija istraživanja također pokazuju da inhibicija PI3K može vratiti osjetljivost tumorskih stanica na kemoterapiju (19).

1.3.2 PIK3CA MUTACIJE

Gen PIK3CA se nalazi na kromosomu 3q26.32 te kodira katalitičku podjedinicu p110 α enzima PI3K skupine IA. To je najčešće mutirani gen u karcinomu dojke. Postoje različiti rezultati o prediktivnoj ulozi PIK3CA mutacija. U ranom karcinomu dojke, pacijentice s PIK3CA mutacijom u većini istraživanja imale su bolju prognozu te manju učestalost razvitka invazivne bolesti, ali u metastatskom karcinomu dojke su imale lošiju prognozu od pacijentica bez PIK3CA mutacije (20). Većina PIK3CA somatskih mutacija grupirane su na eksonu 9 (helikalnoj domeni)

i eksonu 20 (kinaznoj domeni) (21). Najčešće mutacije u PIK3CA genu u tumorima dojke su H1047R, E542K i E545K. H1047R mutacija na eksonu 20 poboljšava interakciju kinazne domene s membranom i zaobilazi Ras sustav pri aktivaciji p110 α (22). E542K i E545K mutacije na eksonu 9 sprječavaju interakciju nSH2 podjedinice p85 inhibitornog proteina s helikalnom domenom p110 α te time onemogućuju njegovu inaktivaciju (23). Određene studije su pokazale da mutacije na eksonu 9 koreliraju s lošijom prognozom, a mutacije na eksonu 20 s boljom prognozom (24). Manje česte su N345K (ekson 4) i C420R (ekson 7) mutacije, koje onemogućuju inaktivaciju p110 α inhibiranjem povezivanja C2 katalitičke domene p110 α s iSH2 domenom p85 inhibitornog proteina (25). U jednom preglednom istraživanju u kojem su pregledani podaci od 6338 pacijentica, učestalost PIK3CA mutacija u karcinomima dojke je bila 35,7%, s najvišom prevalencijom u luminalnom A karcinomu (45%). Pet najčešćih mutacija su bile: H1047R (35%), E545K (17%), E542K (11%), N345K (6%) i H1047L (4%). Od pacijentica s PIK3CA mutacijom, 11,8% ih je imalo dvije mutacije a 0,7% 3 ili više mutacija (26). Pojavnost zasebnih mutacija PIK3CA gena je rijetka (9-16%) kod trostruko negativnog karcinoma dojke, međutim kombinirane aktivirajuće mutacije PIK3CA gena s inaktivirajućim mutacijama PTEN gena se pojavljuju češće te su identificirane u 25-30% uznapredovanih trostruko negativnih karcinoma (27).

1.3.3 DETEKCIJA PIK3CA MUTACIJA

Uzorci tumora za molekularnu analizu se mogu dobiti biopsijom tkiva ili tekućom biopsijom. Pri analizi biopsije tkiva najčešće se koriste parafinske kocke tumorskog tkiva. Uzorak tkiva tumora dojke koji se dobije tijekom biopsije ili operacije prvo se fiksira u formalinu za očuvanje proteinske i vitalne strukture tkiva. Fiksiranje se provodi pomoću 10%-nog formaldehida u trajanju od 18 do 24 sata. Uzorak se zatim mora dehidrirati i očistiti pomoću različitih koncentracija etanola. Potom se uklapa u parafinske blokove koji se mogu čuvati godinama. Njihova struktura omogućava lakše rezanje te se naknadno po potrebi rade tanki rezovi tkiva na mikrotomu debljine 3-4 mikrometra. Rezovi tkiva mogu se postaviti na mikroskopska stakalca za daljnja proučavanja ili se koristiti za detekciju DNA i RNA (28). Kod tekuće biopsije uzima se uzorak periferne krvi u kojoj se mogu detektirati cirkulirajuće tumorske stanice (CTC, engl. *circulating tumor cells*) i cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA, engl. *circulating tumor DNA*). CTC su stanice podrijetlom iz primarnog tumora koje mogu posredovati u nastanku metastaza te

mogu bolje karakterizirati metastaze koje nemaju uvijek ista biološka obilježja kao primarni tumor. Njihova vrijednost korelira s ukupnim preživljenjem pacijenta i s razdobljem bez bolesti, stoga su CTC-i dobri terapijski pokazatelji. Slobodnu cirkulirajuću DNA koja je tumorskog porijekla predstavlja ctDNA te se iz nje mogu detektirati epigenetske i genetske promjene, abnormalne metilacije, mutacije, translokacije i amplifikacije. Najveća prednost analize ctDNA je mogućnost detekcije genetičkih promjena koje su zastupljene unutar tumora u manjem broju ili koje su prisutne samo u metastazama te stoga nisu identificirane klasičnom biopsijom tkiva(29). Obje metode kod istih pacijenata ne daju uvijek iste rezultate te se pokazalo da detekcija pik3ca mutacija iz uzorka tkiva ima veću osjetljivost. U jednom istraživanju PIK3CA mutacije su pronađene u 50,0% uzoraka tkiva naspram 37,5% uzoraka plazme. Od 58 ispitanica u tom istraživanju, kod 9 je pronađena mutacija isključivo u uzorku tkiva, a kod 4 pacijentice samo u uzorku plazme (30). Također postoje različiti PCR testovi za identifikaciju PIK3CA mutacija unutar uzorka. Glavne razlike u testovima su broj mutacija koje se mogu detektirati. Većina testova detektiraju najmanje 11 mutacija u eksonima 7, 9 i 20, a prošireni testovi detektiraju do 17 mutacija u eksonima 1, 4, 7, 9 i 20 (31,32). Trenutne preporuke FDA-a (U.S. Food and Drugs Association) su da se prvo napravi analiza ctDNA, a ako je negativna da se nadopuni analizom tumorskog tkiva (33).

1.3.4. PI3K INHIBITOR

Jedini odobren PI3K inhibitor za liječenje karcinoma dojke je alpelisib (Piqray). EMA (Europska agencija za lijekove, engl. *European Medicines Agency*) ga je odobrila u srpnju 2020. za liječenje postmenopausalnih žena s HR+/HER2 negativnim ABC-om kod kojih je utvrđena PIK3CA mutacija, a koristi se u kombinaciji s fulvestrantom (34). Alpelisib selektivno inhibira p110 α katalitičku izoformu PI3K enzima PI3K/AKT signalnog puta te time inhibira preživljenje i rast tumorskih stanica. Njegova efikasnost je utvrđena u SOLAR-1 istraživanju, preživljenje bez progresije (PFS, engl. *progression-free survival*) pacijentica koje su primale alpelisib i fulvestrant bio je 11.0 mjeseci, a pacijentica koje su primale placebo i fulvestrant 5.7 mjeseci (35). Najčešće nuspojave njegove primjene su hiperglikemija, proljev, osip, neutropenija, hepatotoksičnost, povraćanje i gubitak kose. Hiperglikemija je zabilježena kod 79% pacijentica te je u ESMO (engl. *European Society for Medical Oncology*) smjernicama preporučeno da se ne primjenjuje kod dijabetičara ili pacijentica s povišenim HbA1c (15).

1.4 KINAZE OVISNE O CIKLINU 4 I 6

Tijekom prolaska stanica kroz stanični ciklus postoje kontrolne točke u kojima se provjerava da li je stanica spremna ući u sljedeću fazu staničnog ciklusa. U tim kontrolnim točkama se zaustavlja prolazak stanica s oštećenim DNA. Najvažniju ulogu u regulaciji staničnog ciklusa imaju ciklini, kinaze ovisne o ciklinu i inhibitori kinaza ovisnih o ciklinu. Ciklini i CDK-i su apoenzimi koji stvaraju pobudne signale u stanici. Međusobnim vezanjem oblikuju kinaze koje fosforiliraju retinoblastomski (RB) protein, te time smanjuju afinitet RB-a za E2F čimbenike koji pokreću diobu. Čimbenici E2F vežu se na promotore gena za diobu stanice te zajedno pokreću diobu stanice. Kočni signali (primjerice p21, p16 i p27) se vežu na CDK-ciklinske sklopove čime ti sklopovi gube svoju kinaznu aktivnost. Mutacije regulacijskih čimbenika uzrokuju slobodnu progresiju ciklusa i prijepis DNA bez popravka nastalih pogrešaka (36).

