

# Uloga matriksnih metaloproteinaza u progresiji raka dojke

---

Fučkar Čupić, Dora

Doctoral thesis / Disertacija

2011

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:951925>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-30**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Dora Fučkar Čupić

ULOGA MATRIKSNIH METALOPROTEINAZA  
U PROGRESIJI RAKA DOJKE

Doktorska disertacija

Rijeka, 2011.

**Mentor rada:** prof. dr. sc. Elvira Mustać

**Doktorska disertacija obranjena je dana** \_\_\_\_\_ **na**

\_\_\_\_\_ ,

**pred povjerenstvom u sastavu:**

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

4. \_\_\_\_\_

5. \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_\_\_\_ listova.

UDK: \_\_\_\_\_

## **Predgovor**

Ova doktorska disertacija nastala je kao rezultat istraživanja u sklopu znanstvenog projekta „Molekularni mehanizmi tumorske progresije i metastaziranja raka dojke i prostate“ pod vodstvom prof. Elvire Mustać na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Zahvaljujem se mojoj mentorici, prof. Elviri Mustać na idejama, podršci i razumijevanju koje mi je pružila.

Zahvaljujem se prof. Nives Jonjić na njenoj pomoći, vrijednim savjetima i strpljenju.

Zahvaljujem se kolegicama dr. Gordani Đorđević, dr. Kobiljki Matušan Ilijaš, dr. Emini Sinožić i dr. Koraljki Rajković Molek na pomoći kada mi je najviše trebala.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda koji su pomogli u izradi ovog rada.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji na ljubavi i pomoći.

Posvećeno Matiji i Zoranu....

## **SAŽETAK**

**Ciljevi istraživanja:** Matriksne metaloproteinaze (MMP), posebno njezina dva člana iz obitelji gelatinaza, MMP-2 i MMP-9, jedini su enzimi sposobni razgraditi fibrilarni kolagen, kao i ostale proteine ekstracelularnog matriksa. Iz brojnih studija poznato je da postoji pojačana ekspresija MMP-2 i MMP-9 u karcinomima dojke, većinom vezana uz nepovoljnu prognozu. Međutim, ima studija s oprečnim rezultatima, koje pojačanu ekspresiju MMP-2 i MMP-9 definiraju kao povoljan faktor u preživljenju bolesnika s karcinomom dojke. Osim toga, pronađeni su dokazi da su ove metaloproteinaze uključene u procese angiogeneze i limfangiogeneze. Stoga su ciljevi ovog istraživanja: utvrditi način ekspresije navedenih metaloproteinaza u karcinomu dojke, na tumorskim i stromalnim stanicama; analizirati ekspresiju MMP-2 i MMP-9 na primarnim nemetastatskim tumorima, zatim primarnim tumorima s metastazama u regionalne limfne čvorove, primarnim tumorima s koštanim metastazama i na lokalnim recidivnim tumorima; ispitati ekspresiju faktora angiogeneze VEGF-A i faktora limfangiogeneze VEGF-C, a potom i gustoću krvnih žila, te limfnih žila; usporediti vrijednosti MMP-2 i MMP-9 s kliničko-patološkim prognostičkim (veličina tumora, histološki i nuklearni gradus, status limfnih čvorova) i prediktivnim faktorima (ekspresija estrogenskih-ER i progesteronskih-PR receptora, HER2 i Ki-67 proliferacijskim indeksom); usporediti vrijednosti MMP-ova s ekspresijom VEGF-A i VEGF-C, te gustoćom krvnih i limfnih žila. Konačni cilj je usporediti ekspresiju navedenih MMP-ova između definiranih skupina bolesnica bez i s navedenim metastazama, odnosno recidivnom bolesti, kao i njihov utjecaj na sveukupno preživljenje.

**Materijal i metode:** U retrospektivnom istraživanju koje je uključilo 76 bolesnica, prikupljeno je ukupno 117 uzoraka tumorskog tkiva karcinoma dojke i izrađeni su tkivni mikroareji, koji su imunohistokemijski obojani na MMP-2, MMP-9, VEGF-A, VEGF-C, CD31 (marker za krvne žile), D2-40 (marker za limfne žile), ER, PR i Ki-67.

**Rezultati** imunohistokemijske analize matriksnih metaloproteinaza pokazali su da se MMP-2 eksprimira u citoplazmi stromalnih stanica karcinoma dojke, dok se MMP-9 eksprimira u citoplazmi tumorskih stanica.

Usporedbom ekspresije MMP-ova između definiranih skupina, vidjelo se da postoji jača ekspresija MMP-2 u recidivnim tumorima u odnosu na primarne nemetastatske tumore ( $p=0.001$ ), odnosno da postoji jača ekspresija MMP-9 u skupini primarnih tumora s koštanim metastazama u odnosu na primarne nemetastatske tumore ( $p=0.045$ ).

Ispitivanjem ekspresije MMP-ova u odnosu na patohistološke karakteristike, statističke analize su potvrdile da postoji pozitivna povezanost MMP-9 i histološkog gradusa ( $p=0.019$ ), nuklearnog gradusa ( $p=0.039$ ) i ER pozitiviteta ( $p=0.039$ ), a negativna s proliferacijskim indeksom ( $p=0.010$ ).

Ispitivanjem ekspresije MMP-ova i angiogeneze, utvrđeno je da MMP-2 negativno korelira s ekspresijom VEGF-A u skupini primarnih nemetastatskih tumora ( $p=0.003$ ) i u skupini primarnih tumora s koštanim metastazama ( $p=0.049$ ), a pozitivno korelira s povećanim brojem limfnih žila u skupini recidivnih tumora ( $p=0.0001$ ).

Analize preživljenja obzirom na stadij bolesti i ekspresiju MMP-ova, potvrdile su inverznu povezanost stadija i preživljenja bolesnica s MMP-9 pozitivnim tumorima ( $0.007$ ), odnosno s MMP-2 negativnim tumorima ( $p=0.010$ ).

Analize preživljenja obzirom na metastaze (koštane, odnosno limfogene u aksilarnim limfnim čvorovima) i ekspresiju MMP-ova, pokazale su da je preživljenje značajno kraće u bolesnica s koštanim ( $p=0.039$ ), odnosno aksilarnim metastazama ( $p=0.039$ ) čiji su tumori MMP-2 negativni.

**Zaključak:** Iz rezultata dobivenih statističkom analizom može se zaključiti da je pojačana MMP-2 stromalna ekspresija vjerojatno više udružena s lokalnim invazivnim potencijalom karcinoma dojke, kao i limfangiogeneza, ali ne i s angiogeneza. Za razliku od MMP-2, pojačana ekspresija MMP-9 na tumorskim stanicama više je izražena u primarnim tumorima s koštanim metastazama i ukazuje na progresiju lezije.

Istraživanjem ekspresije matriksnih metaloproteinaza u karcinomima dojke, pokazalo se da je pozitivna ekspresija MMP-9 i negativna ekspresija MMP-2 povezana s lošijim preživljenjem.

Ključne riječi: karcinom dojke, MMP-2, MMP-9, angiogeneza, limfangiogeneza, ER, gustoća limfnih žila, metastaziranje

## **SUMMARY**

**Objective:** Matrix metalloproteinases (MMP), especially their two members from gelatinase family, MMP-2 and MMP-9 are the only enzymes capable of degrading fibrillary collagen and other extracellular matrix proteins. Numerous studies analysed strong and increased MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer and linked it to a poor prognosis. However, there are also studies with opposite results. They defined increased MMP-2 and MMP-9 expression as a good prognostic parameter. There is also evidence that MMPs play a role in angiogenesis and lymphangiogenesis.

Objectives of this study are: to analyse the expression of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer, on tumor and stromal cells; to analyse MMP-2 and MMP-9 expression on primary breast cancer without metastases, with nodal metastases, with distant (bone) metastases and on local recurrent tumors; to analyse the expression of angiogenic factor VEGF-A and lymphangiogenic factor VEGF-C, and also vascular and lymphatic density; to compare MMP-2 and MMP-9 values to clinico-pathologic prognostic (tumor size, histologic and nuclear grade, lymph node status) and predictive parameters (estrogen-ER and progesteron receptor-PR, HER2 and Ki-67 proliferation index); to compare MMP values to VEGF-A and VEGF-C expression, and also to vascular and lymphatic density. Final objective is to compare the expression of MMP-2 and MMP-9 between defined patients' groups without metastases, with nodal metastases, with bone metastases and on local recurrence, as well as their influence on overall survival.



**Material and Methods:** Tissue microarrays were built from the 117 tumor tissue samples from 76 breast cancer patients in this retrospective study. Immunohistochemistry was performed for MMP-2, MMP-9, VEGF-A, VEGF-C, CD31 (blood vessel marker), D2-40 (lymph vessel marker), ER, PR and Ki-67.

**Results** of immunohistochemical MMP analysis showed MMP-2 expression on stromal cells of breast cancer, while MMP-9 expressed on tumor cells. Comparing the MMP expression between defined groups, stronger MMP-2 expression was observed in local recurrent tumors than in primary nonmetastatic tumors ( $p=0.001$ ), and there was significantly stronger MMP-9 expression in primary tumors with bone metastases than in primary nonmetastatic tumors ( $p=0.045$ ).

Analysing MMP expression and pathohistologic parameters, there was a positive correlation between MMP-9 expression and histological grade ( $p=0.019$ ), nuclear grade ( $p=0.039$ ) and ER positivity ( $p=0.039$ ), and negative correlation between MMP-9 and Ki-67 proliferation index ( $p=0.010$ ).

Analysing MMP expression and angiogenesis, statistical analysis revealed negative correlation between MMP-2 and VEGF-A in primary nonmetastatic breast cancer ( $p=0.003$ ) and in primary cancer with bone metastases ( $p=0.049$ ), and there was positive correlation between MMP-2 and lymph vessel density in recurrent tumors ( $p=0.0001$ ).

Survival analyses regarding cancer stage confirmed negative correlation between stage and overall survival in patients with MMP-9 positive tumors ( $p=0.007$ ), as well as with MMP-2 negative tumors ( $p=0.010$ ).

Survival analyses regarding metastases, bone or nodal, showed that there was poor overall survival of patients with MMP-2 negative tumors in group with bone metastases ( $p=0.039$ ) and nodal metastases ( $p=0.039$ ).

**Conclusion:** From statistical analyses, it can be concluded that increased stromal MMP-2 expression is probably more associated with local invasive potential of breast cancer and lymphangiogenesis, but not angiogenesis. Increased MMP-9 expression on tumor cells is seen in tumors with bone metastases and points to a progression of breast cancer.

Exploring the expression of matrix metalloproteinases in breast cancer, statistical analyses indicated association of MMP-9 positivity and MMP-2 negativity with poor survival.

**Key words:** breast cancer, MMP-2, MMP-9, angiogenesis, lymphangiogenesis, ER, lymph vascular density, metastases

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Građa dojke – anatomija, histologija i molekularna biologija</b>	<b>14</b>
1.1.1. Diferencijacija epitela dojke	16
1.1.2. Imunohistokemijske karakteristike epitela dojke	18
<b>1.2. Karcinom dojke</b>	<b>19</b>
1.2.1. Prekursorske lezije karcinoma dojke	20
1.2.2. Invazivni karcinomi dojke	24
1.2.3. Razvoj novih klasifikacija karcinoma dojke temeljenih na molekularnim istraživanjima	25
1.2.4. Stadiji karcinoma dojke	30
1.2.5. Incidencija i epidemiologija karcinoma dojke	33
<b>1.3. Ekstracelularni matriks</b>	<b>46</b>
<b>1.4. Tumorska invazija i metastaziranje</b>	<b>47</b>
<b>1.5. Matriksne metaloproteinaze</b>	<b>51</b>
1.5.1. Struktura matriksnih metaloproteinaza	51
1.5.2. Podjela matriksnih metaloproteinaza	55
1.5.3. Regulacija aktivnosti matriksnih metaloproteinaza	60
1.5.4. Uloga matriksnih metaloproteinaza u tumorskoj progresiji	66
1.5.4. Uloga matriksnih metaloproteinaza u angiogenezi	72
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>76</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>78</b>
<b>3.1. Bolesnice i uzorci tumora</b>	<b>79</b>
<b>3.2. Tehnologija tkivnih mikroareja (TMA)</b>	<b>80</b>
3.2.2. TMA tehnike	81
<b>3.3. Imunohistokemijski postupci bojanja</b>	<b>83</b>
<b>3.4. Procjena imunohistokemijskog bojanja</b>	<b>87</b>
<b>3.5. Statistička obrada podataka</b>	<b>92</b>

<b>4. REZULTATI</b>	<b>93</b>
<b>4.1. Ekspresija imunohistokemijski ispitivanih parametara na uzorcima karcinoma dojke</b>	<b>94</b>
4.1.1. Ekspresija MMP-2	94
4.1.2. Ekspresija MMP-9	95
4.1.3. Ekspresija VEGF-A	96
4.1.4. Ekspresija VEGF-C	97
4.1.5. Ekspresija D2-40	97
4.1.6. Ekspresija CD31	98
4.1.7. Ekspresija Ki-67	98
4.1.8. Ekspresija ER i PR	99
4.1.9. Ekspresija HER2	100
<b>4.2. Patohistološke i imunohistokemijske karakteristike skupina primarnih tumora i recidiva</b>	<b>101</b>
4.2.1. Patohistološke karakteristike primarnih tumora bez metastaza	104
4.2.2. Patohistološke karakteristike primarnih tumora s aksilarnim nodalnim metastazama	107
4.2.3. Patohistološke karakteristike primarnih tumora s koštanim metastazama	110
4.2.4. Patohistološke karakteristike lokalnih recidiva	113
<b>4.3. Povezanost MMP-2 i MMP-9 s ispitivanim parametrima unutar definiranih skupina</b>	<b>115</b>
<b>4.4. Usporedba ekspresije MMP-2 i MMP-9 između definiranih skupina</b>	<b>118</b>
<b>4.5. Prikaz rezultata koji su dosegli statističku značajnost</b>	<b>119</b>
4.5.1. Povezanost ekspresije MMP-2 i MMP-9 s ispitivanim parametrima unutar definiranih skupina	119
4.5.2. Usporedba ekspresije MMP-2 i MMP-9 između definiranih skupina	128
<b>4.6. Analize preživljenja bolesnica s karcinomom dojke</b>	<b>130</b>

4.6.1. Razdoblje odsustva bolesti s obzirom na ekspresiju MMP-2 i MMP-9	131
4.6.2. Preživljenje s obzirom na metastaze i ekspresiju MMP-2 i MMP-9 (unutar skupina)	132
4.6.3. Preživljenje s obzirom na metastaze i ekspresiju MMP-2 i MMP-9 (usporedba među skupinama)	134
4.6.4. Preživljenje prema stadijima u odnosu na ekspresiju MMP-2 i MMP-9	137
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>141</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>159</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>162</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>181</b>
<b>POPIS KRATICA</b>	<b>185</b>

# **1. UVOD**

## 1.1. Građa dojke – anatomija, histologija i molekularna

### biologija

Dojka je žlijezda čija je osnovna funkcija laktacija. Nalazi se na pektoralnom mišiću od kojeg je odijeljena fascijom. Normalno tkivo dojke sastavljeno je od parenhima i strome. Parenhim dojke dijeli se na 15 do 40 režnjeva ili lobula. Ovi režnjevi su različite veličine i zauzimaju od nekoliko do više od 50% volumena dojke (slika 1.) Režnjevi su građeni od kompleksne granajuće strukture kanala i lobularnih jedinica koje okružuje vezivno-masna stroma.

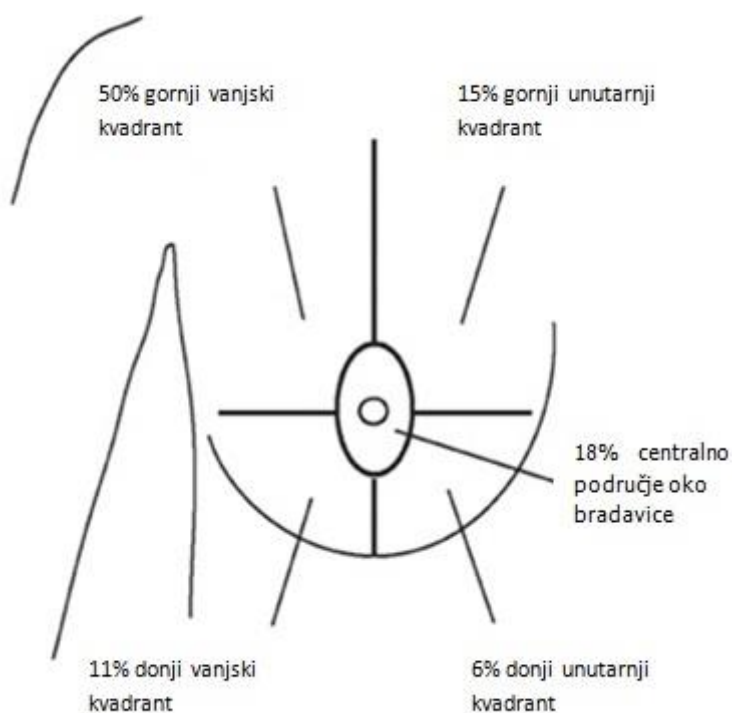


Slika 1. Shematski prikaz sagitalnog presjeka kroz tkivo dojke.

Terminalni kanalić i njegov režnjić nazivaju se terminalna duktulo-lobularna jedinica (TDLJ). Lobuli predstavljaju sekretorne strukture i kao takvi su funkcionalne jedinice dojke. Potpuno razvijeni lobuli sadržavaju oko 40 do 80 acinusa. Između pojedinih režnjeva dojke ne postoje vidljive ili palpabilne anatomske granice koje ih razdvajaju. Umjesto toga, postoji preklapanje između susjednih režnjeva. Isto tako nađu se i anastomoze između ogranaka istog ili različitih režnjeva. Ovakvi anastomozirajući kanali predstavljaju puteve diseminacije malignih stanica unutar ili između režnjeva. Bradavica i areola pokrivena su višeslojnim pločastim epitelom koji je u kontinuitetu sa sistemom izvodnih kanala. Stroma bradavice sastoji se od vezivnog tkiva i snopića glatkih mišića smještenih oko izvodnih kanala.

Dojka se dijeli u četiri kvadranta (slika 2.) povlačeći horizontalnu i okomitu crtu kroz bradavicu: gornji i donji vanjski kvadrant, gornji i donji unutarnji kvadrant i centralno područje oko bradavice. Svaki sustav kanalića smješten je u više kvadranta i oni se međusobno preklapaju. Na slici 2. prikazani su kvadranti dojke i pojavnost karcinoma u svakom pojedinom kvadrantu.

Jedna velika studija “International Breast Cancer Study Group” pokazala je



Slika 2. Dojka podijeljena u kvadrante i pojavnost karcinoma dojke u pojedinim kvadrantima.

da pojavnost karcinoma

u medijalnim

kvadrantima dojke

predstavlja važnu

prognostičku

karakteristiku, posebno

kod bolesnika koji

nemaju metastaze u

aksilarne limfne čvorove i

imaju veće tumore (1). U

još jednoj studiji iz 2009.

dokazano je da je

lokalizacija primarnog

tumora neovisni prediktor sistemnog relapsa u bolesnika s operabilnim

karcinomom dojke, s višim rizikom za bolesnike čiji su tumori smješteni u

medijalnim kvadrantima i periareolarno (centralno), u usporedbi s

bolesnicima s karcinomima lokaliziranim u vanjskim kvadrantima (2).