Enzimi CDK 4 i CDK 6 stvaraju kompleks s ciklinom D1. Aktivacija tog kompleksa potiče hiperfosforilaciju RB proteina i p107 i p130 proteina. Njihovom fosforilacijom otpušta se transkripcijski faktor E2F1 koji pokreće sintezu proteina koji su potrebni za prijelaz iz G1 faze u S fazu staničnog ciklusa. Hiperaktivnost CDK4/6 uočena je u mnogim malignim bolestima, uključujući gliome, sarkome, limfome, melanome, karcinome dojke, planocelularne karcinome i leukemije (37). Uloga CDK4/6 u nastanku maligne bolesti je najviše proučavana u karcinomima dojke, te je CDK4/6 kompleks postao jedna od meta za terapiju metastatskog karcinoma dojke. Mnogi faktori utječu na aktivnost CDK4/6 u karcinomima dojke. Mitogeni signalni putevi pretežno potiču aktivnost CDK4/6 većom količinom ili stabilnošću ciklina D1. Ti putevi uključuju signaliziranje preko EGFR i HER2, PI3K-AKT-mTOR puta i estrogenskih receptora. Endogeni faktori koji inhibiraju aktivnost CDK4/6 su INK4 (engl. *inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*) proteini p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, i p19^{INK4d}. Ti proteini se vežu na CDK kompleks te onemogućuju njegovo vezanje s ciklinom D (38).

1.4.1 CDK 4/6 INHIBITORI

Inhibitori CDK 4/6 blokiraju enzime CDK 4 i CDK 6 koji su bitni za diobu stanica te dovode do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1 fazi i smanjenja preživljenja i proliferacije tumorskih stanica. U onkologiji se koriste za liječenje HR+/ HER2 negativnog ABC-a. Tri su

lijeka odobrena za tu indikaciju, palbociklib (Ibrance), ribociklib (Kisqali) i abemaciclib (Verzenio), a koriste se u kombinaciji s endokrinom terapijom aromataznim inhibitorom ili fulvestrantom. Prema ESMO preporukama CDK4/6 inhibitori se preporučaju kao prva linija liječenja HR+/HER2 negativnog ABC-a zbog značajnog poboljšanja PFS-a i ukupnog preživljenja (OS, engl. *overall-survival*) s poboljšanom ili nepromijenjenom kvalitetom života (15).

U studenom 2016., EMA je odobrila prvi CDK 4/6 inhibitor, palbociklib, za liječenje HR+/HER2 negativnog metastatskog karcinoma dojke u kombinaciji s aromataznim inhibitorom za endokrino senzitivne ili s fulvestrantom za endokrino rezistentne tumore (39). U PALOMA-2 kliničkom istraživanju medijan PFS-a pacijentica liječenih palbociklibom i letrozolom u prvoj liniji je bio 24.8 mjeseci naspram 14.5 mjeseci kod pacijentica koje su primale placebo i letrozol (40). Također je zabilježeno produženje PFS-a kod primjene u drugoj liniji liječenja, te su u PALOMA-3 istraživanju pacijentice koje su primale palbociklib i fulvestrant imale PFS od 9.5 mjeseci naspram 4.6 mjeseci kod pacijentica koje su primale placebo i fulvestrant (41). Ribociklib je odobren u kombinaciji s letrozolom ili fulvestrantom od strane EMA-e u kolovožu 2017. (42). Njegova primjena u prvoj liniji liječenja je ispitana u MONALEESA-2, PFS pacijentica liječenih ribociklibom i letrozolom je bio 25.3 mjeseci, a 16.0 mjeseci kod pacijentica liječenih placebom i letrozolom (43). Također je provedeno zasebno istraživanje kod premenopauzalnih i perimenopauzalnih žena (MONALEESA-7) u kojem su pacijentice liječene ribociklibom imale 23.8 mjeseci PFS naspram 13.0 mjeseci kod pacijentica liječenih placebom (44). U listopadu 2018. EMA je odobrila i abemaciclib (45). Njegova primjena u prvoj liniji liječenja ispitana je u MONARCH-3 istraživanju, PFS pacijentica liječenih kombinacijom abemacicliba i aromataznog inhibitora bio je 28.12 mjeseci naspram 14.76 mjeseci kod pacijentica liječenih placebom i aromataznim inhibitorom (46). U MONARCH-2 istraživanju je pokazana i njegova efikasnost u drugoj liniji liječenja kod endokrino rezistentnih pacijentica, PFS liječenih abemaciclibom i fulvestrantom bio je 16.4 mjeseci naspram 9.3 mjeseci u kontrolnoj grupi (47). Najučestalije nuspojave primjene CDK 4/6 inhibitora su hematološki poremećaji, gastroenterološka toksičnost, hepatotoksičnost i produljenje QT intervala. Najčešće je zabilježena neutropenija (74-92%), ali je stopa popratne infekcije bila niska. Hematološki poremećaji su češće zabilježeni kod primjene palbocikliba i ribocikliba, a gastroenterološka toksičnost češće kod primjene abemacicliba (48).

2. HIPOTEZA

Pacijentice s PIK3CA mutacijom imaju težu kliničku sliku metastatskog karcinoma dojke i kod njih ranije dolazi do progresije osnovne bolesti tijekom terapije CDK 4/6 inhibitorima nego kod pacijentica bez mutacije.

3. CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja je retrospektivnom analizom medicinske dokumentacije pacijentica liječenih CDK 4/6 inhibitorima na Klinici za onkologiju KBC-a Zagreb usporediti agresivnosti kliničke slike i odgovor na terapiju kod pacijentica s PIK3CA mutacijom s pacijenticama bez detektibilne mutacije te prikazati patogenetski značaj PIK3CA mutacija na kliničku sliku i ishod metastatske bolesti.

4. ISPITANICI I METODE

Istraživanje je provedeno kao retrospektivna kohortna studija. Podaci su prikupljeni pretraživanjem bolničkog informatičkog sustava Klinike za onkologiju KBC-a Zagreb te su izdvojene sve pacijentice koje dobile odobrenje Povjerenstva za lijekove za terapiju CDK 4/6 inhibitorima od 01.08.2018. do 01.10.2020. Statistička analiza je provedena pomoću MedCalc® programa (49).

4.1 ISPITANICI

Pregledom medicinske dokumentacije pacijenata u Ambulanti za dojke Klinike za onkologiju KBC-a Zagreb identificirane su 203 pacijentice, 200 žena i 3 muškarca, na terapiji CDK 4/6 inhibitorima s aromataznim inhibitorom ili fulvestrantom. Sve pacijentice su imale ER+ i HER2 negativne ABC-e. U istraživanje su uključene postmenopauzalne i premenopauzalne žene i muškarci. Analizirani su: opći podaci o pacijentima (ime i prezime, datum rođenja i menopauzalni status), imunohistokemijske karakteristike tumora (ER, PgR, HER2 i Ki67), vrste metastaza (visceralne, jetrene, nevisceralne i infiltracija koštane srži), podaci o kliničkoj slici (status aksile, radi li se o inicijalno metastatskoj bolesti, endokrina rezistencija, linija endokrine terapije i prethodno liječenje endokrinom terapijom ili kemoterapijom), CDK 4/6 inhibitor te popratni lijek, datum početka terapije, nuspojave te identifikacija PIK3CA mutacija. Kod pacijentice koje su imale progresiju tijekom terapije je dodatno utvrđen datum prekida terapije te broj primljenih ciklusa terapije. Korišteni CDK4/6 inhibitori su bili palbociklib (Ibrance), ribociklib (Kisqali) i abemaciklib (Verzenio), a popratni lijekovi letrozol, anastrozol, eksemestan i fulvestrant. Unutar te kohorte pacijentica je izdvojena zasebna kohorta od 76 pacijentica kod kojih je provedena analiza PIK3CA mutacija.