Stroma dojke dijeli se u specijaliziranu vezivnu stromu koja okružuje duktulo-lobularnu jedinicu i naziva se intralobularna stroma, u gustu interlobularnu vezivnu stromu i masno tkivo. Intralobularna stroma je hormonski ovisna i sastoji se od rahle mreže fibroblasta, kao i brojnih stanica koje uključuju limfocite, histiocite, plazma stanice i mastocite. Interlobularna stroma građena je od gustog vezivnog tkiva i elastičnih vlakana koje se nalaze oko dukalnog sistema, a odsutne su u TDLJ. Stroma osim celularnih elemenata uključuju i ekstracelularni matriks, kojemu će biti kasnije obraćena posebna pozornost.

Parenhim dojke građen je od žljezdanih formacija koje su obložene luminalnim glandularnim slojem stanica. U velikim kanalima te stanice su kolumnarne, a u manjim više kubične. Glandularni epitel lobula čine kubične stanice s tamnim monomorfnim jezgrama. Mioepitelni sloj stanica okružuju epitel. U duktalnom sistemu mioepitelni sloj stanica je više izražen u odnosu na duktulo-lobularni sistem u kojem čini manje ili više kontinuirani sloj. Mioepitelne stanice u cijelosti su okružene bazalnom membranom.

### **1.1.1. Diferencijacija epitela dojke**

Na postojanje matičnih stanica dojke ukazivale su brojne eksperimentalne studije, ali zbog nedostatka specifičnih staničnih markera nije bila moguća njihova identifikacija. Nedavno su se za fenotipsku karakterizaciju epitelnih stanica dojke počeli koristiti citokeratini visoke molekulske težine 5/14

(CK 5/14) i markeri glandularnog epitela kao što su CK 8/18 i mioepitelni marker – glatkomišićni aktin (SMA – smooth muscle actin).

Upotrebom imunofluorescentnih tehnika izdiferencirala se subpopulacija stanica unutar epitela dojke, koja je zadovoljila kriterije za definiranje epitelne progenitorske stanice. Ove CK 5/14 pozitivne progenitorske stanice diferenciraju se u:

- intermedijarne glandularne stanice koje su CK 5/14 i CK 8/18 pozitivne, i
- intermedijarne mioepitelne stanice koje su CK 5/14 i SMA pozitivne.

Tijekom procesa diferencijacije ekspresija bazalnog CK 5/14 postupno se smanjuje, dok se ekspresija CK 8/18 postupno povećava, što ukazuje na glandularnu diferencijaciju. Pojačanje ekspresije SMA ukazuje na mioepitelnu diferencijaciju.

S obzirom na ovo otkriće predložen je biološki koncept koji uključuje nekoliko epitelnih staničnih linija dojke:

**Progenitorske stanice** koje su karakterizirane snažnom ekspresijom citokeratina 5 i 14.

**Intermedijarne glandularne stanice** karakterizirane su ekspresijom i citokeratina 5/14 i citokeratina 8/18. Ove stanice predstavljaju prijelazni stadij u diferencijaciji glandularnog epitela.

**Diferencirane glandularne stanice** karakterizirane su ekspresijom citokeratina 8/18. Ove diferencirane stanice mogu proliferirati sve do trudnoće i laktacije kada postaju krajnje diferencirane sekretorne stanice. Glandularne CK 8/18 pozitivne stanice mogu se podijeliti u dvije podgrupe, i to estrogen receptor alfa pozitivne i negativne, dok su stanice koje eksprimiraju CK 5/14, estrogen receptor alfa negativne.

**Intermedijarne mioepitelne stanice** karakterizirane su ekspresijom CK 5/14, SMA i kalponina. Ove stanice su prijelazne između progenitorskih i krajnje diferenciranih mioepitelnih stanica.

**Mioepitelne stanice** eksprimiraju SMA i kalponin i smatraju se terminalno diferenciranim stanicama. Njihova proliferacijska aktivnost je odsutna ili izrazito niska.

Postoji značajna razlika u proliferacijskoj aktivnosti glandularnog epitela i mioepitelnih stanica odrasle dojke. Zbog postojanja mitotske aktivnosti glandularnog epitela, on ima glavnu ulogu u fiziološkoj regeneraciji. Mioepitelne stanice smatraju se stabilnim zbog niske proliferacijske aktivnosti. To donekle može objasniti razlog zašto su karcinomi dojke obično glandularnog, a rijetko mioepitelnog fenotipa.

### **1.1.2. Imunohistokemijske karakteristike epitela dojke**

Većina luminalnih stanica duktulo-lobularnog sistema eksprimira glandularne citokeratine 8/18, dok većina mioepitelnih stanica

karakteristično eksprimira p63, SMA i kalponin. Krajnje diferencirane glandularne i mioepitelne stanice ne ekspimiraju citokeratin 5/14.

Postoje još neki markeri koji karakteriziraju luminalni (glandularni) epitel, kao što su epitelni membranski antigen (EMA), estrogenski receptori (ER), progesteronski receptori (PR) i Ki-67.

Imunoreaktivnost mioepitela uključuje pozitivnost na oksitocin i vimentin, ali negativnost na estrogenske i progesteronske receptore (3).

## **1.2. Karcinom dojke**

Neoplastičnom proliferacijom epitela terminalne duktulo-lobularne jedinice nastaju adenokarcinomi i oni čine više od 95% malignoma dojke (4). Mogu se podijeliti na in situ ili preinvazivne i invazivne lezije (karcinome), s obzirom na proboj bazalne membrane. Naime, in situ karcinomi predstavljaju proliferirajući neoplastični epitel koji se nalazi unutar kanalića i acinusa i ograničen je bazalnom membranom, a invazivni karcinomi probojem bazalne membrane invadiraju okolno tkivo, stječu sposobnost angioinvazije i metastatski potencijal.

In situ karcinomi tradicionalno se dijele na duktalne i lobularne, što je utemeljeno na histološkom izgledu malignih stanica i njihovom načinu rasta, lokalizaciji i kliničkom tijeku.

### **1.2.1. Prekursorske lezije karcinoma dojke**

Prekursorske lezije dojke, kako ih definira WHO (5), su biološki i klinički heterogene neoplastičke lezije s potencijalom direktne progresije u invazivni karcinom. U prekursorske lezije epitela dojke spadaju: ravna epitelna atipija, atipična duktalna hiperplazija, duktalni karcinom in situ (DCIS), atipična lobularna hiperplazija i lobularni karcinom in situ (LCIS).

Progresija ovih prekursorskih lezija u invazivni karcinom i kliničke implikacije su vrlo varijabilne i različite, stoga se istražuju novi principi neoplastične transformacije zbog boljeg definiranja ovih prekursorskih lezija u kontekstu karcinogeneze dojke.

#### **Prekursorske lezije karcinoma dojke dukalnog tipa**

Došlo se do zaključka da najkorisniji parametri za definiranje duktalnih neoplastičnih epitelnih proliferacija proizlaze iz molekularnih studija, iz čega je nastao novi pristup u razlikovanju benignih i ranih duktalnih neoplastičnih lezija:

1. Benigne epitelne proliferacije karakterizirane su heterogenom epitelnom proliferacijom stanica koje se CK 5/14 pozitivne, kao i CK 8/18 pozitivne.
2. Većina malignih lezija nastaje de novo iz glandularnih stanica terminalne duktulo-lobularne jedinice. Veliku većinu karakterizira glandularni fenotip (CK 8/18+) i nedostatak ekspresije CK 5/14.

3. Rane lezije niskog gradusa (low grade pathway) uključuju “uobičajeni tip” ravne epitelne atipije i “uobičajeni tip” atipične duktalne hiperplazije. Karakterizira ih negativna ekspresija CK 5/14, pozitivna ekspresija CK 8/18 i pozitivna ekspresija ER alfa. U histološkoj slici svojstvena im je nuklearna atipija niskog gradusa i specifična arhitektura.
4. Rane lezije visokog gradusa (high grade pathway) izražavaju vidljivi malignih nuklearni fenotip. Većina ovih lezija pokazuju čisti glandularni fenotip (CK 8/18 +), osim malog postotka koji još pokazuje i koekspresiju CK 5/14. Najranija histološki prepoznatljiva lezija je takozvani “clinging” karcinom polimorfnog tipa kojeg je opisao Azzopardi (6). Bez obzira na njihovu veličinu, ove lezije se opisuju kao duktalni karcinomi in situ visokog gradusa.
5. Rane lezije intermedijarnog gradusa (intermediate grade pathway) zbog svojeg nejasnog intermedijarnog celularnog izgleda uključuju tzv. ravnu epitelnu atipiju i atipičnu duktalnu hiperplaziju “neuobičajenog tipa”. U histološkim preparatima obojenim rutinski hemalaun-eozinom, ove se lezije ne mogu razlikovati od benignih epitelnih proliferacija kao što je epitelna hiperplazija. Međutim, u benignoj epitelnoj hiperplaziji postoji mozaicizam za CK 5/14, a neoplastična lezija intermedijarnog gradusa ima čisti glandularni fenotip (CK 8/18+) i ne eksprimira bazalni citokeratin 5/14.

Na taj način, imunohistokemijsko bojanje na CK 5/14 postaje način za identifikaciju i diferencijaciju prekursorskih lezija duktalnog tipa.

### **Prekursorske lezije karcinoma dojke lobularnog tipa**

Iako lobularni karcinom in situ posjeduje maligni potencijal, u posljednja dva desetljeća ova se lezija smatrala “samo” indikatorom povećanog rizika za razvoj lobularnog invazivnog karcinoma. Premda je odnos između lobularnog karcinoma in situ i invazivnog lobularnog karcinoma ostao kontroverzan, noviji genetički podaci poboljšali su razumijevanje biologije obje lezije. Jedan od najznačajnijih genetičkih pronalazaka je delecija kromosomske regije 16q22.1 koja je pronađena u visokom postotku u invazivnim lobularnim karcinomima. U ovom lokusu nalazi se gen za transmembransku adhezijsku molekulu E-kadherin. Novije studije su dokazale da se nedostatak alela divljeg tipa E-kadherina i točkaste mutacije na drugom alelu nalaze i u in situ i u invazivnim lobularnim karcinomima, što rezultira gubitkom funkcije E-kadherina. Osim toga, pronađena je zapanjujuća homologija između atipične lobularne hiperplazije, lobularnog in situ i lobularnog invazivnog karcinoma, što ukazuje na progresijsku kaskadu u lobularnoj karcinogenezi.

### **Odnos između duktalnog i lobularnog tipa lezija**

Međusobni odnos između LCIS, DCIS, i invazivnih karcinoma dugo je vremena bio slabo razjašnjen. Oko otprilike 20% DCIS-a povezano je s

invazivnim lobularnim karcinomom, kao što se i u određenom postotku bolesnika s LCIS-om može tijekom godina razviti duktalni invazivni karcinom. Osim toga, nije neuobičajeno naći atipičnu lobularnu hiperplaziju i LCIS zajedno s ravnom epitelnom atipijom, atipičnom duktalnom hiperplazijom i DCIS-om niskog gradusa u istom tumorskom uzorku, pa čak i u istom reznjicu. I dok su duktalni invazivni karcinomi obično E-kadherin pozitivni, velika većina lobularnih karcinoma je E-kadherin negativna.

Uzimajući u obzir patogenetsku ulogu E-kadherinskog gena, može se pretpostaviti da jedna jedina stanica dobro diferencirane duktalne neoplazije, koja ima gubitak 16q materijala (tj. gubitak jednog alela za E-kadherin) može izmijeniti svoj duktalni fenotip u lobularni, kada dođe do mutacije drugog alela za E-kadherin. Na taj se način može objasniti nastanak lobularne neoplazije iz duktalnih neoplastičnih stanica – gubitkom heterozigotnosti za 16q i mutacijom drugog alela za E-kadherinski gen.

Inaktivacija E-kadherina u vrlo ranom stadiju karcinogeneze epitela dojke bi na taj način dovela do monomorfne lezije s lobularnim fenotipom (lobularni in situ ili invazivni lobularni karcinom). Inaktivacija E-kadherina u kasnom stadiju karcinogeneze, u prisustvu lezije duktalnog fenotipa, vjerojatno bi rezultirala lezijom miješanog duktalno-lobularnog karcinoma – in situ, invazivnog ili oboje (3).



### **1.2.2. Invazivni karcinomi dojke**

Invazivni karcinomi dojke pokazuju vrlo šaroliku histološku građu, a najučestaliji, čak do 80% svih invazivnih karcinoma čini invazivni duktalni karcinom bez posebnih oznaka (NST – no special type ili NOS – not otherwise specified). To je najagresivniji oblik karcinoma dojke. Najčešće je smješten u gornjem vanjskom kvadrantu dojke. S obzirom da pokazuje sklonost infiltraciji okolnog masnog tkiva i kože, nepokretan je i fiksiran za podlogu, te mijenja oblik i deformira dojku. Makroskopski je na presjeku bjelkastosive boje, nejasno ograničen i čvrste konzistencije (zato se naziva i scirozni karcinom, od grčke riječi *skirrhos*, što znači čvrst, tvrd).

Mikroskopski je građen od malignih epitelnih stanica različitog stupnja atipije uloženi u veću količinu vezivne strome (dezmoplazija). Ovisno o stupnju diferencijacije, stanice mogu stvarati žljezdane oblike (tubule), ili rasti kao solidni epitelni tračci u stromi. Često se mogu vidjeti patološke mitoze.

Maligne stanice imaju sposobnosti prodiranja u vaskularne prostore, a mogu se širiti perivaskularno i perineuralno. Ipak, karcinom dojke najčešće metastazira limfogeno u regionalne limfne čvorove pazušne jame ili medijastinuma, a kasnije dolazi i hematogene diseminacije, i to najčešće u pluća, kosti, jetru, kožu, bubrege i nadbubrežnu žlijezdu.

## **Klasifikacija karcinoma dojke**

Invazivni karcinomi dojke se prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (5) klasificiraju u:

- Mikroinvazivni karcinom
- Invazivni duktalni karcinom, bez drugih oznaka (NOS)
- Invazivni lobularni karcinom
- Tubularni karcinom
- Invazivni kribriformni karcinom
- Medularni karcinom
- Mucinozni karcinomi i ostali tumori s obilnim mucinom
- Neuroendokrini tumori
- Invazivni papilarni karcinom
- Invazivni mikropapilarni karcinom
- Apokrini karcinom
- Metaplastični karcinom
- Karcinom bogat lipidima
- Sekretorni karcinom
- Onkocitni karcinom
- Adenoidno cistični karcinom
- Karcinom po tipu žlijezda slinovnica (Acinic cell carcinoma)
- Svjetlostanični karcinom bogat glikogenom
- Sebacealni karcinom
- Inflamatorni karcinom

### **1.2.3. Razvoj novih klasifikacija karcinoma dojke temeljenih na molekularnim istraživanjima**

Karcinom dojke je klinički heterogena bolest. Histološki slični tumori mogu imati različitu prognozu i različiti odgovor na terapiju. Vjeruje se da ove razlike u kliničkom ponašanju nastaju zbog molekularnih različitosti između histološki sličnih tumora (8).

Tehnologija DNA mikroareja pokazala se idealnom za otkrivanje takvih molekularnih razlika. Nova molekularna klasifikacija karcinoma dojke temeljena je na genskoj ekspresiji, a začetnici su bili Perou i suradnici. Oni su 2000. godine (7) analizirali gensku ekspresiju normalnog i malignog tkiva dojke, na uzorku od 40 tumora dojke i 3 uzorka normalnog tkiva dojke, koristeći komplementarnu DNA mikroarejsku tehnologiju na 8102 humana gena. „Molekularni portreti,“ otkrivaju sličnosti i razlike u genskoj ekspresiji među tumorima, ali ukazuju i na njihovu biologiju. Varijacije u brzini rasta, aktivnosti specifičnih signalnih puteva i staničnom sastavu tumora odražavaju se u odgovarajućoj varijaciji ekspresije specifičnih grupa gena. Ekspresija „proliferacijske grupe“ gena varira između tumora, ali dobro korelira s mitotskim indeksom. Ova proliferacijska grupa gena uključuje i one gene koji kodiraju dva poznata imunohistokemijska markera stanične proliferacije: Ki-67 i PCNA.

Druga velika grupa gena omogućava uvid u aktivnost specifičnih signalnih i/ili regulacijskih sistema. Tako varijacije u ekspresiji gena za estrogen receptor alfa dobro koreliraju s klinički izmjerenim nivoom ER proteina u tumoru. U otprilike 20% tumora dojke koji ekspimiraju receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2), postoji i amplifikacija HER2 gena.

U dojci se morfološki i imunohistokemijski mogu razlikovati dva tipa stanica: bazalne i/ili mioepitelne i luminalne. Svaka od ovih staničnih linija eksprimira i brojne gene koji su međusobno različiti. Kako je prije navedeno, bazalne stanice ekspimiraju grupu gena koja uključuje CK5, CK14, CK17,

integrin beta4 i laminin. Luminalne stanice eksprimiraju grupu gena koja uključuje CK 8/18 i transkripcijske faktore, kao što je ER.

Cilj ovog istraživanja bio je razviti sistem klasifikacije tumora baziran na njihovoj genskoj ekspresiji. Na taj način identificirane su četiri grupe uzoraka tkiva dojke s određenim molekularnim karakteristikama: tumori luminalnog tipa/ER+, bazalnog tipa, HER2 pozitivni tip tumora i normalna dojka.

- Tumori luminalnog tipa bolje su diferencirani, pozitivni na hormonske (ER i PR) receptore, HER2 negativni i općenito prognostički povoljnija skupina tumora obzirom na ishod bolesti.
- HER2 pozitivni tumori imaju amplifikaciju HER2 onkogeni i reagiraju na ciljanu terapiju tirozin kinaznog receptora i bolje odgovaraju na kemoterapiju.
- Bazalni tipovi tumora slabo su diferencirani, nedostaju im hormonski receptori, HER2 su negativni i općenito su prognostički nepovoljni, s lošim kliničkim ishodom, radi njihove sklonosti stvaranju udaljenih metastaza i nedostatku odgovora na dostupnu terapiju.
- Normalna dojka – genske karakteristike izražene su ekspresijom gena svojstvenih bazalnim epitelnim stanicama i adipocitima i niskom ekspresijom gena karakterističnih za luminalne epitelne stanice.

Važna implikacija ove studije je da klinička definicija ER negativnog karcinoma dojke uključuje najmanje dva biološki različita podtipa tumora (bazalni tip i HER2+) koji se trebaju i liječiti kao odvojene bolesti.

Sorlie je sa suradnicima (9) 2001. godine proširila istraživanje na većem broju uzoraka, koji su uključivali 78 karcinoma dojke, 3 fibroadenoma i 4 uzorka normalnog tkiva dojke. S obzirom na ekspresiju različitih gena i njihovo grupiranje, uspostavljena je klasifikacija karcinoma dojke, koja je sadržavala 5 grupa tumora: luminalni A tip, HER2+ tip i bazalni tip, koji su se izdiferencirali i u prethodnoj studiji, uz još dvije grupe: luminalni B i luminalni C tip tumora. Svih pet molekularnih tipova tumora korelirali su s kliničkim ishodom. Pokazalo se da HER2+ i bazalni tip imaju najkraće preživljenje, luminalni tipovi B i C mogli bi predstavljati klinički odvojenu grupu s lošijim ishodom, posebno u odnosu na relaps bolesti, a što se tiče luminalnog A tipa tumora, ishod je povoljniji u odnosu na sve ostale tipove. Ovom studijom je dokazan odnos pet grupa tumora dojke baziranih na genskoj ekspresiji prema kliničkom ishodu.

Premda su ove nove klasifikacije bazirane na molekularnom profilu postavljene, još uvijek postoje tumori unutar ovih skupina koji su heterogeni u odnosu na klinički ishod, stoga je potrebna daljna detaljna analiza i usavršavanje klasifikacija.

Jedna velika populacijska studija (10) procjenjivala je patološke karakteristike, etiologiju tumora i njihovu povezanost s molekularnim

tipovima tumora dojke. Oni su s obzirom na gensku ekspresiju, karcinome dojke podijelili u dvije grupe:

- ER pozitivne tumore (koji uključuju luminalni A i luminalni B tip) i
- ER negativne tumore (koji uključuju HER2+ tip, bazalni tip i neklasificirani ili tip „normalne dojke“)

s različitim kliničkim ishodom. Došli su do zaključka da je luminalni A tip tumora karakteriziran pozitivnom ER i PR ekspresijom, negativnom HER2 ekspresijom i da pokazuje povoljan klinički ishod u odnosu na ostale molekularne tipove tumora. Tumori luminalnog B tipa su HER2+, ER+ i PR+, ali i visokog proliferacijskog indeksa i pokazuju manje povoljan klinički ishod u usporedbi s tumorima luminalnog tipa A. Tumori bazalnog tipa karakterizirani su ekspresijom citokeratina 5/6 i 17, ztztztzttetom na ER i PR i česti su u bolesnika s BRCA1 mutacijama. Bazalni tip i HER2 pozitivni tip tumora su oboje negativni na estrogenske i progesteronske receptore i povezani su s lošim kliničkim karakteristikama i preživljenjem.

Ova molekularna klasifikacija je visoko dosljedna u neovisnim studijama koje koriste različite istraživačke modele, tumorske uzorke i statističke analize. Studije koje koriste odabrana imunohistokemijska bojanja (ER alfa, PR, HER2, CK5) uspjele su na sličan način stratificirati tumore prema kliničkom ishodu, što ukazuje da ova molekularna klasifikacija ima čvrste osnove (11, 12).

#### **1.2.4. Stadiji karcinoma dojke**

Određivanje stadija karcinoma dojke potrebno je zbog procjene proširenosti bolesti i posljedično tome predstavlja značajan prognostički faktor, kao i faktor u odabiru liječenja.

Nekoliko testova uključeno je u određivanje stadija: klinički pregled, patohistološka analiza tkiva i razne metode slikovne dijagnostike (“imaging” metode): rendgenska slika grudnog koša, mamografija, kompjutorizirana tomografija i magnetska rezonancija.

Za određivanje stadija, “*American Joint Committee on Cancer*” ili *AJCC* (podaci dostupni na internetskoj stranici <http://www.cancerstaging.org/>) koristi TNM klasifikacijski sustav, pri čemu se karcinomu pridružuje određeno slovo. Slovo “T” (tumor) označava veličinu karcinoma, slovo “N” (engl. node što znači čvor) zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova karcinomom i slovo “M” (metastasis) prisutnost karcinoma u udaljenom sijelu, odnosno prisutnost udaljenih metastaza.

Postoje dvije klasifikacije koje se danas koriste. Jedna je *klinička klasifikacija* ili klinički TNM, a temelji se na određivanju stadija prije kirurškog liječenja, odnosno na raznim kliničkim testovima i biopsiji, a označava se kao cTNM.

Druga klasifikacija je *patološka klasifikacija* (ili postkirurška patohistološka klasifikacija), a označava se kao pTNM. Ona se temelji na podacima dobivenim prije kirurškog liječenja, odnosno na cTNM-u, uz modifikaciju proizašlu iz patohistološke analize tkiva.

Općenito, cTNM predstavlja temelj kod izbora kirurškog liječenja, a pTNM je baza za procjenu prognoze i određivanja adjuvantnog liječenja.

Slijedi patološka TNM klasifikacija (**pTNM**):

### **Primarni tumor (pT)**

Slovo "T" kojeg slijedi broj od 0 do 4 opisuje veličinu tumora i proširenost u kožu ili stijenku grudnog koša. Veći broj uz slovo "T" upućuje na veći tumor i/ili proširenost u okolne strukture.

pTx: primarni tumor ne može se procijeniti

pT0: nema dokaza o primarnom tumoru

(nakon preoperativne neoadjuvantne terapije)

pTis (DCIS): in situ karcinom

pT1: tumor  $\leq 20$  mm u najvećem promjeru

pT1mi: tumor  $\leq 1$  mm u najvećem promjeru (mikroinvazija)

pT1a: tumor  $> 1$  mm, a  $\leq 5$  mm u najvećem promjeru

pT1b: tumor  $> 5$  mm, a  $\leq 10$  mm u najvećem promjeru

pT1c: tumor  $> 10$  mm, a  $\leq 20$  mm u najvećem promjeru

pT2: tumor  $> 20$  mm, a  $\leq 50$  mm u najvećem promjeru

pT3: tumor  $> 50$  mm u najvećem promjeru

pT4: tumor bilo koje veličine s direktnom ekstenzijom u

stijenku grudnog koša i/ili kožu (ulceracije ili kožni čvorići); invazija u kožu nije pT4.



### ***Regionalni limfni čvorovi (pN)***

Slovo “N” iza kojeg slijedi broj od 0 do 3 označava proširenost karcinoma u regionalne limfne čvorove.

(sn): procjena sentinel limfnog čvora

pNX: regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti

pN0: nema metastaza u regionalne limfne čvorove

pN1mi: mikrometastaze (od 0.2 mm i/ili ne više od 200 stanica, do 2.0 mm)

pN1: metastaze u 1 do 3 aksilarna limfna čvora

pN2: metastaze u 4 do 9 aksilarnih limfnih čvorova

pN3: metastaze u 10 ili više aksilarnih limfnih čvorova

### ***Udaljene metastaze (pM)***

Slovo “M” iza kojeg slijede brojevi 0 ili 1 označavaju prisutnost metastaza u udaljenim organima (na primjer u plućima ili kostima).

pM0: nema udaljenih metastaza

pM1: prisutne udaljene metastaze

Stadiji prema AJCC određuju strategiju za grupiranje bolesnika u odnosu na prognozu. Odluke o načinu liječenja donose se dijelom na osnovi stadija bolesti, ali primarno s obzirom na veličinu tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, razine estrogenskih i progesteronskih receptora u tumorskom tkivu, HER2 statusu, menopauzalnom statusu i općem stanju bolesnika.

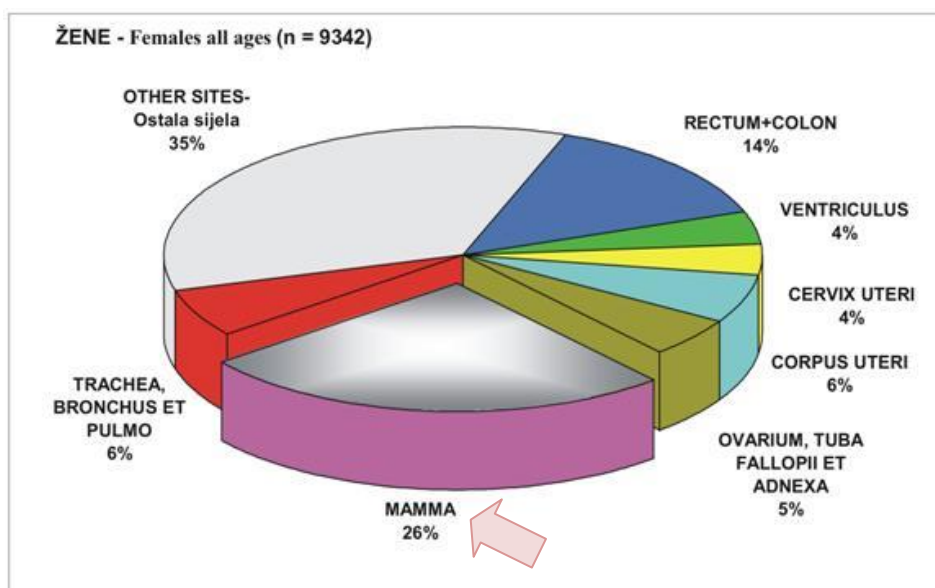
*National Cancer Data Base* (iz podataka dostupnih na internetskoj stranici <http://www.facs.org/cancer/ncdb/index.html>) dalo je podatke o petogodišnjem preživljenju bolesnika s dijagnosticiranim karcinomom dojke s obzirom na stadij, za 2001 i 2002. godinu:

- Stadij 0: Tis, N0, M0 – petogodišnje preživljenje 93%
- Stadij I: T1, N0, M0 – petogodišnje preživljenje 88%
- Stadij IIA: T0 ili T1, N1 (ali ne N1mi), M0 ili T2, N0, M0 – petogodišnje preživljenje 81%
- Stadij IIB: T2, N1, M0 ili T3, N0, M0 – petogodišnje preživljenje 74%
- Stadij IIIA: T0-T2, N2, M0 ili T3, N1 ili N2, M0 – petogodišnje preživljenje 67%
- Stadij IIIB: T4, N0-N2, M0 – petogodišnje preživljenje 41%
- Stadij IIIC: bilo koji T, N3, M0 – petogodišnje preživljenje 49%
- Stadij IV: bilo koji T, bilo koji N, M1 – petogodišnje preživljenje 15%

### **1.2.5. Incidencija i epidemiologija karcinoma dojke**

Karcinom dojke najčešći je maligni tumor žena i incidencija mu raste u svim industrijaliziranim zemljama. U SAD-u je Nacionalni Institut za rak (podaci dobiveni s internetske stranice <http://seer.cancer.gov/>, od SEER-a, Surveillance Epidemiology and End Results) procijenio da 2007. godine oko 180 000 žena ima dijagnosticiran rak dojke, a oko 40 000 je umrlo od njega.

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (Registar za rak), najčešće sjelo raka u žena u Hrvatskoj 2008. godine je dojka (26%), s incidencijom od 107.4/100 000 (slika 3). Stope incidencije i mortaliteta žena koje boluju od raka dojke u stalnom su porastu posljednja dva desetljeća i rastu s dobi bolesnica.



Slika 3. Najčešća sjela raka u žena u 2008. godini (HZJZ, Registar za rak).

Usprkos činjenici da je dojka zbog svoga smještaja dostupna samopregledu i kliničkoj obradi, još uvijek je rak dojke vodeći uzrok smrti među malignim bolestima kod žena (Izvor podataka: Dokumentacija Državnog zavoda za statistiku, 2010. god. (DEM-2/08); Obrada podataka: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2010.).

## **Faktori rizika za razvoj karcinoma dojke**

Faktore rizika Američka udruga za rak (American Cancer Society) podijelila je u tri skupine:

- 1) faktori rizika koji se ne mogu promijeniti,
- 2) faktori rizika vezani uz stil života, te
- 3) nesigurni, kontroverzni ili nedokazani faktori rizika.

**Ad.1.** U faktore rizika koji se ne mogu promijeniti spada starija dob.

Genetski faktori su odgovorni za oko 10% slučajeva nasljednih karcinoma dojke, a nastali su kao rezultat mutacije određenih gena. BRCA1 i BRCA2 geni su tumor supresorski geni, čije su mutacije vezane uz povećani rizik za razvoj nasljednog karcinoma dojke i jajnika. Rizik se povećava i do 80% za članove obitelji s BRCA mutacijama. Postoje još neki geni čije mutacije dovode do nasljednih karcinoma dojke, ali su te mutacije rjeđe i ne povećavaju rizik kao BRCA mutacije, kao što je mutacija ATM, p53, CHEK2, PTEN i CDH1 gena.

Pojava karcinoma dojke u obitelji, pogotovo u prvom srodstvu, dvaput povećava rizik za razvoj karcinoma.

Žena koja je imala karcinom jedne dojke, ima 3 do 4 puta povećan rizik od razvoja novog karcinoma u drugoj ili istoj dojci.

Povećana gustoća tkiva dojke znači više žljezdanog, a manje masnog tkiva dojke, i predstavlja povećani rizik za razvoj karcinoma.

Neke benigne lezije, neproliferativne i proliferativne, pogotovo one s atipijom, nose povećani rizik za razvoj karcinoma.

Lobularni in situ karcinom 7 do 10 puta povećava rizik za razvoj karcinoma u obje dojke.

Dugi menstrualni period, znači rana menarhe i kasna menopauza, nuliparitet, povećavaju rizik za razvoj karcinoma dojke, zbog dulje i veće izloženosti hormonima, estrogenu i progesteronu.

Prethodno zračenje grudnog koša zbog terapije neke druge bolesti, pogotovo ako se zrači tijekom adolescencije kada se dojke razvijaju, značajno povećava rizik.

Ekspozicija dietilstilbestrolu povećava rizik za žene, ali i njihove kćeri.

**Ad.2.** Hiperestrinizam u postmenopauzi, u smislu dugogodišnje nadomjesne hormonske terapije, povećava rizik od razvoja karcinoma dojke.

Dojenjem se smanjuje broj menstrualnih ciklusa i tako se objašnjava njegov protektivni učinak.

Povećani rizik nosi i veća količina dnevno unesenog alkohola.

Pretjerana debljina, pogotovo u postmenopauzi, i to u području struka, povećava rizik.

Fizička aktivnost od 1.25 do 2.5 sata na tjedan (studija Women's Health Initiative) smanjuje rizik za 18%.

**Ad.3.** Postoje i mnogi nedokazani i kontroverzni faktori rizika, kao što su prehrana bogata mastima, upotreba antiperspiranata, kemikalije iz okoliša, duhan i noćni rad.

### ***Prognostički i prediktivni faktori rizika***

Prognoza je mogućnost predviđanja ishoda bolesti. Kako bi se moglo definirati biološko ponašanje neke bolesti, sa ili bez liječenja, neophodno je znati neke karakteristike takvog oboljenja, koje se zovu prognostički faktori.

Ishod bolesti uvelike je ovisan i o odabranoj terapiji. Ulogu u predviđanju odgovora na terapiju imaju prediktivni faktori.

Interes za prognostičke i prediktivne faktore intenzivirao se zbog uspješnog odgovora na sistemsku adjuvantnu terapiju ordiniranu bolesnicima koji imaju karcinome, pogotovo u ranoj fazi. Bolesnici koji imaju procijenjeni visoki rizik za povrat bolesti (recidiv), odabiru se za primjenu sistemske adjuvantne terapije, dok bolesnici, koji najvjerojatnije neće imati recidiv, mogu biti pošteđeni morbiditeta zbog takvog liječenja.

**Prognostički faktori u karcinomu dojke** (13) temelje se na morfologiji, odnosno to su karakteristike vezane uz tumor i uključuju: veličinu, histološki tip, stupanj diferenciranosti (gradus), vaskularnu invaziju, veličinu

in situ komponente, status limfnih čvorova, te postojanje udaljenih metastaza.

*Veličina tumora* jedan je od najjačih prognostičkih faktora, čak i nakon 20 godina praćenja. Izrazito je važno precizno procijeniti veličinu tumora, stoga što se mamografskim probirom sve češće dijagnosticiraju tumori u ranoj fazi, odnosno oni veličine do 2 cm (pT1 tumori). Učestalost metastaza u limfnim čvorovima bolesnika čiji su tumori manji od 1 cm je 10 do 20%, a preživljenje od 90% nalazi se kod bolesnika koji su bez nodalnih metastaza (14, 15). Veći tumori povezani su s više pozitivnih limfnih čvorova, što onda utječe i na preživljenje (16).

Prognostički značaj *histološkog tipa* može se grupirati u 4 kategorije: odlična, dobra, loša i vrlo loša prognostička skupina (17).

Tako u skupinu s odličnom prognozom ulazi invazivni kribriiformni, tubularni, tubulo-lobularni i mucinozni s više od 80%-tnim desetogodišnjim preživljenjem.

Nešto slabiju prognozu ima miješani tipovi karcinoma (tubularni miješani, atipični medularni, i alveolarni lobularni) s 60–80%-tnim desetogodišnjim preživljenjem.

Lošu prognozu imaju invazivni papilarni, klasični lobularni i medularni, a najlošije 10-godišnje preživljenje ima duktalni i miješani duktalno-lobularni karcinom. U većini populacija duktalni karcinom čini oko 70% svih karcinoma dojke (16).

*Stupanj diferencijacije ili histološki gradus tumora govori o prognozi, i bolja diferenciranost vezana je uz bolju prognozu (13). Određivanje stupnja diferencijacije invazivnog karcinoma obvezno je za sve stadije bolesti (18). Za njegovu procjenu koristi se Nottinghamski kombinirani histološki sistem gradiranja (stupnjevanja), koji procjenjuje 3 tumorske karakteristike:*

- formiranje tubula: >75% - 1 bod, 10-75% - 2 boda, <10% - 3 boda
- nuklearni pleomorfizam tumorskih stanica: male uniformne jezgre – 1, umjereno uvećane i varijabilne jezgre – 2, izražena varijabilnost – 3
- broj mitozâ (na 10 velikih vidnih polja): ovisno o veličini mikroskopskog polja, daje se 1, 2 ili 3 boda

Histološki gradus dobiva se kao zbroj bodova sve tri karakteristike:

- gradus 1 (dobro diferencirani karcinom) ako je zbroj 3, 4 ili 5
- gradus 2 (umjereno diferencirani karcinom) ako je zbroj 6 ili 7
- gradus 3 (slabo diferencirani karcinom) ako je zbroj 8 ili 9

*Limfovaskularna invazija povezana je s preživljenjem i predstavlja neovisni prognostički u žena koje imaju karcinome dojke bez zahvaćenosti limfnih čvorova (19).*

Status limfnih čvorova aksile pokazao se kao vrlo važan prognostički pokazatelj razdoblja bez znakova bolesti (disease free survival) i sveukupnog preživljenja žena s karcinomom dojke (15).



U prediktivne faktore ubrajaju se: receptori za steroidne hormone (estrogenski i progesteronski), receptor za HER2, te marker proliferacije Ki-67.

Postoje dva **estrogenska receptora**, ER alfa i ER beta, koji su produkti različitih gena, a pripadaju super obitelji nuklearnih hormonskih receptora. Kada se vežu za svoje ligande, ovi receptorski proteini funkcioniraju kao transkripcijski faktori u jezgri. Nekoliko kinaza može isto tako aktivirati estrogenske receptore, a proces je nazvan - aktivacija neovisna o ligandu. Mnogi od gena koji su regulirani estrogenom važni su za staničnu proliferaciju, inhibiciju apoptoze, stimulaciju invazije, metastaziranje i promociju angiogeneze. Ekspresija ER alfa je nesumnjivo najvažniji biomarker karcinoma dojke, jer omogućava osjetljivost na ciljanu hormonsku terapiju. Tumori pozitivni na ER koriste steroidni hormon estradiol kao glavni stimulans rasta, čime je ER direktni cilj endokrine terapije (20).

Ekspresija progesteronskog receptora izrazito je ovisna o prisutnosti estrogenskog receptora. Tumori koji ekspimiraju PR, ali ne i ER, izrazito su rijetki i čine manje od 1% svih slučajeva karcinoma dojke. Zbog ovog razloga takvi se tumori trebaju ponovno testirati s obzirom na ER status radi isključivanja lažne ER negativnosti. U rijetkim slučajevima gdje je samo prisutna PR ekspresija, opisana je ograničena dobrobit od antiestrogenske terapije, ali se ona ipak preporuča.

Estrogenski i progesteronski receptori određuju se u rutinskim patohistološkim preparatima bolesnika s karcinomom dojke, primarno kao prediktivni faktori odgovora na adjuvantnu hormonsku terapiju.