4.2 ANALIZA PIK3CA MUTACIJA

Molekularna analiza je provedena na uzorcima tumorskog tkiva bilo primarnog karcinoma dojke bilo tkivo metastaze iz parafinskih kocki. DNA je bila izolirana iz tumorskog tkiva koristeći Cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche Molecular Systems Inc.) prema uputama proizvođača. Za automatiziranu amplifikaciju i detekciju mutacija PIK3CA gena korišteni su

cobas PIK3CA Mutation Test (RUO) (Roche Molecular Systems Inc.) i cobas z 480 analyzer uređaj s cobas 4800 programom 2.2.0 (Roche Molecular Systems Inc.). Cobas PIK3CA Mutation Test (RUO) omogućuje kvalitativnu detekciju i identifikaciju mutacija u eksonima 1, 4, 7, 9 i 20 gena PIK3CA. Test može detektirati mutacije s razinom osjetljivosti od 5% mutirane DNA. Detektibilna mutacija u eksonu 1 je R88Q, u eksonu 4 N345K, a u eksonu 7 C420R. U eksonu 9 su detektibilne 3 mutacije i njihovi podtipovi, E542K, E545X (podtipovi: E545A, E545D, E545G i E545K) i Q546X (podtipovi: Q546E, Q546K, Q546L i Q546R). U eksonu 20 su detektibilne mutacije M1043I, H1047X (podtipovi: H1047L, H1047R i H1047Y) i G1049R. (31,50–52).

4.3 ANALIZA PODATAKA

Za usporedbu agresivnosti kliničke slike izračunati su relativni rizici s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (95% CI, engl. *confidence interval*) za pojedine vrste metastaza, inicijalno metastatsku bolest i endokrinu rezistenciju. Endokrina rezistencija je definirana prema ESMO smjernicama opisanim u uvodu ovog rada (15). Pri prikupljanju podataka o vremenu do neuspjeha terapije korišten je tip 1 desnog cenzuriranja podataka sa završetkom promatranja 15.06.2021. Događaj od interesa je bila progresija maligne bolesti. Cenzurirani podatci su bili analizirani Kaplan-Meier metodom te su napravljene krivulje za TTF. Medijan TTF-a i 95% CI izračunati su kao najranije vrijeme pri kojem vjerojatnost da nije došlo do TTF-a pada ispod 50% (Brookmeyer & Crowley, 1982). Prosječna sredina, njen 95% CI i standardna pogreška (SE, engl. *standard error*) su izračunati kao površina pod krivuljom TTF-a (Klein & Moeschberger, 2003). Za oba izračuna su korišteni i cenzurirani podaci pacijentica kod kojih nije došlo do progresije tijekom promatranja. Za izračun statističke značajnosti korišteni su log-rank test i Hi-kvadrat test. Također je izračunat rizik progresije bolesti s 95%-tnim intervalom pouzdanosti. Nadalje, pomoću Kaplan-Meier metode, napravljena je analiza OS-a s izračunom medijana, prosječne sredine, rizika smrti, log-rank testa i Hi-kvadrat testa.

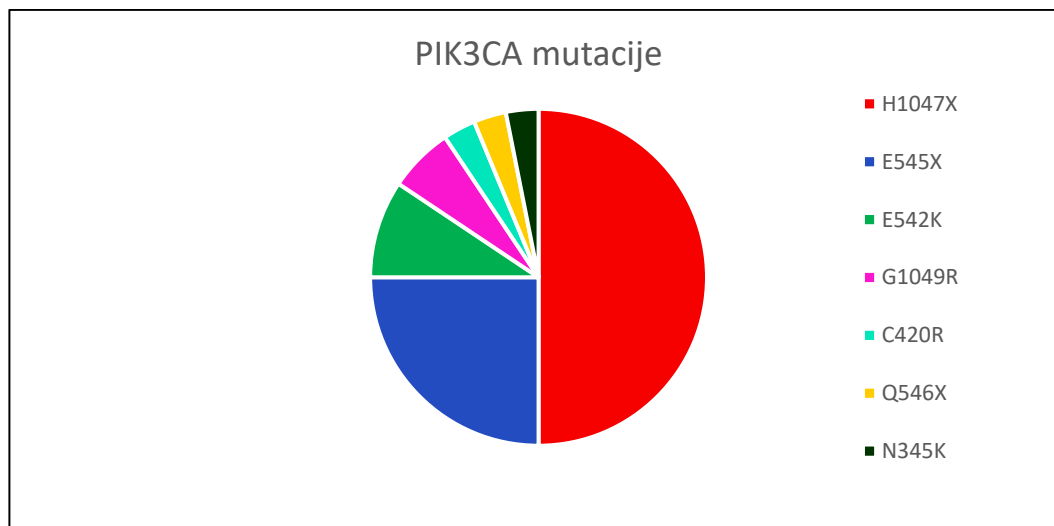
5. REZULTATI

Tijekom istraživanja analiza PIK3CA mutacije je provedena kod 73 od 203 pacijentice. 32 (43,85%) pacijentice, 30 žena i 2 muškarca, su imale detektabilnu mutaciju, a kod 44 pacijentice molekularnom analizom nije pronađena mutacija. Medijan dobi pri početku liječenja je 53.5 godina (30-79 godina). Medijan praćenja je 23 mjeseca (95% CI 20-25), a prosječno praćenje je 22,61 mjeseca (95% CI 20,92-24,31). U Tablici 1. su prikazani CDK 4/6 inhibitori koji su korišteni u terapiji te popratni lijekovi koji su se koristili uz njih. Inhibitori aromataze su pretežno korišteni kod pacijentica bez endokrine rezistencije, a fulvestrant kod pacijentica s endokrinom rezistencijom.

Tablica 1. Primijenjeni CDK 4/6 inhibitori i popratni lijekovi.

Vrsta terapije	PIK3CA negativne	PIK3CA pozitivne	Ukupno
Palbociklib	28	12	40
+ aromatazni inhibitor	5	3	8
+ fulvestrant	23	9	32
Ribociklib	14	17	31
+ aromatazni inhibitor	10	12	22
+ fulvestrant	4	5	9
Abemaciclib	2	3	5
+ aromatazni inhibitor	0	1	1
+ fulvestrant	2	2	4

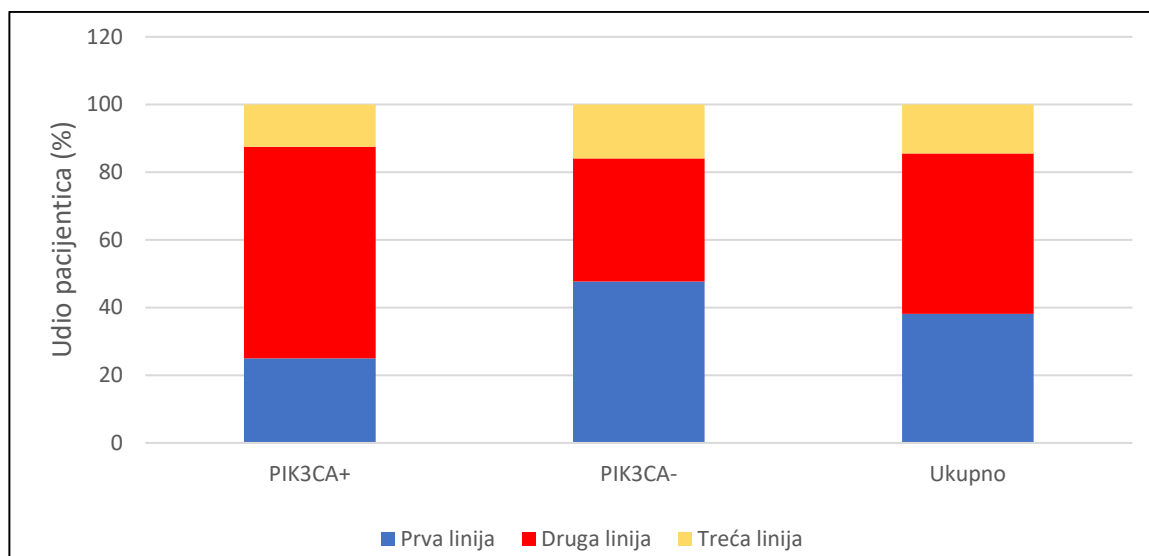
Većina pacijentica je imala 1 detektabilnu mutaciju, a samo jedna pacijentica je imala dvije mutacije, H1047X i G1049R, obje u eksonu 20. Najučestalije detektirana mutacija je bila H1047X u eksonu 20, koju je imalo 16 pacijentica (50,00%). E545X mutaciju u eksonu 9 je imalo 8 pacijentica (25,00%), a E542K mutaciju u istom eksonu 3 pacijentice (9,38%). Dvije pacijentice (6,25%) su imale G1049R mutaciju u eksonu 20. Q546X mutaciju u eksonu 9, N345K mutaciju u eksonu 4 i C420R mutaciju u eksonu 7 su imale po 1 pacijentica (3,13%). Na Slici 1. je pomoću kružnog grafikona prikazana učestalost pojedine PIK3CA mutacije kod pacijentica u istraživanju.