**HER2** ili receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (human epidermal growth factor receptor 2) jedan je od četiri člana obitelji receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) s tirozin-kinaznom aktivnosti. HER2 gen je protoonkogen koji se nalazi na dugom kraku kromosoma 17. Onkogen verzija ovog gena s posljedičnom ekspresijom mutiranog receptora povezana je s njegovom trajnom aktivacijom, bez vezanja faktora rasta. Mnogo učestalija od mutacija ovih protoonkogenata je pretjerana ekspresija normalnih oblika receptora za faktor rasta. U nekim tumorima pojačana ekspresija receptora rezultat je genske amplifikacije, premda je ponekad uzrok nepoznat (4).

HER2 onkogen identificiran je i kao prognostički faktor. U slučajevima gdje je HER2 pretjerano eksprimiran (HER2 pozitivni tumori) bolesnici će vrlo vjerojatno doživjeti recidiv i imati kraće preživljenje.

Amplifikacija HER2 gena najčešće rezultira pretjeranom ekspresijom transmembranskog proteina, a javlja se u oko 10% oboljelih od karcinoma dojke. Povezana je s visokim histološkim gradusom, smanjenim preživljavanjem i slabijim odgovorom na hormonsku i kemoterapiju. Zbog svoje prognostičke uloge, kao i mogućnosti prediktivnog odgovora na ciljanu terapiju trastuzumabom („Herceptin“), u karcinomima dojke rutinski se analizira ekspresija HER2 (20, 21).

**Proliferacijski marker Ki-67** identificirali su Gerdes i suradnici 1991. godine kao nuklearni nehistonski protein. Gen za Ki-67 nalazi se na dugom kraku kromosoma 10. Intenzitet ekspresije Ki-67 varira tijekom staničnog ciklusa. Stanični izgled i smještaj Ki-67 proteina tijekom staničnog ciklusa nije homogen. Tijekom rane G1 faze vidi se kao slabo obojeni fokusi u jezgri. Tijekom kasne G1, S i G2 faze progresivno raste intenzitet obojenosti u jezgri. U ranoj mitozu kada dolazi do disrupcije nuklearne membrane, Ki-67 pokazuje snažnu ekspresiju povezanu s površinom kondenziranih kromosoma u citoplazmi. Ovaj intenzitet naglo nestaje u anafazi-telofazi. Na ovaj način monoklonsko protutijelo usmjereno na Ki-67 oboji stanice u proliferaciji, a mirujuće stanice (u G0 fazi) su negativne. Postoje dokazi iz opsežnih studija da Ki-67 kao marker proliferacije, ima mogućnost diskriminacije između dobre i loše prognostičke grupe bolesnika s karcinomom dojke, naročito u onih bez nodalnih metastaza. Azambuja je sa suradnicima 2007. godine učinio meta-analizu zbog boljeg definiranja prognostičke vrijednosti Ki-67/MIB-1 i procjene utjecaja Ki-67 na klinički ishod bolesnika s ranim karcinomom dojke. Analiza je pokazala da je Ki-67 povezan s visokim rizikom za relaps bolesti, kao i s lošijim preživljenjem u bolesnika s ranim karcinomom dojke (22).

## Imunohistokemijski angiogeni i limfangiogeni markeri

Za procjenu tumorske angiogeneze opisuju su markeri VEGF-A i CD31, a za procjenu limfangiogeneze VEGF-C i D2-40.

**D2-40** je monoklonsko protutijelo na O-vezani sijaloglikoprotein, molekularne mase 40 000. Opisan u radu Marksa i suradnika (23), D2-40 reagirao je s onkofetalnim antigenom eksprimiranim u fetalnom testisu i na površini tumorskih stanica tumora zametnih stanica testisa, ali ne i sa stanicama testisa odraslog muškarca. Kahn i suradnici su 2002. godine istraživali histogenezu Kaposijevog sarkoma, i D2-40 se pokazao kao selektivni marker za limfatični endotel, koji ne reagira s endotelom krvnih žila (24). Na taj način je monoklonsko protutijelo D2-40 postalo imunohistokemijsko oruđe kojim se može riješiti dilema oko definiranja limfovaskularne invazije u tumorima, pa tako i u karcinomu dojke, gdje postojanje ili odsustvo limfovaskularne invazije predstavlja prognostički faktor. Osim toga, u ovom istraživanju protutijelo D2-40 služilo je za identifikaciju limfnih žila u svrhu procjenjivanja njihove srednje gustoće.

**CD31 antigen**, poznat i kao PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) je transmembranski glikoprotein od 130 kDa i član imunoglobulinske super obitelji. Protein CD31 kodira gen koji je lokaliziran na dugom kraku kromosoma 17. CD31 je vaskularna adhezijska i signalna molekula uključena u brojne vaskularne funkcije (uključujući angiogenezu i transmigraciju leukocita kroz endotel). Eksprimiran je na površini cirkulirajućih trombocita, monocita, neutrofila i određene subpopulacije T

limfocita. Izrazito je snažno eksprimiran na intercelularnim spojevima endotelnih stanica, gdje je koncentrirano do  $10^6$  PECAM-1 molekula (25, 26). U ovoj studiji korišteno je protutijelo na CD31 antigen zbog identifikacije vaskularnog endotela (endotela krvnih kapilara).

**VEGF** gen lociran je na kromosomu 6p21.3. Sastoji se od 8 eksona odvojenih sa 7 introna. VEGF obitelj sastoji se od 6 članova: VEGF-A, B, C, D, E i PlGF koji u posebnim staničnim tipovima različito djeluju.

**VEGF-A** je signalni protein kojeg stvaraju stanice radi stimulacije angiogeneze i vaskulogeneze. VEGF-A sinonim je za VEGF i egzistira u 6 izoformi: VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 i VEGF 206, nastalih različitim sintezama (splicing) istog gena (27). Prvi puta je opisan kao vaskularni faktor permeabilnosti, jer inducira promjene u propusnosti endotela kroz formaciju transcelularnih fenestracija (28). VEGF-A je izražen tijekom embriogeneze i to intenzivno na mjestima aktivne angiogeneze (29), ali i u zrelih tkivima u raznim stanicama (endotelu, makrofagima, T-limfocitima, glatkomišićnim stanicama). Kontrolom rasta, remodeliranja i preživljavanja endotelnih stanica, održava dinamičnost strukture vaskularne mreže. Funkcija VEGF-A je aktivacija molekularnih zbijanja koja u konačnici rezultiraju stvaranjem zrele vaskularne mreže (30).

Ovi biološki učinci su posredovani putem četiri receptora za VEGF: VEGF-R1 (flt-1), -R2 (flk/KDR), -R3 (flt-4) i neuropilin-1 (NP-1). Prva 3 receptora su klasični receptori s tirozin-kinaznom aktivnosti. Dok su VEGF-R1 i VEGF-R2

locirani na vaskularnom endotelu, VEGF-R3 nalazi se na limfnim žilama (31).

Promjene u ekstracelularnom matriksu mogu podražiti stanice na lučenje VEGF-a. Ekstracelularni podražaji uključuju hipoksiju, hipoglikemiju, prisutnost inflamatornih citokina, trombocitni faktor rasta (PDGF), bazični fibroblastni faktor rasta (bFGF), epidermalni faktor rasta (EGF), inzulinu sličan faktor rasta (IGF). Mehanizmi koji stoje iza utjecaja različitih faktora rasta na proizvodnju VEGF-a i promociju angiogeneze još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni.

**VEGF-C**, otkriven prvi put 1996. godine (32) je član VEGF obitelji polipeptidnih faktora rasta. VEGF-C sintetizira se kao pre-propeptid i proteolizom se razgrađuje do zrelog homodimera, od približno 40 kDa. Proteoliza povećava afinitet VEGF-C prema VEGFR-3 i do 400 puta, i omogućava mu da se veže za njega i aktivira ga (33). Zbog svojeg načina ekspresije i sposobnosti vezanja za VEGFR-3, VEGF-C impliciran je u razvoj limfatičnog sustava (31). Njegova sposobnost vezanja za VEGFR-2 objašnjava stimulaciju angiogeneze u određenim eksperimentalnim uvjetima (34). VEGF-C inducira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica i odgovoran je za preživljenje limfatičnog endotela. Za vrijeme razvoja, ispoljenost VEGF-C je prisutna zajedno s VEGFR-3 i to pretežno u regijama razvoja limfnih žila i mezenterija.

VEGF-C je okarakteriziran kao limfangiogeni i angiogeni faktor rasta, a svoje djelovanje postiže vezanjem za VEGFR-3 i VEGFR-2. Pokazalo se da je

VEGFR-3 izrazito važan u određivanju jačine i potencijala za limfangiogeni odgovor. U istraživanjima se došlo do zaključka da VEGFR-3, koji se eksprimira u brojnim malignim tumorima, može biti marker za limfatični endotel. Ekspresija VEGFR-3 u karcinomu debelog crijeva korelirala je s lošijim preživljenjem, što ukazuje na povezanost između VEGF-C i VEGFR-3 (35).

Nakamura je 2003. godine u svojoj studiji došao do zaključka da je pojačana ekspresija VEGF-C u tumorskom mikrookolišu karcinoma dojke povezana s lošijom prognozom (36) i metastazama u limfne čvorove u bolesnika s karcinomom dojke (37).

### **1.3. Ekstracelularni matriks**

Ekstracelularni matriks (ECM) sastavljen je od kolagena, elastina, proteoglikana i nekolagenih glikoproteina, koji stvaraju kompleksnu trodimenzionalnu mrežu oko stanica različitih tkiva. Nekad se ekstracelularni matriks smatrao inertnom materijom koja ispunjava prostor i omogućava samo mehaničku čvrstoću tkiva i organa. Danas je poznato da je ekstracelularni matriks dinamična struktura koja je u interakciji sa stanicama, stvarajući signale koji kontroliraju njihovo biološko ponašanje. Stoga se makromolekule ekstracelularnog matriksa smatraju bioaktivnim tvarima, zbog utjecaja na staničnu adheziju, migraciju, proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje (38).

Strukturno različite komponente ECM-a posjeduju razne aktivnosti i striktno su organizirane, što određuje njegovu bioaktivnost. Čak i male promjene, kao što je zamjena jedne aminokiseline u jednoj komponenti ECM-a mijenja fizikalna i kemijska svojstva tkiva, a dovodi i do promjena celularnog fenotipa i interakcija između stanica i matriksa. Ovakve promjene u funkciji tkiva u konačnici vode u razvoj bolesti. Može se pretpostaviti da nema bolesti bez kvantitativnih i/ili kvalitativnih promjena u ECM.

Komponente ekstracelularnog matriksa klasificiraju se kao fibrilarne i nefibrilarne molekule. Određene vrste kolagena i elastin su tipične fibrilarne molekule ECM-a, dok se proteoglikani i glikoproteini smatraju nefibrilarnim. Nedavno je uveden termin „matricelularnih proteina“ koji se odnosi na grupu molekula ECM-a i uključuje trombospondin-1 i -2, tenascin-C i osteopontin koji nemaju funkciju strukturalnih elemenata, nego utječu na interakcije između stanica i matriksa i sudjeluju u cijeljenju (39, 40).

Sintezu molekula ECM-a kontroliraju specifični faktori rasta, a jedan od najznačajnijih je transformirajući faktor rasta – beta (TGF-beta) (41). Život molekula ECM određuju proteaze, posebno matriksne metaloproteinaze (MMP) (42).

#### **1.4. Tumorska invazija i metastaziranje**

Maligne stanice posjeduju određena svojstva koja ih jasno odvajaju od normalnih: samodostatnost u rastu, neosjetljivost na signale inhibicije rasta, izbjegavanje programirane stanične smrti (apoptoza), neograničeni



proliferacijski potencijal, potpomognutu angiogenezu, te invazivnost i sposobnost metastaziranja (43).

Metastatski rasap, odnosno širenje tumora izvan primarnog mjesta nastanka, glavna je karakteristika malignih tumora, glavni uzrok smrti zbog malignoma i jedna od najvećih kočnica za izlječenje. Razumijevanje molekularnih mehanizama nastanka metastaza od ključne je važnosti za njihovo kontroliranje i stvaranje novih i efektivnih načina liječenja. Samo je mali postotak stanica primarnog tumora potencijalno sposoban metastazirati. A da bi to mogle, ove se stanice trebaju odvojiti od primarne tumorske mase, migrirati prema limfnim ili krvnim žilama, probiti vaskularnu bazalnu membranu i ući u lumen žile, izbjeći imuni nadzor, adherirati uz vaskularni endotel organa koji je udaljen od primarnog sjedla tumora, ekstravazirati, preživjeti i rasti u novom mikrokruženju (44). Premda se ovaj kompleksan put metastaziranja koji moraju preživjeti tumorske stanice čini kao vrlo neefikasan, manje od 0.1 % ipak uspije prijeći sve zapreke i stvoriti novu, sekundarnu tumorsku masu – metastazu, koja znatno pogoršava prognozu bolesti. Naime, metastataze su najčešće inoperabilne i slabo odgovaraju na kemoterapiju i/ili radioterapiju, na koju je primarni tumor bio osjetljiv.

Ovaj način gledanja na razvoj tumora koji je usmjeren na tumorsku stanicu zanemaruje doprinos tumorskog mikrokoliša malignom fenotipu. Značaj tumorskog mikrokoliša tijekom progresije karcinoma prepoznat je pred više od sto godina u hipotezi koji je postavio Paget 1889. godine, a nazvana je

„seed and soil“ (sjeme i zemlja). Stephen Paget je tijekom obdukcija žena koje su imale karcinom dojke analizirao i pronašao obrasce metastaziranja koji nisu bili slučajni. Tako je predložio teoriju koja kaže da tumorske stanice („sjeme“) imaju specifični afinitet prema specifičnim organima („zemlja“), i metastaza se može razviti samo ako su „sjeme“ i „zemlja“ kompatibilni (45).

Moderna definicija ove hipoteze tumorski ekosistem smatra dvodjelnim, jedan dio čine tumorske stanice, endotel, periciti, glatkomišićne stanice, fibroblasti, adipociti i stanice imunološkog sustava (46). Drugi dio sastoji se od različitih komponenti ekstracelularnog matriksa, čiji sastav utječe na fenotip celularnog dijela tumorskog ekosistema. ECM nije samo strukturna podrška tumorskim stanicama nego predstavlja i spremnik biološki aktivnih molekula, kao što su faktori rasta i citokini (47).

Progresija tumora nije više prepoznata samo kao neovisan događaj koji je vezan uz genetske mutacije i nekontrolirani rast tumorskih stanica. Ključnu ulogu u tumorigenezi i metastaziranju imaju okolne stromalne stanice koje stvaraju faktore rasta i citokine, kao i različiti signalni putevi inducirani interakcijom između tumorskih i stromalnih stanica.

Normalna stroma sastoji se od vezivnog tkiva koje služi kao potporna mreža tkivima i organima. Fibroblasti kao najvažniji dio strome nužni su u sintezi i odlaganju ekstracelularnog matriksa stvarajući kolagene i fibronektin. Isto tako stvaraju i luče laminin i kolagen tipa IV koji su sastavni dijelovi bazalne membrane, granice između epitela i strome (48). Fibroblasti su i izvor različitih solubilnih parakrinih i autokrinih faktora rasta koji reguliraju rast

okolnih stanica, kao i njih samih. Fibroblasti, ali i ostale stanice strome (endotel, stanice imunološkog sustava) doprinose remodeliranju ECM-a tako što stvaraju i luče proteaze koje razgrađuju ECM. Jedne od najvažnijih proteaza su matriksne metaloproteinaze. U fiziološkim uvjetima ravnoteža između metaloproteinaza i njihovih inhibitora održava ECM u dobro organiziranom obliku. Na taj način molekule ekstracelularnog matriksa pomažu održavanju tkivnog integriteta, reguliraju staničnu migraciju i predstavljaju spremište citokina i faktora rasta (49).

Tijekom tumorske progresije, tumorske stanice mogu lučiti MMP, na taj način mijenjati karakteristike strome i stvarati sebi prilagođeni mikrokoliš.

U procesu tumorske progresije važan je međusobni odnos tumorskih stanica i stanica stromalnog tkiva domaćina (50, 51, 52). U većini organa glavna proteinska komponenta ekstracelularnog matriksa su kolageni, kojeg stvaraju i luče stromalne stanice, predominantno fibroblasti. Brojni drugi proteini (laminin i kolagen tipa IV) pridonose formiranju specijaliziranih komponentama ekstracelularnog matriksa, kao što je bazalna membrana.

Proteolitički enzimi koji razgrađuju molekule ekstracelularnog matriksa, omogućavaju i olakšavaju rast i diseminaciju tumorskih stanica. Oni uključuju nekoliko proteaza, kao što su aktivatori plazminogena, ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) i ADAMTS (ADAMs with thrombospondin type I motifs) (50). Jedne od glavnih proteaza s izrazito značajnom ulogom u tumorskoj invaziji i metastaziranju su matriksne metaloproteinaze (51, 53, 54).

## **1.5. Matriksne metaloproteinaze**

Priča o metaloproteinazama počinje davne 1962. godine, kada su istraživači Gross i Lapiere (55) prvi opisali kolagenolitičku aktivnost koja dovodi do nestanka repa punoglavca žabe tijekom metamorfoze. S obzirom da je rep punoglavca građen od fibrilarnog kolagena, oni su smatrali da je moguće identificirati enzim koji ga razgrađuje, iz homogenata repa punoglavca. Otkrili su da tkiva punoglavca inkubirana na kolagenom gelu, pri tjelesnoj temperaturi tijekom 24 sata izazivaju njegovu lizu. Time su dokazali po prvi puta da postoji enzim (u životinjskom svijetu) koji razgrađuje fibrilarni kolagen.

Matriksne metaloproteinaze su obitelj ekstracelularnih proteinaza koje su ovisne o cinku. Reguliraju razvoj i fiziološke procese (56), kao što su morfogeneza, angiogeneza, regulacija upale (57), cijeljenje rana, ali su uključene i u patološke procese, kao što je tumorski rast (50, 54). Sintetiziraju se kao proenzimi (zimogeni) i mogu biti secernirani ili uklopljeni u staničnu membranu (transmembranski).

### **1.5.1. Struktura matriksnih metaloproteinaza**

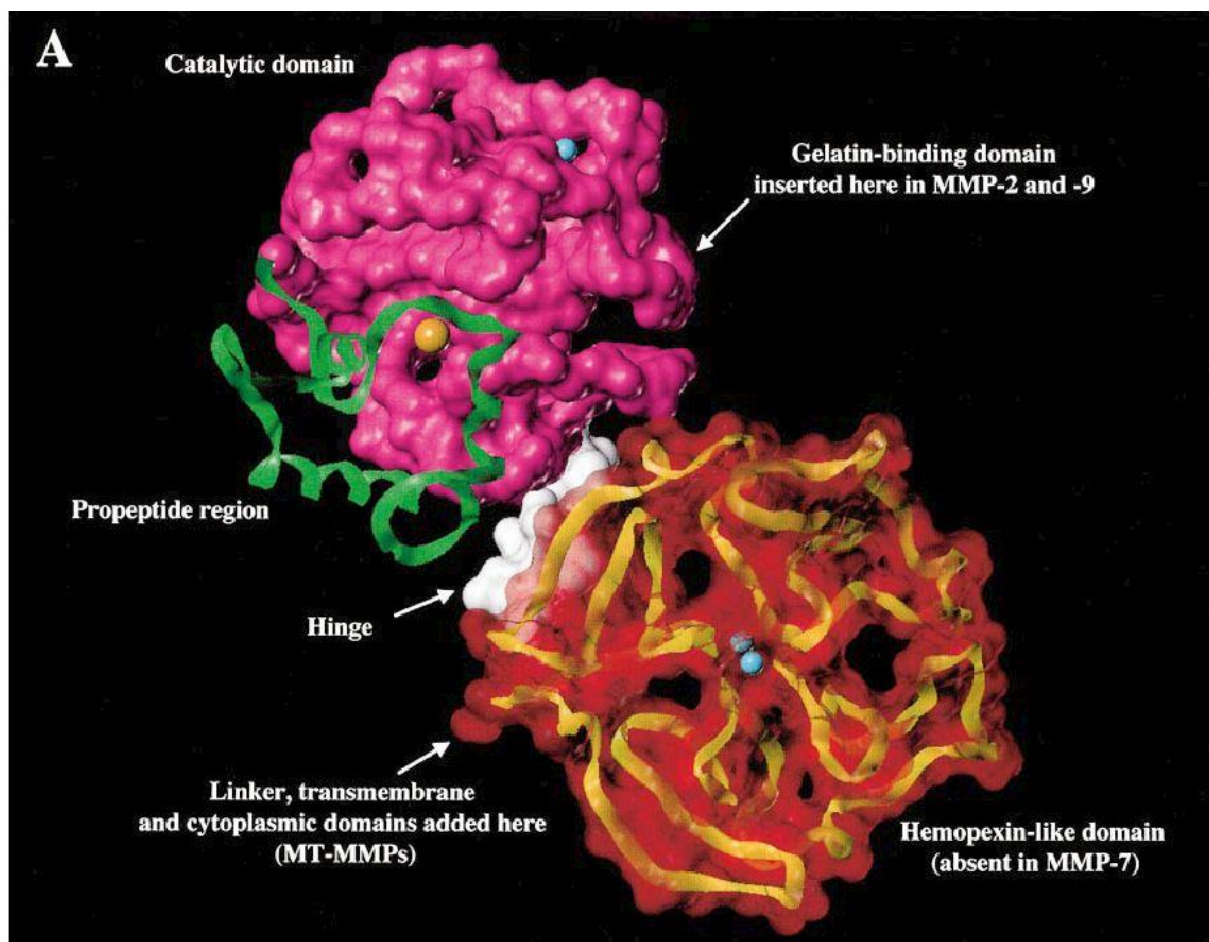
Skupinu matriksnih metaloproteinaza čini do sada 29 poznatih molekula koje mogu razgraditi praktički sve komponente ECM-a, ali i nematriksne molekule, kao što su faktori rasta, citokini i njihovi receptori.

Svi članovi MMP obitelji imaju istu osnovnu strukturu (slika 4 i 5):

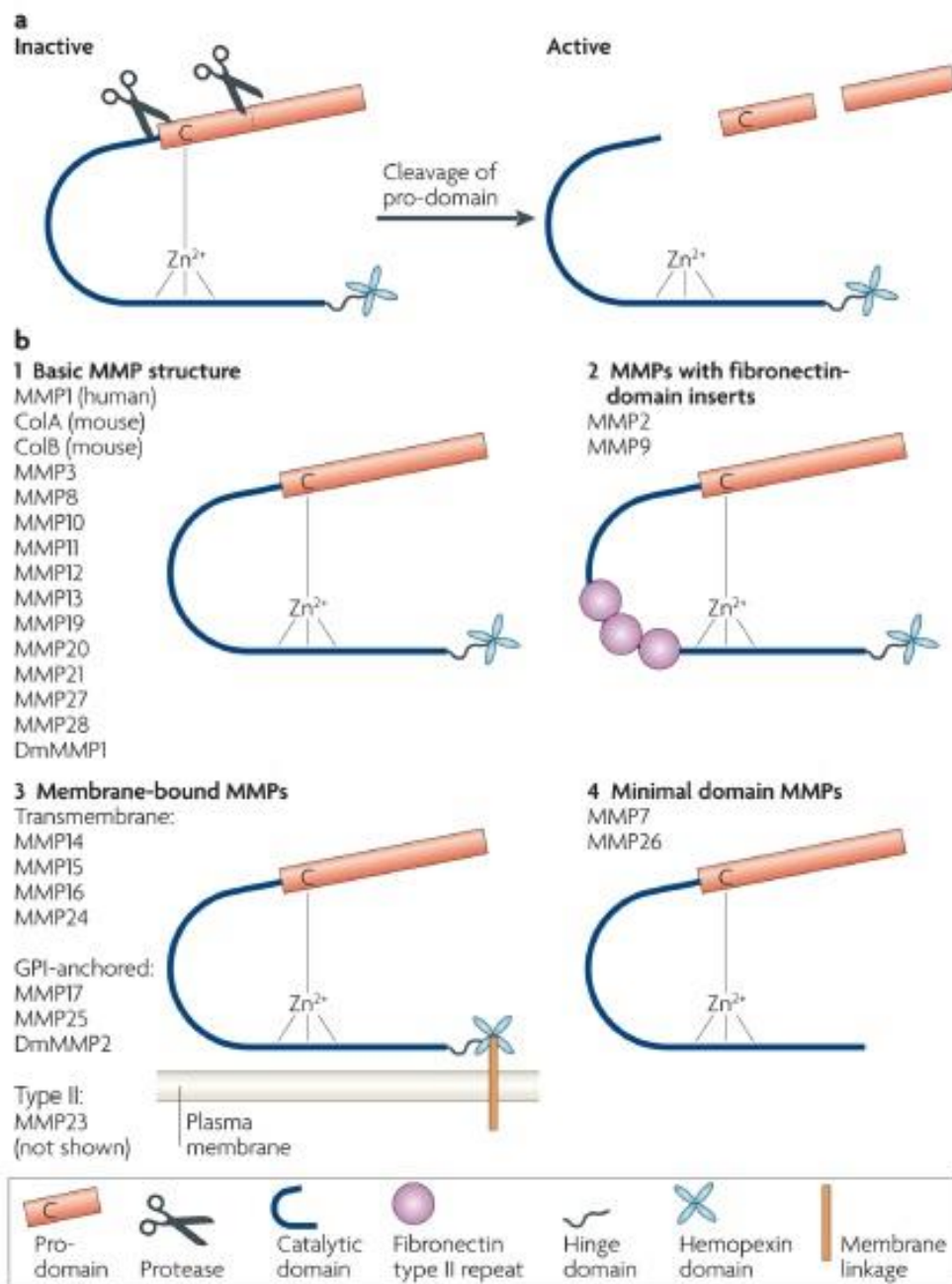
- Prodomena ili propeptid sastoji se od 80-90 aminokiselina i cisteinskog dijela, koji je u interakciji s ionom cinka u katalitičkoj domeni. Odvajanje propeptida proteolizom rezultira aktivacijom zimogena, budući da se svi članovi obitelji matriksnih metaloproteinaza stvaraju u latentnoj (inaktivnoj) formi zimogena.
- Katalitička domena u svojoj strukturi sadrži ion cinka koji je neophodan za proteolitičku aktivnost metaloproteinaza. Ova domena ima i dodatne ione cinka i kalcija koji održavaju trodimenzionalnu strukturu metaloproteinaza i neophodni su za stabilnost i enzimsku aktivnost.
- Hemopeksinska C-terminalna domena vezana je za katalitičku domenu preko fleksibilne „zglobne“ (hinge) regije i doprinosi specifičnosti prema supstratu.

Osim ove tri osnovne domene, sve MMP imaju amino-terminalnu signalnu sekvencu (Pre) koju cijepa signalna peptidaza tijekom ulaska u endoplazmatski retikulum.

Matriksne metaloproteinaze se međusobno strukturno razlikuju prisutnošću ili odsutnošću dodatnih domena, koje doprinose njihovoj aktivnosti, specifičnosti prema supstratu, vezanju određenog inhibitora, vezanju za matriks i smještenost na staničnoj površini (50).



**Slika 4. Trodimenzionalna struktura MMP-a.** (iz: Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *Faseb J* 1998;12:1075-95.)



**Slika 5. Shematska struktura MMP-a.** **a)** Inaktivna forma MMP-ova održava se vezom cisteinskog ostatka u prodomeći s ionom cinka u katalitičkoj domeni. Cijepanjem prodomeće (na dva moguća mjesta, unutar prodomeće ili između prodomeće i katalitičke domene) nastaje aktivna forma MMP-ova. **b)** Većina MMP-ova ima istu domensku strukturu sačinjenu od prodomeće, katalitičke domene, vezujuće regije i hemopeksinske domene (na slici pod **1**). MMP-2 i MMP-9 imaju unutar svoje katalitičke domene tri ponavljajuće regije fibronektinskog tipa II (pod **2**). Membranski tipovi MMP-a (MT-MMP) vezani su za staničnu membranu ili transmembranskom domenom ili spojem s glikozilfosfatidilinozitolom (GPI), vezanim za hemopeksinsku domenu (pod **3**). Najmanjim molekulama MMP-a nedostaju vezujuća i hemopeksinska domena (pod **4**). (iz: Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:221–33.)

## **1.5.2. Podjela matriksnih metaloproteinaza**

Matriksne metaloproteinaze se mogu klasificirati prema njihovoj strukturi i funkciji. S obzirom na funkciju, odnosno specifičnost prema supstratu, MMP se dijele na: kolagenaze, stromelizine i gelatinaze. Strukturno se mogu podijeliti na one koje se luče ekstracelularno (MMP-1 do MMP-13 i MMP-18, MMP-19 i MMP-20) i one koje su usidrene u staničnoj membrani transmembranskom domenom (MMP-14 do MMP-17). Na slici 6 prikazana je MMP obitelj.

### KOLAGENAZE

Kolagenaza-1 (MMP-1), kolagenaza-2 (MMP-8) i kolagenaza-3 (MMP-13) su glavne secerninajuće proteinaze koje započinju razgradnju nekoliko fibrilarnih kolagena, uključujući kolagen tipa I, II, III i VII. Sve tri proteinaze cijepaju fibrilarne kolagene na specifičnom mjestu što rezultira stvaranjem razgradnih produkata koji se brzo denaturiraju na temperaturi tijela u gelatin, kojeg dalje razgrađuju gelatinaze. Usprkos velikom stupnju preklapanja u specifičnosti prema supstratu, isto tako postoji značajna prevaga prema supstratu između tri tipa kolagenaza, koji se najbolje uočava u primjeru MMP-13. Ona preferira razgradnju kolagena tipa II u odnosu na tip I i III (58). MMP-13 ima i vrlo široku specifičnost prema supstratu u odnosu na ostale dvije kolagenaze. Sposobna je razgraditi kolagene tipa IV, X i XIV, tenascin i fibronektin.



MMP designation*	Structural class	Common name(s)
MMP-1	Simple hemopexin domain	Collagenase-1, interstitial collagenase, fibroblast collagenase, tissue collagenase
MMP-2	Gelatin-binding	Gelatinase A, 72-kDa gelatinase, 72-kDa type IV collagenase, neutrophil gelatinase
MMP-3	Simple hemopexin domain	Stromelysin-1, transin-1, proteoglycanase, procollagenase-activating protein
MMP-7	Minimal domain	Matrilysin, matrin, PUMP1, small uterine metalloproteinase
MMP-8	Simple hemopexin domain	Collagenase-2, neutrophil collagenase, PMN collagenase, granulocyte collagenase
MMP-9	Gelatin-binding	Gelatinase B, 92-kDa gelatinase, 92-kDa type IV collagenase
MMP-10	Simple hemopexin domain	Stromelysin-2, transin-2
MMP-11	Furin-activated and secreted	Stromelysin-3
MMP-12	Simple hemopexin domain	Metalloelastase, macrophage elastase, macrophage metalloelastase
MMP-13	Simple hemopexin domain	Collagenase-3
MMP-14	Transmembrane	MT1-MMP, MT-MMP1
MMP-15	Transmembrane	MT2-MMP, MT-MMP2
MMP-16	Transmembrane	MT3-MMP, MT-MMP3
MMP-17	GPI-linked	MT4-MMP, MT-MMP4
MMP-18	Simple hemopexin domain	Collagenase-4 ( <i>Xenopus</i> ; no human homologue known)
MMP-19	Simple hemopexin domain	RASI-1, MMP-18 <sup>†</sup>
MMP-20	Simple hemopexin domain	Enamelysin
MMP-21 <sup>‡</sup>	Vitronectin-like insert	Homologue of <i>Xenopus</i> XMMP
MMP-22	Simple hemopexin domain	CMMP (chicken; no human homologue known)
MMP-23	Type II transmembrane <sup>§</sup>	Cysteine array MMP (CA-MMP), femalysin, MIFR, MMP-21/MMP-22 <sup>¶</sup>
MMP-24	Transmembrane	MT5-MMP, MT-MMP5
MMP-25	GPI-linked	MT6-MMP, MT-MMP6, leukolysin
MMP-26	Minimal domain	Endometase, matrilysin-2
MMP-27 <sup>‡</sup>	Simple hemopexin domain	
MMP-28	Furin-activated and secreted	Epilysin
No designation	Simple hemopexin domain	Mcol-A (Mouse)
No designation	Simple hemopexin domain	Mcol-B (Mouse)
No designation	Gelatin-binding	75-kDa gelatinase (chicken)

**Slika 6. Obitelj matriksnih metaloproteinaza.** (iz: Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161–74.)

Zbog te svoje karakteristike, ekspresija MMP-13 je u fiziološkim uvjetima izrazito ograničena, i to na područja gdje je potrebna brza razgradnja i remodeliranje ECM-a, na primjer razvoj kosti fetusa i postnatalno remodeliranje kosti (59). U skladu s time, ekspresija MMP-13 javlja se i u patološkim stanjima, kao što su mjesta teške kronične upale (osteoartritis s oštećenjem hrskavice, reumatoidne promjene u sinoviji i kronični ulkusi), i mjesta invazije malignih tumora, pa je povećana ekspresija MMP-13 povezana s raznim tipovima karcinoma i sarkoma (60, 61).

### GELATINAZE

MMP-2 (ili gelatinaza A) i MMP-9 (ili gelatinaza B) u svojoj strukturi imaju inkorporirane tri ponavljajuće fibronektinske homologne regije tipa II u katalitičkoj domeni, koja je uključena u vezanje denaturiranog kolagena ili gelatina (56). Ova domena, poznata i kao gelatin-vezujuća domena, jedinstvena je za gelatinaze i stoga se ovi enzimi smatraju odvojenom grupom unutar obitelji metaloproteinaza (62). Zbog svoje specifične sposobnosti degradacije kolagena tipa IV u bazalnoj membrani, ove dvije gelatinaze zaslužile su naziv 72 kD kolagenaza IV (MMP-2) i 92 kD kolagenaza IV (MMP-9).

MMP-2 i MMP-9, slično kao i ostale metaloproteinaze, imaju relativno široku specifičnost prema supstratu. Osim što razgrađuju kolagen tipa IV i gelatin, njihova proteolitička aktivnost uključuje još i razgradnju kolagena tipa I, V i X, a MMP-2 razgrađuje još i laminin V (63). MMP-2, ali ne i MMP-9 razgrađuje kolagene tipa I, II i III (64).

Geni obje gelatinaze lokalizirani su na kromosomu 16. Promotor humane MMP-2 ima nekoliko karakteristika tzv. "housekeeping" ili konstitutivnih promotora, pa to može objasniti činjenicu da je MMP-2 je konstitutivno eksprimirana, posebno u stromalnim stanicama (65). Iako se MMP-2 nul miševi razvijaju bez vidljivih abnormalnosti (66), mutacije u ljudskom MMP-2 genu rezultiraju nestankom aktivnog enzima i povezane su s autosomno recesivnim oblikom multicentrične osteolize, rijetkim genetičkim poremećajem koji uzrokuje destrukciju i resorpciju kosti. Ovo ukazuje da je MMP-2 u ljudi važna tijekom osteogeneze (67).

Ekspresija MMP-9 je u normalnim tkivima niska ili odsutna. Normalna MMP-9 ekspresija uglavnom je ograničena na osteoklaste, makrofage, stanice trofoblasta, neurone hipokampusa, i migrirajuće keratinocite na rubovima rana koje cijele (68).

### STROMELIZINI

Ovoj skupini pripadaju: stromelizin-1 (MMP-3) stromelizin-2 (MMP-10) i stromelizin-3 (MMP-11). MMP-3 i MMP-10 uglavnom eksprimiraju normalne epitelne stanice, ali se njihova ekspresija nađe i u karcinomima. Oni mogu razgraditi široki spektar supstrata, uključujući kolagene tipa IV, V, IX i X, fibronektin, laminin, elastin, gelatin i proteoglikansku srž proteina (69). Stromelizin 1 (MMP-3) i stromelizin 2 (MMP-10) oboje imaju sličnu specifičnost prema supstratu, ali je proteolitička efikasnost MMP-3 općenito viša od MMP-10. Osim razgradnje komponenata ECM-a, MMP-3 aktivira

brojne proMMP-ove, a njezina uloga u djelomičnoj razgradnji proMMP-1 je ključna u stvaranju zrele aktivne forme MMP-1 (70).

MMP-11 koju eksprimiraju mezenhimne stanice, posebno fibroblasti, primarno razgrađuju inhibitore serinskih proteaza, uz minornu ulogu u razgradnji proteinskih komponenti ECM.

Postoje još dvije metaloproteinaze uključene u stromelizinsku grupu, premda su strukturalno donekle različite. One su MMP-7 (matrilizin) i MMP-12 (metaloelastaza makrofaga). MMP-7 je najmanji poznati član MMP obitelji kojoj nedostaje vezujuća i hemopeksinska domena i stoga ima široku specifičnost prema supstratu. MMP-12 koju eksprimiraju makrofagi i stromalne stanice, razgrađuje primarno elastin, a u manjoj mjeri i fibronektin, laminin i kolagen tipa IV (54, 69).

#### MEMBRANSKI TIP METALOPROTEINAZA (MT-MMP)

Do sada je poznato šest tipova membranskih MMP-ova: četiri člana ove skupine su tip I transmembranski proteini (MT1-MMP ili MMP-14, MT2-MMP ili MMP-15, MT3-MMP ili MMP-16 i MT5-MMP ili MMP-24), i dva proteina su putem glikozilfosfatidilinozitola (GPI) usidreni u staničnoj membrani (MT4-MMP ili MMP-17 i MT6-MMP ili MMP-25). Izuzevši MT4-MMP, svi ostali sposobni su aktivirati proMMP-2. Ovi enzimi mogu razgraditi brojne molekule ECM-a, a MT1-MMP ima kolagenolitičku aktivnost usmjerenu na kolagene tipa I, II i III, (71), a razgrađuje još i fibronektin, laminin, fibrin, gelatin. MT1-MMP u miševima tijekom postnatalnog razvoja pokazuje skeletne abnormalnosti nastale najvjerojatnije zbog nedostatka

kolagenolitičke aktivnosti (72). MT1-MMP ima određenu ulogu u angiogenezi (73). MT2-MMP (MMP-15) primarno razgrađuje fibronektin, laminin i tenascin (74). MT2-MMP zajedno s MT1-MMP aktivira proMMP-13. MT5-MMP je specifičan za mozak i većinom eksprimiran u cerebelumu (75). MT6-MMP (MMP-25) eksprimiran je gotovo u potpunosti u leukocitima periferne krvi i u određenim primarnim tumorima mozga (76).