Slika 1. Učestalost pojedinih PIK3CA mutacija u kohorti pacijentica

Luminalni B karcinom je bio učestaliji te ga je ukupno imalo 50 pacijentica (65,79%). Luminalni A karcinom je imalo 15 (46,88%) pacijentica s PIK3CA mutacijom i 11 (25%) pacijentica bez mutacije. To jest, kod 57,69% pacijentica s luminalnim A karcinomom je utvrđena PIK3CA mutacija. Omjer izgleda za luminalni A karcinom kod pacijentica s PIK3CA mutacijom naspram pacijentica bez mutacije je bio 2,647 (95% CI 0,999-7,007, p vrijednost 0,050).

CDK 4/6 inhibitori su bili prva linija endokrine terapije kod 29 pacijentica (38,16%), a druga linija kod 36 pacijentica (47,37%). Ostatak pacijentica je primalo CDK 4/6 inhibitore u trećoj liniji (n=11, 14,47%). U skupini pacijentica s PIK3CA mutacijom, terapija CDK 4/6 inhibitorom bila je prva linija endokrine terapije za metastatsku bolest kod 8 (25%) pacijentica, druga linija kod 20 (62,5%), a treća linija kod 4 (12,50%) pacijentice. U skupini bez mutacije, 21 (47,72%) pacijentica je primala CDK 4/6 inhibitor u prvoj liniji endokrine terapije, 16 (36,36%) u drugoj i 7 (15,91%) u trećoj. Na Slici 2. su pomoću grafikona prikazani omjeri pacijentica u pojedinoj liniji endokrine terapije.



Slika 2. Udio pacijentica na terapiji CDK 4/6 inhibitorima u određenoj liniji endokrine terapije

Inicijalno metastatsku bolest je imalo 35 pacijentica. Od pacijentica s PIK3CA mutacijom 18 (56,25%) ih je imalo inicijalno metastatsku bolest, a kod pacijentica bez mutacije 17 (38,63%) pacijentica. Relativni rizik za inicijalno metastatsku bolest kod pacijentica s mutacijom je 1,455, a 95% CI 0,899-2,357 i p vrijednost 0,126.

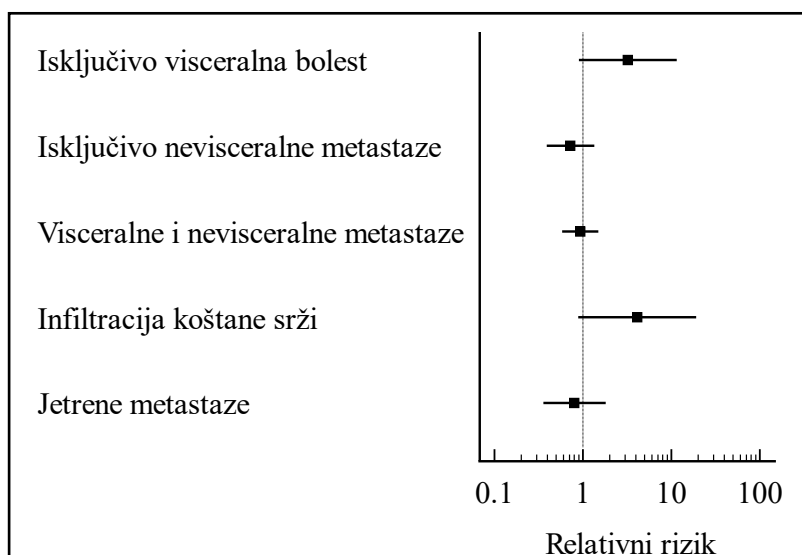
Endokrinu rezistenciju je imalo 17 pacijentica (53,13%) s mutacijom i 32 pacijentice (72,72%) bez mutacije. Relativan rizik za endokrinu rezistenciju kod pacijentica s PIK3CA mutacijom je 0,730, a 95% CI 0,503-1,060 i p vrijednost 0,098. Primarnu rezistenciju je imalo 5 pacijentica (15,63%) s mutacijom i 7 (15,91%) bez mutacije. Relativni rizik za primarnu rezistenciju za skupinu s mutacijom je 0,9821, interval 0,343-2,816 i p vrijednost 0,973. Sekundarna rezistencija je zabilježena kod 12 pacijentica (37,5%) s mutacijom i 25 (56,82%) bez mutacije. Relativni rizik za sekundarnu endokrinu rezistenciju je 0,660, a 95% CI 0,394-1,106 i p vrijednost 0,115.

U Tablici 2. prikazani su podaci o broju pacijentica s određenom skupinom metastaza s obzirom na PIK3CA status te njihov udjel unutar skupine. Zbog svoje značajnosti za kliničku sliku jetrene metastaze i infiltracija koštane srži su izdvojene kao zasebna skupina metastaza. Relativni rizik za isključivo visceralnu bolest kod pacijentica s mutacijom je 3,208, a 95% CI 0,8978-11,4652 i p vrijednosti 0,0723. Relativni rizik za isključivo nevisceralne metastaze u istoj skupini iznosi 0,724, a 95% CI 0,3910-1,3394 i p vrijednost 0,303. Za jetrene metastaze relativni rizik je 0,802 s 95% CI 0,356-1,809 i p vrijednost 0,595. Relativni rizik za prisutnost i visceralnih i nevisceralnih metastaza je 0,938, 95% CI 0,5844-1,504 i p vrijednost 0,789. Za infiltraciju koštane

srži relativni rizik kod pacijentica s mutacijom iznosi 4,125 s 95% CI 0,889-19,129 i p vrijednost 0,072. Na Slici 3. su pomoću grafa prikazani relativni rizici i njihovi 95% CI za pojedine vrste metastaza kod pacijentica s PIK3CA mutacijom.

Tablica 2. Broj i udio pacijentica s pojedinom skupinom metastaza.

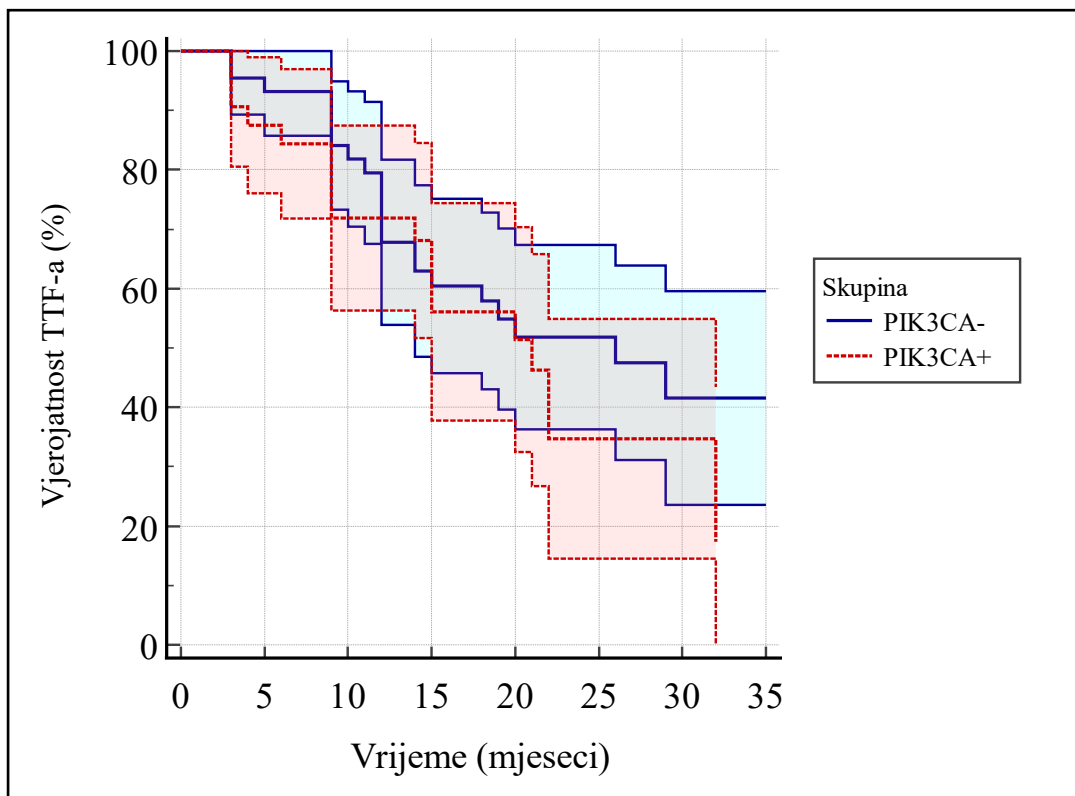
Vrste metastaza	PIK3CA negativne	PIK3CA pozitivne
Isključivo visceralna bolest	3 (6,82%)	7 (21,88%)
Isključivo nevisceralne metastaze	19 (43,18%)	10 (31,25)
Visceralne i nevisceralne	22 (50,00%)	15 (46,88%)
Jetrene metastaze	12 (27,27%)	7 (21,88%)
Infiltracija koštane srži	2 (4,55%)	6 (18,75%)