### **1.5.3. Regulacija aktivnosti matriksnih metaloproteinaza**

Nivo konstitutivne ekspresije MMP gena je normalno nizak, a njihova indukcija podliježe različitim fiziološkim stanjima koja zahtijevaju remodeliranje ECM-a, primjerice tijekom embriogeneze, cijeljenja rana i remodeliranja kosti. Pojačana ekspresija ili aktivacija MMP-a može se vidjeti u brojnim bolestima, naročito artritisu i neoplastičnim procesima. Ekspresija MMP-a je strogo regulirana, i to na raznim nivoima, kao što i pristaje grupi enzima s ovako razornim moćima. Povrh toga, pojedini članovi MMP obitelji su posebno regulirani i njihova je ekspresija tkivno-specifična. Na taj način, regulacijski mehanizmi zbivaju se u vremenskoj i prostornoj dimenziji. Poznavanje mehanizama regulacije MMP aktivnosti važno je zbog potencijalnog liječenja temeljenog na manipulaciji regulatornih procesa, kao i zbog razumijevanja mehanizama tumorske invazije i metastaziranja.

Aktivacija metaloproteinaza kontrolirana je najmanje na tri nivoa: transkripcija, proteolitička aktivacija zimogene forme, te inhibicija aktivnog enzima prirodnim inhibitorima domaćina.

### **a) Transkripcijska regulacija**

Ekspresija većine MMP-ova (MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13, i MMP-19) inducirana je na nivou transkripcije, i to faktorima rasta, citokinima, hormonima i kontaktom s ECM-om. Mehanizam MMP indukcije razlikuje se ovisno o karakteristikama stanica i njihovoj sposobnosti stvaranja ovih enzima. Promotori inducibilnih MMP-ova sadrže AP-1 cis-element blizu početnog mjesta transkripcije. Ekstracelularni podražaji aktiviraju AP-1 komplekse, koji su heterodimeri proteina dvije protoonkogene obitelji (Fos i Jun) i udaljeni su 70 parova baza od promotorske regije svakog inducibilnog MMP gena. Aktivirani AP-1 kompleksi se vežu za AP-1-mjesto u promotoru i stimuliraju transkripciju MMP gena. Promotorske regije MMP-ova osim što se aktiviraju putem AP-1, sadrže i jedan ili više PEA3 (polyomavirus enhancer A-binding protein-3) elemenata, koje vežu transkripcijske faktore ETS (E-twenty six) obitelji i zajedno s AP-1 postižu maksimalnu aktivaciju MMP-1, MMP-3 i MMP-9 promotora. Transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B ima središnju ulogu u ekspresiji MMP-9 u fibroblastima i vaskularnim glatkomišićnim stanicama (77).

Promotor MMP-2 gena uglavnom ne reagira na stimulaciju u staničnim kulturama i ne samo da mu nedostaju susjedni AP-1 i PEA3 elementi, nego nema niti TATA box-a (to je DNA sekvenca koja se nalazi u promotorskoj regiji u približno 24 % ljudskih gena i mjesto je vezanja transkripcijskih faktora ili histona). Indukcija ekspresije AP-1 kompleksa posredovana je MAP kinazama (mitogen-activated protein kinases – MAPK), koje pak mogu

aktivirati citokini (TNF, IL-1), celularni stres (UV zračenje), čime se inducira transkripcija. TGF- $\beta$  ili retinoidi općenito ograničavaju MMP transkripciju.

### ***b) Proteolitička aktivacija zimogene forme***

Matriksne metaloproteinaze sintetiziraju se kao inaktivni zimogeni (proMMP). Inaktivni oblik svih matriksnih metaloproteinaza rezultat je formiranja intramolekularnog kompleksa između cisteinskog ostatka u propeptidnoj domeni (prodomeni) i glavnog cinkovog iona u katalitičkoj domeni. Taj kompleks blokira aktivno mjesto. Aktivacija latentnog oblika MMP-a nastaje disocijacijom cisteinskog ostatka u prodomeni. Taj se mehanizam aktivacije naziva “cisteinska sklopka” (engl. cysteine switch) koju je prvi 1990. godine opisao Harold E. Van Wart (53, 54, 78). Prodomena se uklanja kombinacijom cijepanja unutar same prodomene ili između prodomene i katalitičke domene. Prodomena sadrži “konsenzus” sekvencu i potrebno je proteolitičko cijepanje konvertazom, koje se ovisno o sekvenci, zbiva intracelularno, gdje djeluje furinska proteaza, ili ekstracelularno gdje djeluju ostale metaloproteinaze ili serinske proteaze, kao što je plazmin (47). Membranski tip MMP-ova zbog svoje transmembranske domene aktivira se intracelularno, prije transporta na površinu stanice (79).

Većinu MMP-ova aktiviraju ostale metaloproteinaze ili serinske proteaze izvan stanice. Međutim, MMP-11, MMP-28 i MT-MMP mogu biti aktivirane i intracelularno furinskom proteazom, i to prije nego se nađu na staničnoj površini (47, 80).

Aktivacija proMMP-2 je detaljno istražena, jer je vrlo specifična. Prvi su je opisali Strongin i sur. 1995. godine (81). Odvija se na površini endotelnih stanica, fibroblasta i tumorskih stanica, gdje MMP-2 stvara tromolekularni kompleks s TIMP-om 2 i MT1-MMP (MMP-14). I premda je TIMP-2 inhibitor metaloproteinaza, paradoksalno u ovom mehanizmu funkcionira kao ko-aktivator proMMP-2 (82). TIMP-2 veže MMP-14 na svom amino kraju i pro-MMP-2 na svom karboksilnom kraju, što dopušta susjednom, neinhibiranom MMP-14 cijepanje vezanog proMMP-2. MMP-14 ne aktivira u potpunosti MMP-2, nego je druga, već aktivirana molekula MMP-2 potrebna za cijepanje ostatnog dijela MMP-2 propeptida (83). MT1-MMP aktivira proMMP-2 i onda aktivna zrela forma MMP-2 aktivira proMMP-9. Pro-MMP-2 može aktivirati i MT2-MMP i to direktno, neovisno o TIMP-2 (42).

Aktivacija proMMP-9 plazminom je značajan način aktivacije in vivo. Plazmin nastaje iz plazminogena tkivnim aktivatorom plazminogena koji je vezan za fibrin i urokinaznim aktivatorom plazminogena vezanim za specifični stanični receptor. I plazminogeni i urokinazni plazminogeni aktivatori su vezani uz membranu i na taj način lokaliziraju proMMP-9 aktivaciju i razgradnju okolnog ECM-a. Plazmin aktivira i proMMP-1, pro-MMP-3, proMMP-7, proMMP-10 i proMMP-13 (84). Aktivirani MMP-ovi sudjeluju u daljnjoj aktivaciji ostalih MMP-ova.

### ***c) Inhibicija aktivnog enzima prirodnim inhibitorima domaćina***

Jednom aktivirane, MMP mogu se inhibirati općim inhibitorima proteaza, kao što je alfa-2 makroglobulin, ili grupom specifičnih inhibitora poznatih



kao tkivni inhibitori metaloproteinaza ili TIMP. TIMP-ovi su endogeni specifični inhibitori koji se vežu za MMP-ove u omjeru 1:1.

Otkriveno je četiri člana TIMP obitelji: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4. U patološkim uvjetima povezanim s disbalansom MMP aktivnosti, promjene nivoa TIMP-ova smatraju se važnim, jer direktno utječu na nivo MMP aktivnosti. TIMP-1 i TIMP-2 inhibiraju aktivnost većine MMP-ova. Kao što TIMP-2 formira kompleks s proMMP-2, tako TIMP-1 može formirati kompleks s proMMP-9. TIMP-3 inhibira proteolitičku aktivnost MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 i MMP-13. TIMP-4 inhibira aktivnost MMP-2 i MMP-7 i u manjoj mjeri MMP-1, MMP-3 i MMP-9. TIMP-ove stvaraju različite stanice koje uključuju keratinocite, fibroblaste, osteoblaste i endotelne stanice (51, 85). Aktivnost MMP-2 najefektivnije se inhibira s TIMP-om 2 (69).

U procesu tumorskog rasta i metastaziranja narušena je ravnoteža između MMP-ova i TIMP-ova, u korist izrazite aktivacije i ekspresije MMP-ova, što omogućuje disrupciju normalne strukture tkiva, olakšava invaziju u okolne strukture, krvne i limfne žile, te se tako promovira širenje tumora (86).

Dok se većina MMP-ova sintetizira *de novo*, MMP-8 i MMP-9 pohranjeni su u obliku sekretornih granula u neutrofilima i eozinofilima (87), a MMP-7 pohranjena je u sekretornim epitelnim stanicama kože, probavnog i dišnog sustava.

Funkcija metaloproteinaza može biti pod utjecajem reaktivnih oksidansa koje stvaraju aktivirani neutrofil i makrofagi tijekom upalnog odgovora na tumor.

Nekoliko metaloproteinaza je u međusobnoj interakciji s receptorima na staničnoj površini kao što su integrini ili se lokaliziraju u specifičnim područjima ekstracelularnog matriksa, koji potencira metaloproteinaznu aktivnost na način da povećava lokalnu koncentraciju i interferira s endogenim inhibitorima.

## **MMP supstrati**

Povijesno gledano, funkcija MMP-a je razgradnja strukturnih komponenata ECM-a i na taj način olakšavanje stanične migracije. Međutim, stoga što stanice imaju receptore za strukturne komponente ECM-a (na primjer integrine), razgradnja proteina ECM-a putem MMP-ova utječe na stanično signaliranje i funkcije (88). Cijepanje matriksnih molekula putem MMP-ova generira i fragmente s novim funkcijama: cijepanje laminina V i kolagena tipa IV rezultira izlaganjem kriptičkih mjesta koji promoviraju migraciju stanica (63, 89). Nadalje, razgradnja IGF-BP (insulin-like growth-factor-binding protein) oslobađa IGF, a razgradnja perlekana oslobađa FGF (90, 91, 92).

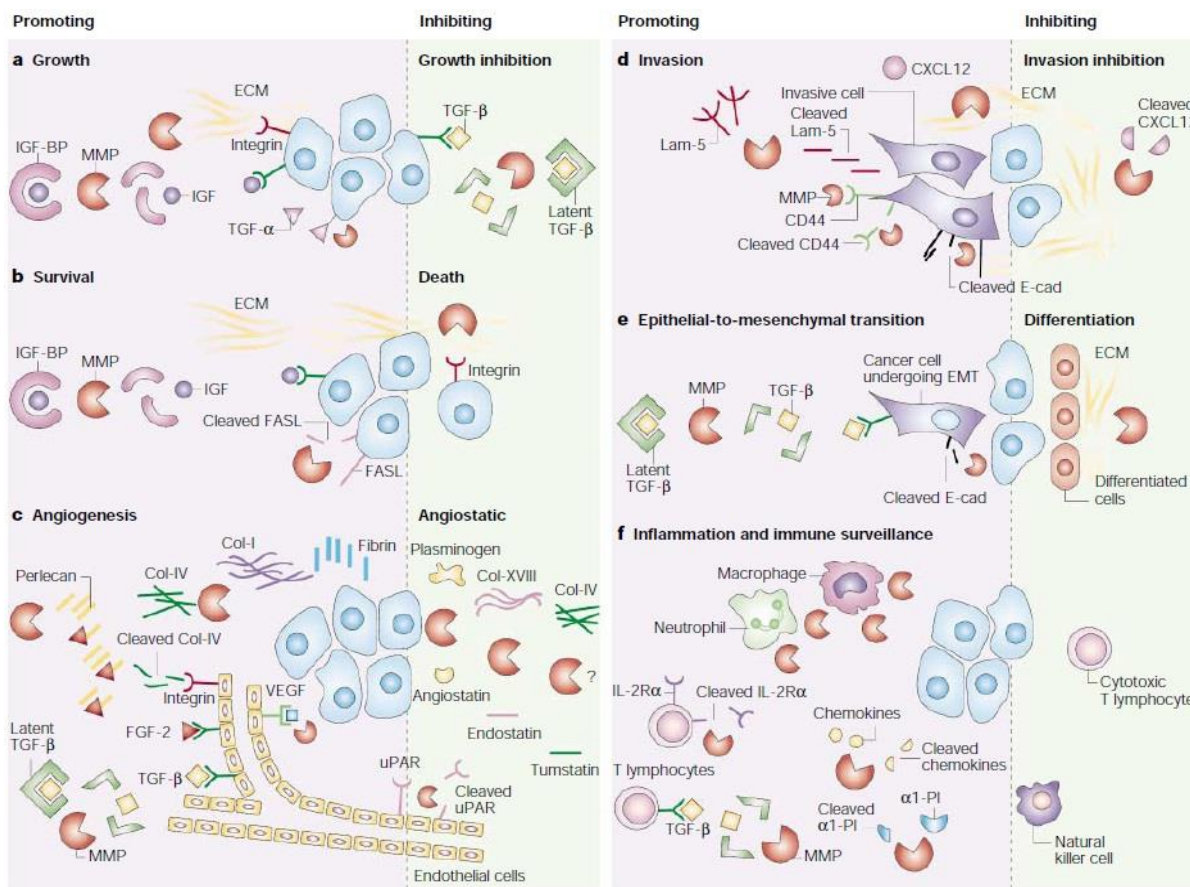
Metaloproteinaze i njihove srodne proteinaze (ADAMS - a disintegrin and metalloproteinases), sudjeluju u oslobađanju prekursorskih formi mnogih

faktora rasta vezanih za stanične membrane, uključujući TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ). Biološka dostupnost TGF- $\beta$  regulirana je na drukčiji način: oslobađa se cijepanjem putem MMP-2 i MMP-9 iz inaktivnog ekstracelularnog kompleksa. Receptori za faktore rasta su isto supstrati MMP molekula. MMP-2 razgrađuje FGF receptor 1, dok dva člana iz obitelji receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) - HER2/neu (ERBB2) i HER4 (ERBB4) su supstrati za još neidentificirane MMP-ove. U svim slučajevima, oslobađaju se ekstracelularne domene receptora, koje mogu služiti kao “receptori mamci” za navedene ligande. Stanične adhezijske molekule su isto supstrati za MMP-ove. Cijepanje E-kadherina rezultira oslobađanjem fragmenata ekstracelularnih domena i tako se pojačava invazivnost stanica, a cijepanje prekursora podjedinice  $\alpha$ v integrina putem MMP-14 pojačava migraciju tumorskih stanica. I konačno, MMP-ovi cijepaju i aktiviraju sami svoje zimogene forme molekula, i razgrađuju ostale MMP-ove i inhibitore proteinaza, kao što je serpin (47, 93).

#### **1.5.4. Uloga matriksnih metaloproteinaza u tumorskoj progresiji**

Šest je osnovnih promjena u staničnoj fiziologiji koje stoje u podlozi tumorske progresije: samodostatnost u rastu, neosjetljivost na inhibitorne signale rasta, izbjegavanje apoptoze, neograničeno umnažanje, kontinuirana angiogeneza i tkivna invazije i metastaziranje (43). U početku se smatralo da

su MMP važne samo u procesu invazije i metastaziranja. Međutim, studije su pokazale da su MMP uključene u nekoliko koraka u razvoju tumora (slika 7.)



**Slika 7. Uloga MMP-a u tumorskoj progresiji.** MMP imaju protumorske i antitumorske funkcije, a putevi ovih suprotnih funkcija su ponekad inicirani cijepanjem istog supstrata. **a)** MMP promoviraju rast tumorskih stanica cijepanjem IGF-BP i oslobađanjem IGF-a; cijepanjem transmembranskih prekursora faktora rasta, uključujući TGF- $\alpha$ ; regulirajući ECM, koji promovira rast indirektno preko interakcija između molekula ECM-a i integrina. MMP mogu inhibirati tumorski rast oslobađajući TGF- $\beta$  iz latentnog TGF- $\beta$  kompleksa. **b)** MMP promoviraju preživljenje tumorskih stanica oslobađajući IGF i cijepanjem FAS liganda. MMP promoviraju apoptozu, vjerojatno indirektno mijenjajući sastav ECM-a, koji utječe na integrinsko signaliranje. **c)** MMP promoviraju angiogenezu povećavajući biodostupnost proangiogenih faktora rasta (VEGF), fibroblastnog faktora rasta (FGF-2) i transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- $\beta$ ). Ovi faktori stimuliraju proliferaciju i migraciju endotelnih stanica. FGF-2 se oslobađa cijepanjem perlekana. MMP promoviraju invaziju endotelnih stanica cijepajući

strukturne komponente ECM-a, kao što su kolagen tipa I i III i fibrin. Razgrađeni kolagen funkcionira kao proangiogena molekula, vežući se za  $\alpha\beta 3$  integrin. MMP djeluju angiogeno cijepanjem plazminogena i kolagena tipa XVIII, čime se stvaraju antiangiogeni faktori – angiostatin i endostatin, a cijepanjem kolagena tipa IV stvara se tumstatin. Cijepanjem receptora za urokinazni plazminogeni aktivator (uPAR) na površini endotelne stanice inhibira se angiogeneza, jer je uPAR potreban na invaziju endotelne stanice *in vitro*. **d)** MMP promoviraju invaziju razgradnjom strukturnih elemenata ECM, cijepanjem laminina V; cijepanjem adhezijskih molekula CD44 i E-kadherina. Oslobođeni dio molekule E-kadherina se zatim veže i inhibira funkciju ostalih nerazgrađenih E-kadherinskih molekula. Vežanje MMP-9 za molekule CD44 potrebno je za invaziju tumorskih stanica. MMP možda može inhibirati metastaziranje cijepanjem CXCL12, kemokina iz CXC obitelji koji promovira metastaziranje karcinoma dojke. **e)** MMP promoviraju epitelno-mezenhimnu tranziciju (EMT), koja je povezana s malignim ponašanjem, cijepanjem E-kadherina i oslobađanjem TGF- $\beta$ . MMP utječe na diferencijaciju. Na primjer, tumori u MMP-9 nul miševima su slabije diferencirani nego oni u divljem tipu miševa. Mehanizam nije poznat. **f)** Reaktivne upalne stanice stvaraju neke od ključnih molekula MMP-a uključenih u tumorsku progresiju, ali MMP-ovi mogu inhibirati imunološke reakcije na tumorske stanice. MMP-ovi cijepaju receptor za interleukin-2 (IL-2) na T-limfocitima, inhibirajući tako proliferaciju T limfocita; oslobađaju TGF- $\beta$ , važan supresor T staničnih reakcija na tumorske stanice; razgrađuju alfa 1-proteinski inhibitor ( $\alpha 1$ -PI), čime se smanjuje osjetljivost NK stanica na tumor; cijepaju različite članove CC I CXC obitelji kemokina, čime oni više ne privlače leukocite. (iz: Egeblad M, Werb Z. *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer 2002;2:161–74.*)

Zbog svoje važne uloge u tkivnom remodeliranju i tumorskoj progresiji, MMP-2 i MMP-9 su izrazito ekstenzivno istraživane. MMP-2 je najšire distribuiran enzim čitave obitelji matriksnih metaloproteinaza i prvi puta je opisan kao enzim koji razgrađuje kolagen bazalne membrane metastatskog mišjeg tumora (94). MMP-2 eksprimiraju fibroblasti, keratinociti, epitelne stanice i osteoblasti (95). MMP-2 razgrađuje kolagen tipa IV koji gradi

bazalne membrane i stoga aktivnost ove metaloproteinaze korelira s invazijom i metastatskim kapacitetom u kulturi tumorskih stanica (96).









Dokazano je kako tumorska tkiva s izraženom ekspresijom aktivne MMP-2 imaju veći rizik za nastanak metastaza. Omjer između proMMP-2 i aktivnog oblika MMP-2 može se upotrijebiti kao indikator metastaziranja.