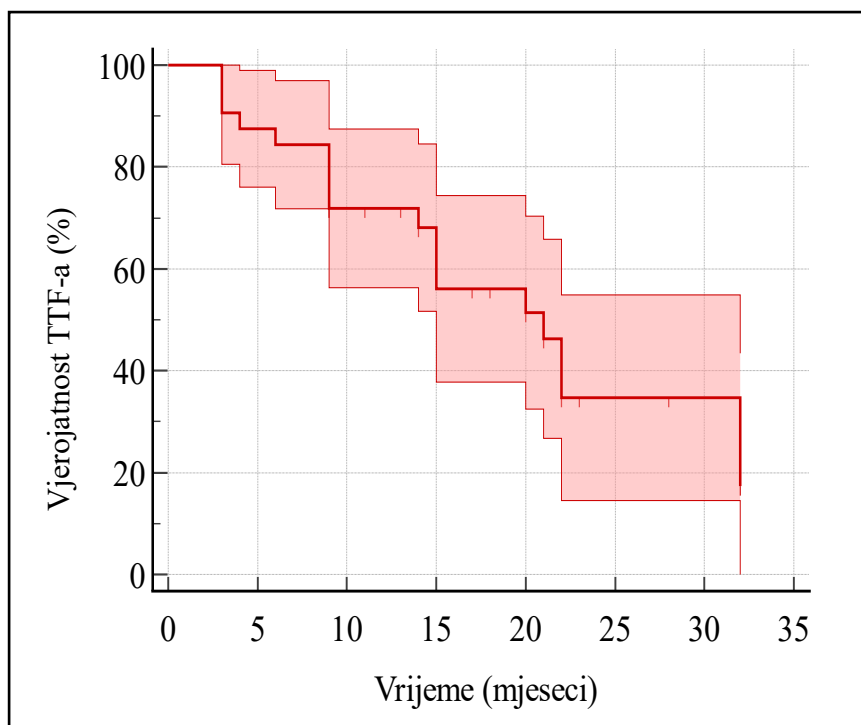
Slika 3. Relativni rizici i 95% CI za nastanak određenih vrsta metastaza kod pacijentica s PIK3CA mutacijom.

U promatranom vremenu, progresija bolesti je utvrđena kod 40 pacijentice, od kojih je 18 imalo PIK3CA mutaciju. Na Slici 4. usporedno su prikazane TTF krivulje s 95% CI za skupine pacijentica s mutacijom i bez mutacije. Na slikama 5. i 6. su zasebno prikazane TTF krivulje za pojedinu skupinu s dodatno označenim cenzuriranim podacima za pacijentice kod kojih nije došlo do progresije. Sveukupni medijan TTF-a je 21 mjeseci, a 95% CI 15 do 32 mjeseci. Medijan TTF-a za pacijentice s PIK3CA mutacijom je 21 mjeseci (95% CI 14-28), a za pacijentice bez mutacije 26 mjeseci (95% CI 14-29). Ukupni prosječni TTF za kohortu je 21,9 mjeseci s 95% CI 19,13-24,68 mjeseci i SE 1,416. Kod pacijentica s mutacijom prosječni TTF iznosi 19,71 mjeseci (95%

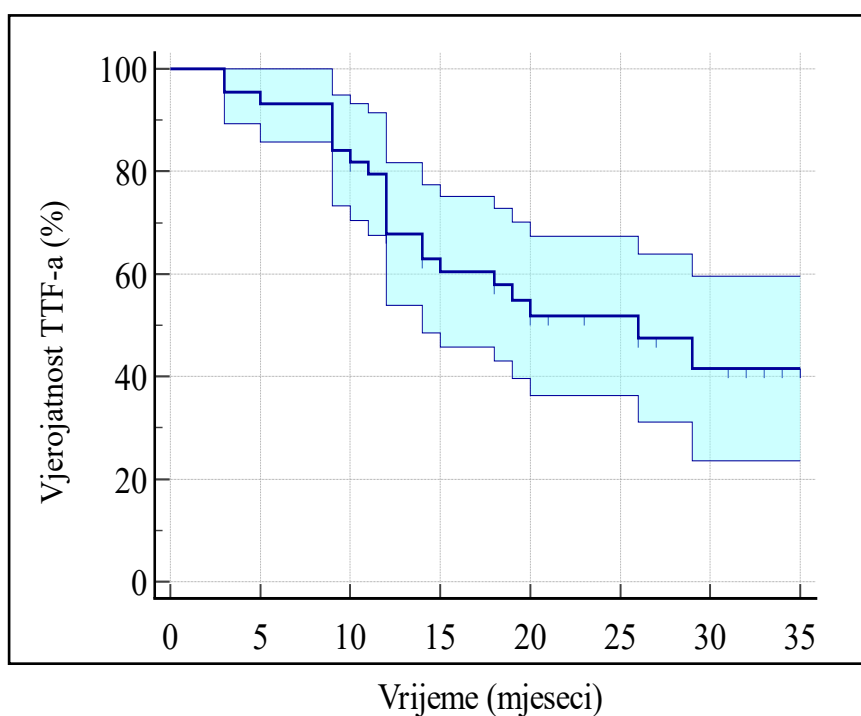
CI 15,68- 23,75, SE 2,057), a kod pacijentica bez mutacije 23,04 mjeseci (95% CI 19,47- 26,62, SE 1,823). Log-rank testom je dobivena vrijednost Hi-kvadrata od 0,883 i p vrijednost 0,347. Rizik za progresiju kod pacijentica s PIK3CA mutaciju naspram pacijentica bez mutacije je 1,372 (95% CI 0,7094- 2,6534).



Slika 4. Krivulje TTF-a s 95%-tnim intervalom pouzdanosti izrađene prema Kaplan-Meier metodi za pacijentice s i bez PIK3CA mutacije

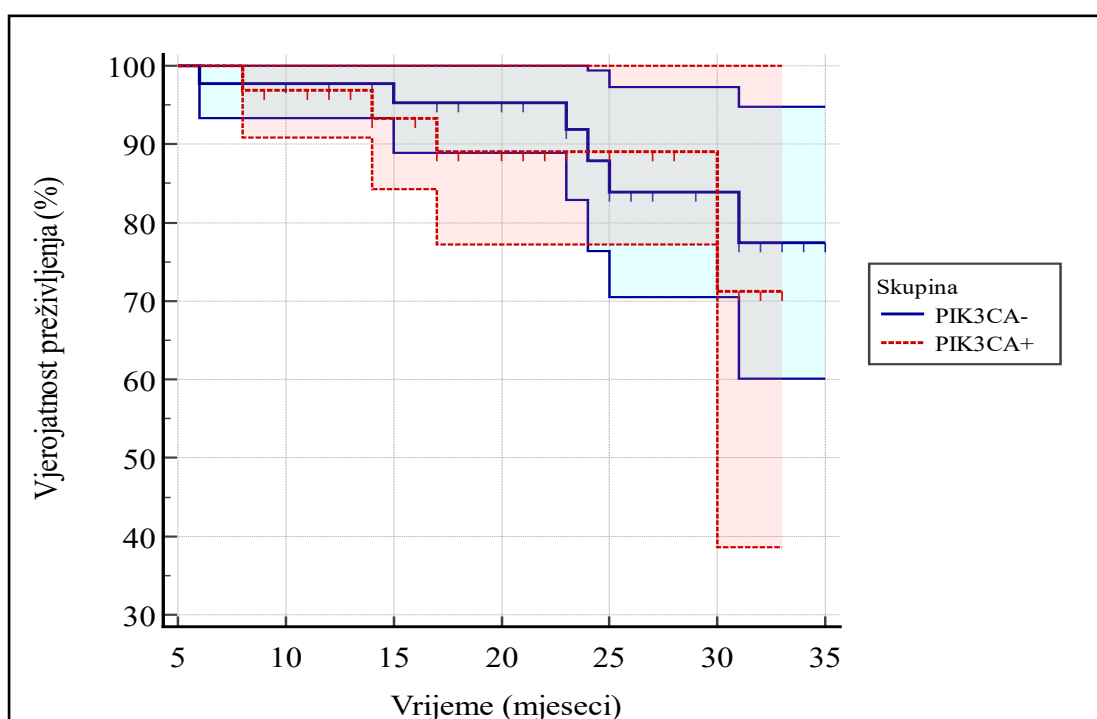


Slika 5. Krivulja TTF-a s 95% CI za pacijentice s PIK3CA mutacijom izrađena prema Kaplan-Meier metodi



Slika 6. Krivulja TTF-a s 95% CI pouzdanosti za pacijentice bez PIK3CA mutacijom izrađena prema Kaplan-Meier metodi

10 pacijentica je preminulo tijekom istraživanja, 4 s mutacijom i 6 bez. Medijan preživljenja se nije mogao izračunati jer krivulja ne opada ispod 50% u promatranom periodu. Ukupno prosječno preživljenje za kohortu je 32,080 mjeseci s 95% CI 30,402- 22,758 mjeseci i SE 0,856. Kod pacijentica s mutacijom prosječno preživljenje iznosi 30,324 mjeseci (95% CI 27.903-32,746, SE 1,235), a kod pacijentica bez mutacije 32,347 mjeseci (95% CI 30,329-34.365, SE 1,029). Hi kvadrat iznosi 0,1952, a p vrijednost 0,6587. Rizik smrti kod pacijentica s mutacijom je 1,348 (95% CI 0,3580-5.0795). Na Slici 7. su prikazane krivulje preživljenja s 95% CI za obje skupine s naznačenim cenzuriranim podacima.



Slika 7. Krivulje preživljenja s 95% CI za pacijentice s i bez PIK3CA mutacije izrađene prema Kaplan Meier metodi

6. RASPRAVA

Palbociklib je bio prvi odobreni CDK 4/6 inhibitor te se on i najduže koristi u kliničkoj praksi te je bio i najčešće korišten inhibitor kod pacijentica u istraživanju. Kombinacije palbocikliba i fulvestranta te ribocikliba i letrozola su korištene u prvim istraživanjima koja su omogućila njihovo odobrenje. Zbog toga, su se te kombinacije češće koristile u kliničkoj praksi te su ujedno i najzastupljenije kombinacije kod pacijentica u kohorti. Tri najčešće identificirane PIK3CA mutacije su bile H1047X, E545K i E542K što se podudara s prijašnjim istraživanjima (26). Većina pacijentica je CDK 4/6 inhibitore primala u drugoj liniji endokrine terapije za metastatsku bolest. CDK 4/6 inhibitori su tek nedavno odobreni te je dio pacijentica već primao drugu terapiju prije njihovog odobrenja, pa stoga dostupnost ove terapije i jest glavni razlog uvođenja u liječenje u kasnijim linijama. Luminalni B karcinom je bio učestaliji kod pacijentica u istraživanju. Kod pacijentica koje su imale luminalni A karcinom češće je identificirana PIK3CA mutacija. Pacijentice s PIK3CA mutacijom su imale značajno veću incidenciju inicijalno metastatske prezentacije bolesti što označava agresivniju bolest te time i lošiji tijek bolesti. Njihov relativni rizik je iznosio 1,455 ali je p vrijednost veća od 0,05 te se ne može reći da je podatak statistički značajan s 95%-tnom sigurnošću.

U prijašnjim istraživanjima endokrina rezistencija je bila učestalija kod pacijentica s mutacijom, međutim unutar kohorte u ovom istraživanju endokrina rezistencija je bila učestalija u skupini bez mutacije. Naime relativni rizik za endokrinu rezistenciju je kod pacijentica s mutacijom iznosio 0,730 te se time PIK3CA mutacija može obilježiti kao zaštitnički faktor za nastanak rezistencije, ali taj podatak također ne može smatrati statistički značajnim zbog velike p vrijednosti (0,098). Taj podatak se može djelomično objasniti velikom incidencijom inicijalno metastatske bolesti u skupini s mutacijom koje primaju CDK 4/6 inhibitore u prvoj liniji te još nisu razvile endokrinu rezistenciju iako će je možda kasnije razviti.

Kod pojavnosti metastaza u dvije skupine, najveća razlika je zamijećena kod infiltracije koštane srži i isključivo visceralne bolesti. Metastaze karcinoma dojke u koštane srži mogu uzrokovati poremećaje hematopoeze i posljedično pancitopeniju s povećanim rizikom infekcije, krvarenja i anemije. Infiltracija koštane srži uzrokuje težu kliničku sliku te može skratiti preživljenje. Relativni rizik za infiltraciju koštane srži kod pacijentica s mutacijom je bio 4 puta veći nego kod pacijentica bez mutacije. Visceralna bolest također pogoršava prognozu kod pacijentica s karcinom dojke, pogotovo metastaze u pluća i jetru. U prijašnjim istraživanjima,

medijan preživljenja je bio 14 mjeseci kraći kod pacijentica s isključivo visceralnim metastazama nego kod pacijentica s isključivo nevisceralnim metastazama (53). Relativni rizik za isključivo visceralnu bolest kod pacijentica s PIK3CA mutacijom iz kohorte u ovom istraživanju je bio 3 puta viši. Međutim, zbog malog uzorka, oba rezultata relativnog rizika imaju p vrijednost manju od 0,05 te nije moguće s 95%-tnom sigurnošću zaključiti da rizik stvarno postoji. Pacijentice s isključivo nevisceralnim metastazama imaju bolju prognozu preživljenja, a njihova incidencija je bila viša u skupini pacijentica bez PIK3CA mutacije. Incidencije i visceralnih i nevisceralnih metastaza i jetrenih metastaza su bile približno jednake u obje skupine. Povećane incidencije infiltracije koštane srži i visceralne bolesti kod pacijentica s PIK3CA mutacijom podržavaju hipotezu da te pacijentice imaju težu i agresivniju kliničku sliku.

Medijan TTF-a kod pacijentica s PIK3CA mutacijom je bio 5 mjeseci kraći od TTF-a kod pacijentica bez mutacije što se podupire hipotezom da PIK3CA mutacije doprinose kraćem odgovoru na terapiju CDK 4/6 inhibitorima. Tijekom istraživanja više od polovine pacijentica je imalo progresiju bolesti što doprinosi značajnosti navedenog podatka. Stvarni doprinos PIK3CA mutacija tim rezultatima se ne može konstatirati iz navedenih podataka jer analize nisu stratificirane prema godinama i liniji terapije. Naime, primjena inhibitora u višim linijama endokrine terapije je povezana s kraćim TTF-om, a kao što je ranije spomenuto više pacijentica s mutacijom je primalo terapiju CDK 4/6 inhibitorom u višoj liniji liječenja nego pacijentica bez mutacije. Jednako tako, dostupnost samog testiranja na prisustvo PIK3CA mutacija je limitirana te se većina bolesnica testira zbog progresije bolesti, što je moglo utjecati na analize. Međutim, dobivenim rezultatima je predočeno da postoji tendencija ranije pojave neuspjeha terapije kod pacijentica s PIK3CA mutacijom. Manje od 15% pacijentica je preminulo tijekom praćenja što značajno limitira značajnost podataka o preživljenju te je potrebno i dulje praćenje ove kohorte. Međutim, prikupljeni podaci pokazuju kraće preživljenje kod pacijentica s mutacijom za 2 mjeseca te povećan rizik smrti (1,348). Praćenje ove kohorte nastavi će se kako bi se ispitaio utjecaj mutacija na preživljenje.

7. ZAKLJUČAK

Provedbom ove retrospektivne kohortne studije pokazali smo da pacijentice s PIK3CA mutacijama imaju veću sklonost razvitku agresivnije bolesti i teže kliničke slike. Kod 32 pacijentice koje su imale identificiranu PIK3CA mutaciju, incidencije isključivo visceralne bolesti i infiltracije koštane srži su bile veće nego kod pacijentica bez mutacije. Također je bila povišena incidencija inicijalno metastatske bolesti. Također smo prikazali da pacijentice s mutacijom imaju kraći odgovor na terapiju CDK 4/6 inhibitorima i kraće preživljenje od pacijentica bez mutacije. TTF pacijentica s PIK3CA mutacijom je bio 5 mjeseci kraći, a OS 2 mjeseca kraći nego kod pacijentica bez mutacije.