MMP-2 ekspresija povezana je s invazivnošću u nekoliko humanih neoplazmi, uključujući karcinome dojke (97), debelog crijeva (98), jajnika (99), pluća (100) i urotela (101). MMP-2 protein lokaliziran je imunohistokemijski u tumorskim stanicama što ukazuje na njegovu ulogu u određivanju invazivnog potencijala i metastatskog kapaciteta neoplastične lezije (96, 102, 103).

U karcinomima dojke nađena je ekspresija MMP-2 u mioepitelnim stanicama normalne dojke, izrazito snažna ekspresija MMP-2 u tumorskim stanicama primarnog karcinoma dojke, ali i u tumorskim stanicama unutar metastatskih limfnih čvorova, pa je zaključeno da MMP-2 ima ulogu u tumorskoj invaziji i metastaziranju, ali sugerirajući da su tumorske stanice glavni izvor enzima (102).

MMP-2 stvaraju tumorske, ali i stromalne stanice, koje predstavljaju bilo koje ne-maligne stanice tumorskog mikrookoliša, uključujući fibroblaste, miofibroblaste, pericite i vaskularne glatkomišićne stanice, mikrovaskularne endotelne stanice i upalne stanice (slika 8).

Stromalne stanice doprinose tumorskom fenotipu na brojne načine, a dokazi dolaze iz prekliničkih studija na mišjim modelima, gdje su MMP ili pretjerano eksprimirane ili suprimirane (104).

	<p><b>Neutrophils</b></p> <p><b>Proteases</b> MMP-8, -9 ADAM-8, -17 ADAMTS-1</p> <p><b>Inhibitors</b> TIMP-1</p>		<p><b>Macrophages</b></p> <p><b>Proteases</b> MMP-1, -2, -7, -9, -12, -14 ADAM-9, -15, -17 ADAMTS-4</p> <p><b>Inhibitors</b> TIMP-1, -2, -3</p>
	<p><b>Lymphocytes</b></p> <p><b>Proteases</b> MMP-3, -9 ADAM-17, -28</p> <p><b>Inhibitors</b> TIMP-1</p>		<p><b>Mast cells</b></p> <p><b>Proteases</b> MMP-2, -9 Chymase Tryptase</p> <p><b>Inhibitors</b> TIMP-1</p>
	<p><b>Endothelial cells</b></p> <p><b>Proteases</b> MMP-2, -3, -7, -14, -19 ADAM-15, -17</p> <p><b>Inhibitors</b> TIMP-1, -2</p>		<p><b>Fibroblast</b></p> <p><b>Proteases</b> MMP-1, -2, -3, -9, -11, -13, -14, -19 ADAMTS-5</p> <p><b>Inhibitors</b> TIMP-1, -2, -3</p>
	<p><b>Dendritic cells</b></p> <p><b>Proteases</b> MMP-1, -2, -3, -9, -19</p> <p><b>Inhibitors</b> TIMP-1, -2</p>		<p><b>Hematopoietic progenitor cells</b></p> <p><b>Proteases</b> MMP-2, -9, -14</p> <p><b>Inhibitors</b> TIMP-1, -2</p>

**Slika 8. Ekspresija MMP-ova i njihovi fiziološki inhibitori u ne-malignim stromalnim stanicama:** upalne stanice (neutrofili, makrofagi, dendritičke stanice, limfociti, mastociti), endotelne stanice, fibroblasti i hematopoetske progenitorske stanice. Ove stanice otpuštaju MMP-ove u ekstracelularni prostor i utječu na brojne puteve u tumorskoj progresiji. Prikazani su primjeri proteinaza i njihovih endogenih inhibitora koje eksprimiraju

stromalne stanice. (iz: Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. *Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment*. Cell 2010;141:52-67.)

Obje gelatinaze su jače eksprimirane u malignim tkivima u usporedbi s benignim tkivima (93, 104). Isto tako, primijećena je pojačana ekspresija ili visoke razine serumskih vrijednosti MMP-2 i MMP-9 vezane uz neponovoljnu prognozu u mnogim karcinomima, pa tako i karcinomu dojke (97), prostate (105), melanomu (103), i karcinomu pluća (106). Istraženi su i dokazani suprotni rezultati, gdje nije nađena korelacija MMP-2 s prognozom u uznapredovalom stadiju melanoma (107) ili MMP-9 u nekim od gore navedenih karcinoma.

**MMP reguliraju tumorski rast.** Proliferacija tumorskih stanica smanjena je u tumorima MMP-9 nul miševa u usporedbi s divljim tipom miševa, što upućuje na to da MMP-ovi stvaraju signale koji promoviraju rast tumorskih stanica. Nadalje, MMP oslobađaju prekursore nekih faktora rasta vezane za stanične membrane, npr. TGF- $\alpha$ . MMP cijepaju faktore rasta koje postaju biodostupni, npr. molekule IGF-a se oslobađaju kad MMP razgrade protein koji ih vezuje (IGF-BP). Zatim, MMP-ovi preko integrina indirektno reguliraju proliferacijske signale. MMP mogu i negativno regulirati rast tumorskih stanica, preko aktivacije TGF- $\beta$ .

**MMP reguliraju apoptozu.** Izbjegavanje apoptoze dopušta preživljenje u prisutnosti genske nestabilnosti, niske razine kisika i nutrijenata, napada imunološkog sustava i liječenja. MMP imaju i proapoptotičke i antiapoptotičke funkcije. MMP-3 inducira apoptozu kad je previše eksprimiran u epitelnim stanicama dojke, vjerojatno razgradnjom laminina.



MMP-7 oslobađa membranski vezani FAS ligand (FASL), transmembranski stimulator FAS receptora. Oslobođeni FASL inducira apoptozu susjednih stanica (108) ili smanjuje apoptozu tumorskih stanica, ovisno o sustavu (109). Osim toga, MMP-7 inhibira apoptozu cijepanjem pro-HB-EGF (pro-heparin-binding epidermal growth factor) iz kojeg nastaje zreli oblik HB-EGF, koji promovira stanično preživljenje tako da stimulira ERBB4 (HER4) tirozni kinazni receptor (110).

#### **1.5.4. Uloga matriksnih metaloproteinaza u angiogenezi**

Angiogeneza je uključena u ranu fazu tumorske progresije, ali je prisutna i u fazi rasta tumora, njegove invazije i metastaziranja. Regulacija angiogeneze vezana je uz specifične angiogene faktore i njihove receptore.

Predominantni angiogeni faktor je vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), glikoprotein koji stimulira mitozu i migraciju endotelnih stanica. Kada tumor dosegne veličinu 1 do 3 mm dolazi do pojačane ekspresije VEGF-A, koji se onda veže za svoje receptore VEGFR1 i VEGFR2/KDR na površini endotelne stanice (111).

Indukcija angiogeneze zbiva se u brojnim fiziološkim i patološkim stanjima, kao što su rast i razvoj, upala, cijeljenje i tumorski rast, a kao odgovor na hipoksiju i manjak nutrijenata u tkivu (112). Proces kreće kao pojačano stvaranje proangiogenih faktora koji su u suvišku u odnosu na antiangiogene. To rezultira nastankom mikrovaskularnih tumorskih žilnih

prostora koji su vrlo slabo organizirani. Tumorska vaskulatura stvara se na više načina. Jedna od njih je pupanje endotelnih stanica iz postojećih krvnih žila koji se naziva *angiogeneza*, a drugi je stvaranje novih žila iz cirkulirajućih vaskulogenih progenitorskih stanica podrijetla koštane srži, što se naziva *vaskulogeneza*. Novostvorene žile često su iregularne i propusne zbog manjka pericitnog omotača što olakšava penetraciju tumorskih stanica. U usporedbi s krvnim kapilarama, limfatične endotelne stanice imaju još slabije razvijene međusobne veze sa širokim interendotelnim pukotinama i oštećenom bazalnom membranom (113, 114).

Tumorska angiogeneza nastala pupanjem krvnih žila iz prethodno postojećih je invazivan proces i stoga zahtjeva proteolitičku aktivnost (93). Proteolizom se razgrađuju bazalne membrane žila i omogućava se invazija endotelnih stanica u tkivo. Osim toga, proteolitička aktivnost neophodna je za migraciju endotelnih stanica kroz ekstracelularni matriks i omogućava stvaranje novih prostora u matriksu za proliferirajuće tubule endotelnih stanica (112).

Invazivni rub malignog tumora kritično je područje za stimulaciju angiogeneze i limfangiogeneze, što doprinosi tumorskoj invaziji i metastaziranju (115).

Poznato je da MMP imaju značajnu ulogu u angiogenim i limfangiogenim procesima. Glavne MMP uključene u tumorsku angiogenezu su MMP-2, MMP-9 i MMP-14 (116, 117, 118).

Supresija MMP-2 ekspresije u tumorskim stanicama smanjuje angiogenezu u modelu korioalantoične membrane kokoši (119). Isto tako, tumorska

angiogeneza i rast je reduciran kod MMP-2 nul miševa u usporedbi s divljim tipom miša (120).

MMP-9 ima određenu i značajnu ulogu u tumorskoj angiogenezi uglavnom kroz regulaciju dostupnosti vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), koji je najmoćniji induktor tumorske angiogeneze. Nekoliko MMP-ova odgovorno je za cijepanje matriks-vezanih izoformi VEGF-a i oslobađanjem njihovih solubilnih fragmenata. Ovo direktno cijepanje omogućava, između ostalih metaloproteinaza, i MMP-9. Na ovaj način mijenja se obrazac vaskularizacije u tumorima, tako da VEGF oslobođen djelovanjem matriksne metaloproteinaze-9 utječe na kapilarnu dilataciju postojećih žila i rubnu neovaskularizaciju unutar tumora, a za razliku od toga, VEGF otporan na aktivnost iste metaloproteinaze izaziva snažan rast granajućih žila (121).

Osim proangiogene, MMP-ovi mogu iskazati i biološki suprotnu antiangiogenu aktivnost. Razgradnjom proteina ekstracelularnog matriksa stvaraju se biološki aktivne tvari koje inhibiraju angiogenezu. Na primjer, cijepanjem kolagena tipa XVIII metaloproteinazom -3, -7, -9 i -20 stvara se biološki aktivan endostatin koji je poznati antiangiogeni faktor. Razgradnja kolagena tipa IV matriksnom metaloproteinazom-9 rezultira stvaranjem tumstatina, snažnog supresora angiogeneze, što je dokazano na mišjem modelu (122).

Matriksne metaloproteinaze -2 i -9 mogu razgraditi plazminogen, a kao rezultat toga cijepanja stvaraju se značajne količine angiostatina koji ima antiangiogenu funkciju (123).

**Limfangiogeneza** ima značajnu ulogu u tumorskoj biologiji, s obzirom da je izravno povezana sa stvaranjem limfatičnih metastaza.

Dok je uloga MMP-ova u angiogenezi donekle definirana, podaci o njihovoj ulozi u limfangiogenezi su vrlo različiti. Iz istraživanja iz 2002. godine zaključilo se da limfatične endotelne stanice ne eksprimiraju MMP-ove (124). Ipak, Nakamura je 2004. godine uspio dokazati da limfatične endotelne stanice izolirane iz limfangioma eksprimiraju MMP-2 i MMP-9, i da stvaranje “cijevi” limfatičnih endotelnih stanica mogu inhibirati sintetički MMP inhibitori (126).

Istraživanje Rutkowskog i suradnika 2006. godine pokazalo je da MMP-9 koja je važna u tumorskoj angiogenezi, nema utjecaja na tumorsku limfangiogenezu u koži (125). Uglavnom, čini se da je uloga MMP-a u limfangiogenom procesu minorna, iako MMP imaju općeniti utjecaj na limfangiogenezu, što je potvrđeno upotrebom brojnih MMP inhibitora. Stoga su podaci o utjecaju metaloproteinaza na limfangiogenezu različiti, vjerojatno dijelom zbog varijacija u porijeklu limfatičnih endotelnih stanica, kao i zbog različitih eksperimentalnih modela, pa su svakako potrebna daljnja istraživanja u ovom području.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Utvrditi način ekspresije MMP-2 i MMP-9 u karcinomu dojke, u tumorskim i stromalnim stanicama.
2. Istražiti ekspresiju MMP-2 i MMP-9 u primarnim karcinomima dojke koji u trenutku dijagnoze nisu metastazirali, zatim onima koji su metastazirali limfogeno u regionalne aksilarne limfne čvorove, hematogeno u kosti, kao i na recidivnim tumorima.
3. Ispitati ekspresiju angiogenih i limfangiogenih faktora, VEGF-A i VEGF-C, zatim gustoću krvnih, te limfnih žila.
4. Usporediti vrijednosti navedenih metaloproteinaza s:
  - kliničko-patološkim karakteristikama koji imaju
    - prognostički značaj: veličina tumora, histološki i nuklearni gradus, status aksilarnih limfnih čvorova;
    - prediktivni značaj: ER, PR, HER2 i Ki-67.
  - ekspresijom VEGF-A, VEGF-C, te gustoćom krvnih i limfnih žila.
5. Usporediti ekspresiju navedenih metaloproteinaza između definiranih skupina bolesnica koje imaju nemetastatsku, metastatsku (s limfogenim i hematogenim rasapom), odnosno recidivnu bolest, kao i njihov utjecaj na sveukupno preživljenje.

### **3. MATERIЈAL I METODE**

### **3.1. Bolesnice i uzorci tumora**

U svrhu ovog retrospektivnog istraživanja korišteni su klinički podaci bolesnica s karcinomom dojke dijagnosticiranih u razdoblju od 1995. do 2007. godine, prikupljeni iz medicinske dokumentacije Klinike za kirurgiju i Klinike za onkologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka, patohistološki podaci prikupljeni iz računalne baze podataka Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, te arhivski bioptički materijal uzoraka karcinoma dojke. Dostupni podaci o dužini preživljenja ispitanica dobiveni su iz Zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije.

Istraživanje je obuhvatilo 76 žena s karcinomom dojke u dobi od 31 do 86 godina, odnosno 117 uzoraka tumorskog tkiva karcinoma dojke i to: 63 uzorka tkiva primarnih tumora i 54 tkivnih uzoraka recidiva u grudnoj stijenci. Skupina primarnih tumora podijeljena je na tri podskupine, i to 25 primarnih tumora bez metastaza, 38 primarnih tumora s aksilarnim nodalnim metastazama i 16 primarnih tumora s koštanim metastazama.

Tkivne uzorke ponovno su pregledala dva neovisna patologa (D.F.Č. i E.M.) zbog potvrde malignog tkiva u svim bioptičkim uzorcima. Primarni tumori su klasificirani prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (5) i ponovno im je procijenjen stupanj diferencijacije.

Za podatke koji se odnose na veličinu tumora (potrebnih zbog određivanja pT), broj metastatskih limfnih čvorova aksile (za određivanje pN) i za podatke o HER2 statusu korištena je baza podataka Zavoda za patologiju. Podaci o



postojanju koštanih metastaza prikupljeni su iz dokumentacije Klinike za onkologiju KBC Rijeka, zbog uzorkovanja njihovih primarnih tumora.

Uzorci tumorskih tkiva analizirani su upotrebom tehnologije tkivnih mikroareja.

### **3.2. Tehnologija tkivnih mikroareja (TMA)**

Tehnologija tkivnih mikroareja uključuje „iglene biopsije„ tkiva uklopljenih u parafin i njihovo ponovno uklapanje u nove parafinske blokove, pa to na neki način predstavlja biopsiju biopsije. Konstrukcija multiplih tkivnih areja moguća je sa svježim i sa smrznutim tkivima.

Tehnologija tkivnih mikroareja je relativno nova metoda koja se koristi za tkivnu analizu, posebno tumorskih uzoraka. TMA omogućuje upotrebu arhivskog u formalinu fiksiranog i u parafinu uklopljenog tkiva. Poznato je da mnogi proteini imaju održanu antigeničnost kroz više od 60 godina. Glavna prepreka širokog prihvaćanja TMA je reducirana količina analiziranog tkiva, koji u promjeru iznosi 0.1 mm – 2 mm. U pojedinačnom mikroareju može se rasporediti i do 1000 cilindričnih tkivnih biopsija. TMA rezovi omogućavaju analizu DNK, RNK i proteina, kao i analizu stotina molekularnih markera na jednom jedinom TMA rezu. Primjena TMA tehnologije najčešće se primjenjuje za istraživanje malignih tumora, kao što je analiza učestalosti molekularnih alteracija, tumorska progresija, identifikacija prognostičkih i prediktivnih faktora i procjena novo otkrivenih gena u smislu dijagnostičkih i terapijskih ciljeva. TMA pomaže u

molekularnoj klasifikaciji tumora, omogućava bržu i lakšu usporedbu metoda testiranja i međulaboratorijske reproducibilnosti (127).

### **3.2.2. TMA tehnike**

Postoje dva tipa TMA tehnike, automatizirana i ručna. Automatizirana metoda omogućava obilježavanje, uređivanje i pohranjivanje punkcijskih koordinata koristeći se posebnim software-om i vizualizacijom pod povećalom ili stereomikroskopom na ekranu. Automatizirana u odnosu na ručnu metodu je do sedam puta brža.

Ručna metoda uključuje preklapanje histološkog preparata na staklu s parafinskom kockom i obilježavanje područja interesa ručno.

Konstrukcija TMA radi se u nekoliko koraka:

1. U formalinu fiksirana i u parafinu uklopljena tkiva režu se rutinski na rezove debljine 3-5 mikrona i oboje se hemalaun-eozinom.
2. Na svjetlosnom mikroskopu odredi se reprezentativno područje tumora, koje se označi na staklu i na tzv. „donorskoj“ kocki.
3. U označenim područjima parafinske kocke iglenom biopsijom izvade se tkivni cilindri.
4. Tkivni cilindri prebacuju se u tzv. „recipijentsku“ (ili primateljsku) kocku.

5. Recipijentska kocka se zagrijava da bi se cilindri s donorske kocke povezali i uklopili u novu kocku i narezali za daljnje imunohistokemijske analize.

Značajan problem predstavlja ograničena količina tkiva za analizu, stoga tehnika potenijalno nije reprezentativna za antigensku ekspresiju u cijelom tumoru. Zato se procjenjuje adekvatan broj tkivnih uzoraka (TMA) potreban za ekspresiju zajedničkih antigena u istim tumorima. To je bitno za procjeniti, posebno za polimorfne – heterogene tumore.

#### Upotreba TMA u ovom istraživanju

Tkivni uzorci karcinoma dojke ispitivani su na tkivnim mikroarejima. Na taj način je omogućena komparativna simultana imunohistokemijska analiza velikog broja sitnih uzoraka tkiva, čime se štedi bioptički materijal i smanjuju troškovi istraživanja.

Parafinski blokovi izrađeni su korištenjem ručnog uređaja za izradu tkivnih mikroareja “Alphelys, Plaisir, France”. Za svaki uzorak tumorskog tkiva uzeta su po 3 cilindra promjera 2 mm. Time su stvorene tkivne mikroareje koje su sadržavale ukupno 378 cilindara. Cilindri su bili umetnuti u smjeru x i y koordinatnih osi, a normalno jetreno tkivo služilo je kao orijentacijski mikroarej. Tako je pripremljeno ukupno 8 TMA parafinskih kocaka koji su sadržavale su između 27 i 54 mikroareja.

### **3.3. Imunohistokemijski postupci bojanja**

#### Opći protokol

Za imunohistokemijsku analizu iz TMA parafinskih kocki narezani su tkivni rezovi debljine 3 do 4 mikrona, a zbog boljeg prianjanja montirani su na silanizirana stakla (HistoBond, Marienfeld, Njemačka) i stavljeni u sušionik preko noći na temperaturi od 55°C. Rezovi su nakon toga deparafinizirani ksilolom (Tissue Clear, Sakura, UK) i rehidrirani u apsolutnom etilnom alkoholu 99.91% dva puta po 5 minuta, zatim u 96%-tnom alkoholu 5 minuta, i u 70%-tnom alkoholu 5 minuta, nakon čega su uzorci tkiva isprani u destiliranoj vodi i ostavljeni da se suše tijekom 10 minuta.