Karcinom dojke je ozbiljan javnozdravstveni problem te je trenutno najčešća maligna bolest u ženskoj populaciji, a njegova incidencija i dalje raste. U novije vrijeme se proizvodi sve više novih lijekova koji specifično ciljaju određene molekularne promjene unutar karcinoma. Jedna od genetskih promjena je PIK3CA mutacija koja različitim patofiziološkim mehanizmima pogoduju razvitku karcinoma dojke. Najznačajniji mehanizmi su hiperekspresija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta i poticanje aktivnosti CDK 4/6 kompleksa. Prisutnost PIK3CA mutacije kod pacijentica s karcinomom dojke je povezana s rezistencijom na kemoterapiju i endokrinu terapiju što predstavlja važnu prepreku u liječenju ABC-a. Novija istraživanja konstituiranju da se inhibicijom PI3K puta može vratiti osjetljivost. PIK3CA mutacije se mogu detektirati iz uzorka tkiva tumora ili iz ctDNA iz periferne krvi. Detekcija iz periferne krvi je manje invazivna te je češće odraz cijelog tumora, a ne samo dijela tumora iz kojeg je uzeta biopsija koji ne mora biti jednak ostatku tumora. Međutim ta metoda je manje osjetljiva od detekcije iz tumorskog tkiva pa se preporučuje sve negativne rezultate dobivene analizom ctDNA nadopuniti analizom tumorskog tkiva. Jedan od novih lijekova za terapiju karcinoma dojke je PI3K inhibitor, alpelisib. Trenutno se u kliničkoj praksi koristi u kombinaciji s fulvestrantom u kasnijim linijama liječenja nakon progresije na endokrinu terapiju. Tri CDK 4/6 inhibitora, palbociklib, ribociklib i abemaciclib, su nedavno odobreni za prvu linija liječenja ER+/HER2 negativnog mBC-a. Koriste se u kombinaciji s aromataznim inhibitorima ili fulvestrantom. U istraživanju je pregledana medicinska dokumentacija pacijentica koje su liječene CDK 4/6 inhibitorima te su izdvojene pacijentice s molekularnom analizom PIK3CA mutacija. Usporedbom njihovih karakteristika i odgovora na terapiju zaključeno je da pacijentice s PIK3CA mutacijom češće imaju agresivniju kliničku sliku s lošijom prognozom metastatske bolesti. Primjena alpelisiba bi mogla vratiti osjetljivosti na

endokrinu terapiju i kemoterapiju što bi doprinijelo boljem ishodu tijekom kasnijih linija liječenja. Međutim terapija PI3K inhibitorom ima veću toksičnost od terapije CDK4/6 inhibitorima te će buduća istraživanja tek pokazati moguću opravdanost korištenja PI3K inhibitora prije terapije CDK 4/6 inhibitorima kod pacijentica s PIK3CA mutacijama.

8. ZAHVALE

Srdačno zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Nataliji Dedić Plavetić, na svojoj pomoći, strpljenju, ukazanom povjerenju i trudu koji je uložila da mi pomogne s ovim radom. Zahvaljujem na svim akademskim prilikama koje mi je omogućila te svim savjetima i smjernicama koji su bili neizmjerljivo korisni tijekom pisanja ovog rada te koji će mi biti od još većeg značaja u budućoj praksi.

Posebnu zahvalu upućujem svojoj obitelji, svojim roditeljima, Mirjani i Siniši, za njihovu bezuvjetnu ljubav, podršku i razumijevanje tijekom cijelog mog života te za mnogobrojne prilike i pustolovine. Zahvaljujem i svom bratu, Ivanu, koji mi je najveća inspiracija od djetinjstva i koji mi je uvijek spreman pomoći i stati na moju stranu.

Hvala svim dragim prijateljima koji su donijeli mnoštvo smijeha i zabave u moj život te posebice onima koji su mi bili podrška tijekom pisanja ovog rada.

9. LITERATURA

1. Bosch A, Li Z, Bergamaschi A, Ellis H, Toska E, Prat A, et al. PI3K inhibition results in enhanced estrogen receptor function and dependence in hormone receptor-positive breast cancer. *Science Translational Medicine* [Internet]. 2015 Apr 15 [cited 2021 May 19];7(283):283ra51. Available from: [/pmc/articles/PMC4433148/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2571148/)
2. Cancer Today, WHO. GLOBOCAN 2020, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase [Internet]. 2020 [cited 2021 May 5]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=2&statistic=5&prevalence=1&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&i
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo R za rak RH. Incidencija raka u Hrvatskoj 2018. Vol. Bilten br. Zagreb; 2020.
4. L. Beketić-Orešković and F. Šantek. Karcinom dojke multidisciplinarno liječenje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
5. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*. 2020;27(1):27–35.
6. Cardoso F, Kataja V, Tjan-Heijnen V. Essentials for Clinicians Breast Cancer [Internet]. 2017. 109. Available from: www.esmo.org
7. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* [Internet]. 2012 Oct 4 [cited 2021 Apr 26];490(7418):61–70. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature11412>
8. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for

diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* [Internet]. 2015 Sep 1;26:v8–30. Available from:

<http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419471810/fulltext>

9. Burke JE, Williams RL. Synergy in activating class I PI3Ks. *Trends in Biochemical Sciences* [Internet]. 2015;40(2):88–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.12.003>
10. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease [Internet]. Vol. 170, *Cell*. Cell Press; 2017 [cited 2021 May 20]. p. 605–35. Available from: </pmc/articles/PMC5726441/>
11. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* [Internet]. 2014 [cited 2021 May 20];505(7484):495–501. Available from: </pmc/articles/PMC4048962/>
12. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network [Internet]. Vol. 169, *Cell*. Cell Press; 2017 [cited 2021 May 20]. p. 381–405. Available from: </pmc/articles/PMC5546324/>
13. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease [Internet]. Vol. 168, *Cell*. Cell Press; 2017 [cited 2021 May 20]. p. 960–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
14. Laribee RN. Transcriptional and Epigenetic Regulation by the Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 Pathway [Internet]. Vol. 430, *Journal of Molecular Biology*. Academic Press; 2018 [cited 2021 May 20]. p. 4874–90. Available from: </pmc/articles/PMC6289701/>
15. Cardoso F, Paluch-Shimon S, Senkus E, Curigliano G, Aapro MS, André F, et al. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). *Annals of Oncology*. 2020;31(12):1623–49.
16. Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: Role in tumor progression and

therapeutic implications in breast cancer [Internet]. Vol. 13, Breast Cancer Research. BioMed Central; 2011 [cited 2021 May 20]. p. 224. Available from: [/pmc/articles/PMC3315683/](#)

17. Cortés J, Im SA, Holgado E, Perez-Garcia JM, Schmid P, Chavez-MacGregor M. The next era of treatment for hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer: Triplet combination-based endocrine therapies [Internet]. Vol. 61, Cancer Treatment Reviews. W.B. Saunders Ltd; 2017 [cited 2021 May 20]. p. 53–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29100169/>
18. Gao C, Yuan X, Jiang Z, Gan D, Ding L, Sun Y, et al. Regulation of AKT phosphorylation by GSK3 β and PTEN to control chemoresistance in breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment [Internet]. 2019 Jul 30 [cited 2021 May 20];176(2):291–301. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31006103/>
19. Liu R, Chen Y, Liu G, Li C, Song Y, Cao Z, et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers [Internet]. Vol. 11, Cell Death and Disease. Springer Nature; 2020 [cited 2021 May 20]. Available from: [/pmc/articles/PMC7515865/](#)
20. Chang DY, Ma WL, Lu YS. Role of alpelisib in the treatment of pik3ca-mutated breast cancer: Patient selection and clinical perspectives. Therapeutics and Clinical Risk Management [Internet]. 2021 Mar 5 [cited 2021 May 21];17:193–207. Available from: <http://doi.org/10.2147/TCRM.S251668>
21. Vatte C, al Amri AM, Cyrus C, Chathoth S, Alsayyah A, Ahmad A, et al. Helical and kinase domain mutations of PIK3CA, and their association with hormone receptor expression in breast cancer. Oncology Letters [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 May 20];18(3):2427–33. Available from: [/pmc/articles/PMC6676675/](#)
22. Guo S, Loibl S, Minckwitz G von, Darb-Esfahani S, Lederer B, Denkert C. PIK3CA H1047R Mutation Associated with a Lower Pathological Complete

Response Rate in Triple-Negative Breast Cancer Patients Treated with Anthracycline-Taxane-Based Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancer Research and Treatment* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 May 20];52(3):689–96. Available from: [/pmc/articles/PMC7373870/](#)

23. Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, et al. Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science*. 2007;317(5835):239–42.
24. Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, Tran Dien A, Garberis I, Droin N, et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Annals of Oncology* [Internet]. 2020;31(3):377–86. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.11.006>
25. Burke JE, Perisic O, Masson GR, Vadas O, Williams RL. Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110 α (PIK3CA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2012 Sep 18 [cited 2021 May 21];109(38):15259–64. Available from: [/pmc/articles/PMC3458343/](#)
26. Martínez-Saéz O, Chic N, Pascual T, Adamo B, Vidal M, González-Farré B, et al. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Research* [Internet]. 2020 May 13 [cited 2021 May 21];22(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7222307/](#)
27. Pascual J, Turner NC. Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer [Internet]. Vol. 30, *Annals of Oncology*. Oxford University Press; 2019 [pristupljeno 01.07.2021]. p. 1051–60. Dostupno na: <http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419312396/fulltext>
28. Nagahashi M, Shimada Y, Ichikawa H, Nakagawa S, Sato N, Kaneko K, et al. Formalin-fixed paraffin-embedded sample conditions for deep next generation sequencing. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 May 21];220:125–32. Available from: [/pmc/articles/PMC5726294/](#)

29. Tzanikou E, Markou A, Politaki E, Koutsopoulos A, Psyrris A, Mavroudis D, et al. PIK3CA hotspot mutations in circulating tumor cells and paired circulating tumor DNA in breast cancer: a direct comparison study. *Molecular Oncology* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 May 21];13(12):2515–30. Available from: [/pmc/articles/PMC6887588/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32111111/)
30. Suppan C, Zhou Q, Jahn S, Graf R, Klocker EV, Terbuch A, et al. Abstract PS4-06: Comparison of liquid biopsy and tissue based detection of PIK3CA mutations in HR positive metastatic breast cancer patients . In: *Cancer Research* [Internet]. American Association for Cancer Research (AACR); 2021 [cited 2021 May 21]. p. PS4-06-PS4-06. Available from: https://cancerres.aacrjournals.org/content/81/4_Supplement/PS4-06
31. cobas® PIK3CA Mutation Test [Internet]. [cited 2021 May 21]. Available from: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-pik3ca-mutation-test.html>
32. PIK3CA Mutation CDx - Plasma | NeoGenomics Laboratories [Internet]. [cited 2021 May 21]. Available from: <https://neogenomics.com/test-menu/pik3ca-mutation-cdx-plasma>
33. The therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit - P190001 and P190004 | FDA [Internet]. [cited 2021 May 21]. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/recently-approved-devices/therascreen-pik3ca-rgq-pcr-kit-p190001-and-p190004>
34. CHMP. Piqray; INN-alpelisib [Internet]. [cited 2021 May 22]. Available from: www.ema.europa.eu/contact
35. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA -Mutated, Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer . *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2019 May 16 [cited 2021 May 22];380(20):1929–40. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1813904>
36. Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, et al. The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in

human breast cancer [Internet]. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020 [cited 2021 May 21]. Available from: [/pmc/articles/PMC7139603/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35111111/)

37. Baker SJ, Reddy EP. CDK4: A key player in the cell cycle, development, and cancer [Internet]. Vol. 3, Genes and Cancer. SAGE Publications Inc.; 2012 [cited 2021 May 18]. p. 658–69. Available from: [/pmc/articles/PMC3636745/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23111111/)
38. Pernas S, Tolaney SM, Winer EP, Goel S. CDK4/6 inhibition in breast cancer: current practice and future directions [Internet]. Vol. 10, Therapeutic Advances in Medical Oncology. SAGE Publications Inc.; 2018 [cited 2021 May 19]. Available from: [/pmc/articles/PMC6050811/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)
39. CHMP. Ibrance, INN - palbociclib [Internet]. [cited 2021 May 22]. Available from: www.ema.europa.eu/contact
40. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): A randomised phase 2 study. The Lancet Oncology [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 May 22];16(1):25–35. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1470204514711593/fulltext>
41. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im SA, Masuda N, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. The Lancet Oncology [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2021 May 22];17(4):425–39. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1470204515006130/fulltext>
42. CHMP. Kisqali, INN - ribociclib [Internet]. [cited 2021 May 22]. Available from: www.ema.europa.eu/contact

43. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S, et al. Updated results from MONALEESA-2, a phase III trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer. *Annals of Oncology* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2021 May 22];29(7):1541–7. Available from:
<http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419321052/fulltext>
44. Tripathy D, Im SA, Colleoni M, Franke F, Bardia A, Harbeck N, et al. Ribociclib plus endocrine therapy for premenopausal women with hormone-receptor-positive, advanced breast cancer (MONALEESA-7): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2021 May 22];19(7):904–15. Available from:
<http://www.thelancet.com/article/S1470204518302924/fulltext>
45. CHMP. Verzenio - INN-abemaciclib [Internet]. [cited 2021 May 22]. Available from: www.ema.europa.eu/contact
46. Johnston S, Martin M, di Leo A, Im SA, Awada A, Forrester T, et al. MONARCH 3 final PFS: a randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *npj Breast Cancer* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 May 22];5(1):1–8. Available from:
<https://doi.org/10.1038/s41523-018-0097-z>
47. Sledge GW, Toi M, Neven P, Sohn J, Inoue K, Pivot X, et al. MONARCH 2: Abemaciclib in combination with fulvestrant in women with HR+/HER2-advanced breast cancer who had progressed while receiving endocrine therapy. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2021 May 22];35(25):2875–84. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28580882/>
48. Onesti CE, Jerusalem G. CDK4/6 inhibitors in breast cancer: differences in toxicity profiles and impact on agent choice. A systematic review and meta-analysis [Internet]. Vol. 21, *Expert Review of Anticancer Therapy*. Taylor

and Francis Ltd.; 2021 [cited 2021 May 22]. p. 283–98. Available from:
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iery20>

49. MedCalc Software Ltd. MedCalc® Statistical Software version 20.008.
Ostend, Belgium;
50. cobas® DNA Sample Preparation Kit [Internet]. [cited 2021 Jun 21].
Available from:
<https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-dna-sample-preparationkit.html>
51. cobas® 4800 System [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from:
<https://diagnostics.roche.com/global/en/products/systems/cobas-4800-system.html>
52. COBAS Z 480 ANALYZER - Dialogue Diagnostics [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://www.dialogd.com/en/equipment-en/molecular-diagnostics-en/cobas-z-480-analyzer-en/>
53. Robertson JFR, di Leo A, Johnston S, Chia S, Bliss JM, Paridaens RJ, et al. Meta-analyses of visceral versus non-visceral metastatic hormone receptor-positive breast cancer treated by endocrine monotherapies. *npj Breast Cancer* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2021 Jun 25];7(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00222-y>

10. ŽIVOTOPIS

Zovem se Katarina Čular. Rođena sam 11. listopada 1996. godine u Šibeniku. Osnovnu školu sam započela u Vodicama, a zadnje četiri godine sam pohađala *Brussels American School* u Belgiji. Godine 2015. završila sam XVI. gimnaziju u Zagrebu te upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Član sam Studentske sekcije za ortopediju i traumatologiju i Studentske sekcije za infektologiju. Demonstrator sam na Katedri za patofiziologiju, a bila sam demonstrator na Katedri za anatomiju. Aktivno sam sudjelovala na domaćim i međunarodnim znanstvenim kongresima. Pohađala sam međunarodne tečajeve za onkologiju i hitnu medicinu. Od početka pandemije COVID-19 aktivni sam volonter Medicinskoga fakulteta na Klinici Fran Mihaljević, a volontiram i na Klinici za onkologiju KBC-a Zagreb. Također sam volontirala s udrugom Bolnica za medvjediće organizacije EMSA. U slobodno vrijeme najviše volim slikati, rolati i šetati se s psom. Aktivno govorim engleski i francuski jezik te dobro pričam španjolski jezik.