#### Metode otkrivanja antigena

Za otkrivanje antigenskih epitopa molekula primijenjen je toplinom inducirani pretretman. MMP-2 stakla se uranjaju u Tris/EDTA pufer, pH 9 i zagrijavaju u mikrovalnoj pećnici 10 minuta na 800 W i 15 minuta na 450 W, nakon čega slijedi hlađenje na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta. MMP-9 stakla nisu pretretirana, jer je bojanje uspijevalo bez pretretmana.

VEGF-A, VEGF-C, ER, PR, Ki-67, CD31 i D2-40 su imali isti pretretman. Stakla su im uronjena u Tris/EDTA, pH 9 pufer, koji je zagrijan na 98°C u vodenoj kupelji tijekom 15 minuta. Nakon toga slijedi hlađenje na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta.

## Imunohistokemijsko bojanje specifičnim protutijelima

1. Postupak imunohistokemije za MMP-2, MMP-9, ER, PR, CD31, D2-40 i Ki-67:

Nakon deparafinizacije i razotkrivanja antigena, postupak imunohistokemijskog bojanja radi se u automatskom imunobojaču (Dako Autostainer Plus, DakoCytomation Colorado Inc, Fort Collins, CO, SAD), gdje se stakla najprije nakapavaju s primarnim antitijelima u trajanju od 60 minuta (MMP-2 i MMP-9) i 30 minuta (ER, PR, CD31, D2-40 i Ki-67).

Protutijelo za MMP-2 i MMP-9 prepoznaje C-terminalnu regiju zrele odnosno aktivne forme MMP molekule, koja se sastoji od 132 aminokiseline u MMP-2 molekuli i od 134 aminokiseline u MMP-9 molekuli.

Sva protutijela razrijeđuju se s Antibody diluentom S0809 (Dako). Karakteristike i razrijeđenja svih protutijela prikazana su u tablici 1. Nakon ispiranja puferom (Dako Wash Buffer) slijedi inkubacija s Peroxidase Blocking Solution S2023 (Dako) tijekom 6 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se blokirala endogena peroksidaza, te se stakla potom isperu 2 puta u puferu za ispiranje (Dako Wash Buffer) koji se prethodno razrijedi s destiliranom vodom u omjeru 1:10. Nakon toga slijedi primjena vizualizacijskog sistema DakoREAL™ EnVision™ Detection System, Rabbit/Mouse (30 minuta), uz korištenje DAB-a kao kromogena (DakoREAL™ DAB+ Chromogen, sadržan u EnVision™ kitu) i nakon otprilike 10 minuta dolazi do promjene boje. Stakla se potom isperu u destiliranoj vodi.

Nakon primjene vizualizacijskog sistema slijedi bojanje kroz 1 minutu, s hematoksilinom (Hematoxylin S2020 Dako), ispiranje u tekućoj vodi, dehidracija rezova kroz 70%-tni, 96%-tni i apsolutni etilni alkohol tijekom 4 minute. Rezovi su nakon toga deparafinizirani ksilolom (Tissue Clear, Sakura, UK), nakon čega se stakla montiraju s GLC Mounting Medijem (Sakura, UK) i pokriju pokrovnim stakalcem. Kao negativne kontrole u svim imunohistokemijskim bojanjima korišteni su histološki rezovi na koje je umjesto primarnih protutijela nanescena puferaska otopina.

## 2. Postupak imunohistokemije za VEGF-A i VEGF-C:

Nakon hlađenja stakla se nakapaju s VEGF-A protutijelom, koji je razrijeđen 1:750 s Antibody diluentom S0809 (Dako) i inkubiraju preko noći u hladnjaku na +4°C. VEGF-C protutijelo se razrijedi 1:1000 s istim Antibody Diluentom i inkubira preko noći. Drugi dan se stakla stavljaju u Dako Autostainer imunobojač, gdje se najprije nakapavaju s Peroxidase Blocking Solution S2023 (Dako) 6 minuta, nakon ispiranja s puferom (Dako Wash Buffer) slijedi nakapavanje i inkubacija 30 minuta s Flex Envision +/HRP K8010(Dako) otopinom. Slijedi ispiranje s Wash puferom, zatim inkubacija tijekom 10 minuta s DAB kromogenom koji oboji rezove. Zatim se ispiru s destiliranom vodom i kontrastira u Hematoxylinu S2020 (Dako) tijekom 3 minute. Slijedi ispiranje pod tekućom vodom i dehidracija rezova kroz 70%-tni, 96%-tni i apsolutni etilni alkohol tijekom 4 minute. Rezovi su nakon toga deparafinizirani ksilolom (Tissue Clear, Sakura, UK), nakon čega se stakla montiraju s GLC Mounting Medijem (Sakura, UK) i pokriju pokrovnim stakalcem.

Tablica 1. Karakteristike primarnih protutijela.

<b>PROTUTIJELO</b>	<b>PROIZVOĐAČ</b>	<b>KLON</b>	<b>RAZRIJEĐENJE</b>	<b>RAZOTKRIVANJE ANTIGENA</b>
<b>MMP-2</b> mišje monoklonsko	Novocastra, Newcastle, UK	17B11 NCL-MMP2-507	1:10	Tris/EDTA pH 9 pufer, mikrovalna, 10 min. na 800W i 15 min. na 450W
<b>MMP-9</b> mišje monoklonsko	Novocastra, Newcastle, UK	15W2 NCL-MMP9-439	1:600	60 min. na 25°C
<b>VEGF-A</b> mišje monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	C-1 sc-7269	1:750	Tris/EDTA pH 9 pufer, vodena kupelj, 15 min. na 98°C
<b>VEGF-C</b> zečje monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	h-190 sc-9047	1:1000	Tris/EDTA pH 9 pufer, vodena kupelj, 15 min. na 98°C
<b>CD31</b> mišje monoklonsko	Dako, Glostrup, Denmark	JC70A M0823	1:50	Tris/EDTA pH 9 pufer, vodena kupelj, 15 min. na 98°C
<b>D2-40</b> mišje monoklonsko	Dako, Glostrup, Denmark	D2-40 M3619	1:100	Tris/EDTA pH 9 pufer, vodena kupelj, 15 min. na 98°C
<b>Ki-67</b> mišje monoklonsko	Dako, Glostrup, Denmark	MIB-1	1:50	Tris/EDTA pufer, vodena kupelji, 15 min. na 95-100°C
<b>ER</b> zečje monoklonsko	Dako, Glostrup, Denmark	1B5 M7047	1:50	Tris/EDTA pH 9 pufer, vodena kupelj, 15 min. na 98°C
<b>PR</b> mišje monoklonsko	Dako, Glostrup, Denmark	PgR636 M3569	1:100	Tris/EDTA pH 9 pufer, vodena kupelj, 15 min. na 98°C

U analizi i procjeni imunohistokemijski obojenih TMA rezova korišten je svjetlosni mikroskop.

### **3.4. Procjena imunohistokemijskog bojanja**

#### **Procjena ekspresije MMP-2**

MMP-2 eksprimirala se u citoplazmi stromalnih stanica, dok se tumorske stanice nisu obojale. Ekspresija MMP-2 procijenjena je semikvantitativno, uzimajući u obzir postotak i intenzitet obojenosti stanica. Procjena ekspresije vršila se na dva načina:

Prvi način je procjena ekspresije putem tzv. histoscore-a:

1. određujući postotak pozitivnih stromalnih stanica, te
2. određujući intenzitet obojenosti (negativno = 0, slabo = 1, umjereno = 2, snažno = 3).

Njihovim se umnoškom dobio broj - histoscore (ili H-score), čiji se raspon kretao od 0 do 300 (53).

Drugi način je analiza ekspresije procjenom postotka pozitivno obojenih tumorskih stanica, uz graničnu vrijednost od 10%, pa se na ovaj način imunoreaktivnost klasificirala u dvije kategorije: negativno: 0–10% pozitivnih stanica i pozitivno: više od 10% pozitivnih stanica (128).



### **Procjena ekspresije MMP-9**

MMP-9 eksprimirala se u citoplazmi tumorskih stanica. Ekspresija MMP-9 procijenjena je semikvantitativno, uzimajući u obzir postotak i intenzitet obojenosti stanica.

Procjena ekspresije vršila se na dva načina, kao i za MMP-2: određivanjem histoscore-a i procjenom postotka pozitivno obojenih tumorskih stanica uz graničnu vrijednost od 10%.

### **Procjena ekspresije VEGF-A i VEGF-C**

Ekspresija VEGF-A i VEGF-C bila je izražena u citoplazmi tumorskih stanica i njezina procjena vršena je određivanjem histoscore-a na isti način kao za MMP-2 i MMP-9, umnoškom postotka pozitivnih stanica i intenziteta bojanja (od 0 do 300).

Ekspresija VEGF-A procijenjena je na još jedan način, opisan u prethodnom istraživanju (111), tako da se ekspresija VEGF-A kategorizirala u četiri skupine s obzirom na intenzitet obojenosti tumorskih stanica, i to kao negativno 0, slabo 1, umjereno 2 i snažno 3.

### **Procjena ekspresije CD31 (procjena gustoće krvnih žila)**

Krvne žile vizualizirane su pomoću protutijela na CD31. Korištenjem svjetlosnog mikroskopa na najvećem povećanju (x400) određivao se broj krvnih žila na čitavoj površini tkivne mikroareje. Krvne žile s debljom mišićnom stijenkom nisu se uzimale u obzir kod brojanja.

Pojedinačne endotelne stanice ili nakupine endotelnih stanica s jedva vidljivim lumenom ili bez lumena smatrane su pojedinačnim krvnim žilama i stoga uključene u analizu. Brojanje se vršilo na računaru uz pomoć programa *Issa 3.1* (Vams, Zagreb, Hrvatska).

### **Procjena ekspresije D2-40 (procjena gustoće limfnih žila)**

Limfne žile vizualizirane su protutijelom na D2-40, koji je obojao limfatični endotel. Limfnim žilama smatrane su isključivo one tvorbe s jasno vidljivim lumenom okruženim smeđe obojenim stanicama. Gustoća limfnih žila procijenjena je na području čitave tkivne mikroareje, a za svaki pojedini tumor procijenjena je srednja vrijednost broja limfnih žila sve tri mikroareje.

### **Procjena ekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora**

ER i PR procijenjeni su prema Allredovoj metodi (129), koja u obzir uzima postotak pozitivno obojenih jezgara tumorskih stanica (0 do 5) i intenzitet bojanja (0-3).

#### Procjena postotka obojenih tumorskih stanica:

- 0= negativne jezgre
- 1= manje od 1% obojenih jezgara
- 2= 1-10% obojenih jezgara
- 3= 11-33% obojenih jezgara
- 4= 34-66% obojenih jezgara
- 5= 67-100% obojenih jezgara

#### Procjena intenziteta bojanja tumorskih stanica:

- 0= negativno
- 1= slabo
- 2= umjereno
- 3= snažno

Procjenjeni postotak i intenzitet se zbrajaju u tzv. „Allred score“, a rezultati se grupiraju kako slijedi:

„Allred score“ 0-2 smatra se negativnim

≥3 smatra se pozitivnim (do 5 se smatra slabo, a 6 do 8 snažno pozitivnim)

### **Način određivanja ekspresije HER2**

HER2 podaci dobiveni su iz baze podataka Zavoda za patologiju, procijenjeni na standardnim rezovima. Budući sistem određen je prema smjernicama ASCO/CAP 2007 (130). Algoritam koji definira pozitivnu, neodređenu i negativnu vrijednost ekspresije HER2 proteina i genske amplifikacije daje slijedeće preporuke:

- pozitivni HER2 rezultat znači imunohistokemijsko bojanje označeno kao 3+ (uniformno intenzivno kontinuirano membransko bojanje u više od 30% tumorskih stanica)
- negativni HER2 rezultat znači imunohistokemijsko bojanje označeno kao 0 ili 1+ (diskontinuirano i slabo membransko bojanje tumorskih stanica u bilo kojem postotku)
- neodređeni (granični) HER2 rezultat označava imunohistokemijsko bojanje označeno kao 2+ (intenzivno, kontinuirano, homogeno membransko bojanje u ≤30% stanica; slabo ili umjereno heterogeno

kompletno membransko bojanje u najmanje 10% stanica) i zahtijeva dodatne metode za određivanje HER2 statusa, a kod nas je korištena metoda fluorescentne in situ hibridizacije za određivanje amplifikacije HER2 gena i time su se tumori reklasificirali ili u pozitivne ili u negativne.

### **Procjena ekspresije Ki-67 (proliferacijskog indeksa)**

Ki-67 proliferacijski marker utvrđen je brojanjem pozitivno obojenih jezgri tumorskih stanica pod svjetlosnim mikroskopom na području čitave mikroareje. Goldhirsch i suradnici (131) su 2009. godine u St. Gallenu donijeli konsenzus o primarnoj terapiji karcinoma dojke koji je, između ostalog, uključio procjenu Ki-67 proliferacijskog indeksa kao relativnu indikaciju za endokrinu ili kemoendokrinu terapiju. Ki-67 indeks kategoriziran je u tri grupe, s obzirom na postotak pozitivnih tumorskih stanica; nisku proliferaciju imaju tumori čiji je Ki-67 indeks 15% i manji, umjerenu proliferaciju imaju tumori čiji je Ki-67 indeks 16-30% i visoku proliferaciju oni tumori s preko 30% pozitivno obojenih jezgri tumorskih stanica. Na taj način je i u ovome radu procijenjena proliferacijska aktivnost tumora.

Rezultate imunohistokemijskog bojanja očitao je jedan patolog bez znanja kliničko-patoloških podataka o pojedinom tumoru, odnosno bolesnici. Zbog statističke obrade uzimala se u obzir srednja vrijednost određivanih imunohistokemijskih parametara svih triju mikroareja.

### **3.5. Statistička obrada podataka**

Rezultati očitavanja pohranjeni su u Excel-ovu bazu podataka (Microsoft). Statistička analiza podataka provedena je pomoću statističkih programa Statistica 9.0 i MedCalc 10.2.0.

Korištene su različite metode deskriptivne i analitičke biomedicinske statistike. S obzirom da je dio ispitivanih parametara bio kategoričkog tipa, nisu se određivale srednje vrijednosti, nego su sastavljene kontingencijske tablice. Statistička značajnost je mjerena upotrebom hi-kvadrat testa. Za pojedine parametre kod kojih je ukupan broj promatranih vrijednosti ili mjerenja bio manji od 30, ili ako su jedna ili više očekivanih vrijednosti u kontingencijskoj tablici ispod 5, korišten je Fisher-ov točni test.

Srednje vrijednosti kontinuiranih parametara uspoređivani su Mann Whitney U testom, kao i povezanost imunohistokemijski ispitivanih parametara s kliničko-patološkim podacima. Za potrebe ispitivanja razlika u izraženosti pojedinih varijabli među različitim podskupinama ispitanika, korišteni su t-test, analiza varijance i hi-kvadrat test, ovisno o tome da li su varijable bile kategoričke.

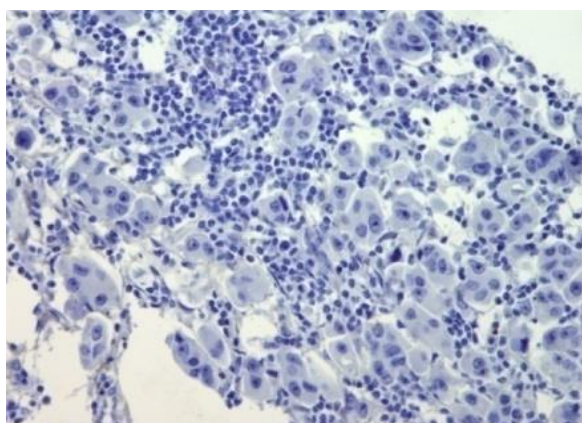
Povezanost vrijednosti dobivenih imunohistokemijskim očitavanjima za MMP-2 i MMP-9 s preživljenjem bolesnica s karcinomom dojke procijenjena je upotrebom Kaplan-Meierove metode, dok su razlike između grupa vrednovane log-rank testom. Nivo statističke značajnosti označavao se kao  $p < 0.05$ .

## **4. REZULTATI**

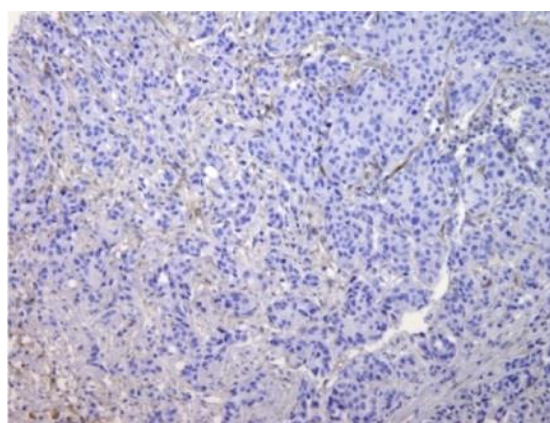
## **4.1. Ekspresija imunohistokemijski ispitivanih parametara na uzorcima karcinoma dojke**

### **4.1.1. Ekspresija MMP-2**

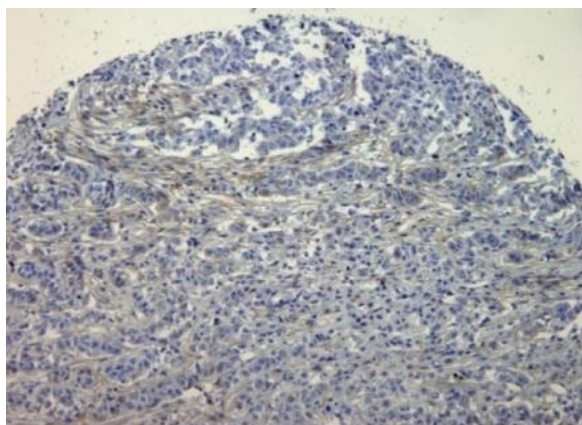
Ekspresija MMP-2 bila je izražena u stromalnim stanicama karcinoma dojke, i to predominantno u fibroblastima, makrofazima, limfocitima i endotelnim stanicama. Pozitivno - smeđe bojanje bilo je prisutno difuzno u citoplazmi stanica. S obzirom na intenzitet obojenosti, ekspresija MMP-2 bila je negativna (slika 9), slaba (slika 10), umjerena (slika 11) i snažna (slika 12). Tumorske stanice nisu ekspimirale MMP-2.



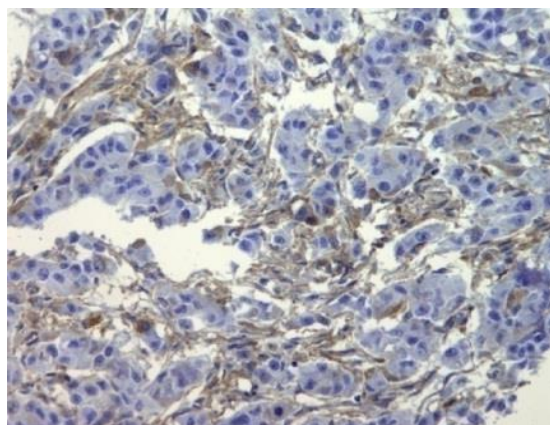
Slika 9. Negativna ekspresija MMP-2



Slika 10. Slaba ekspresija MMP-2



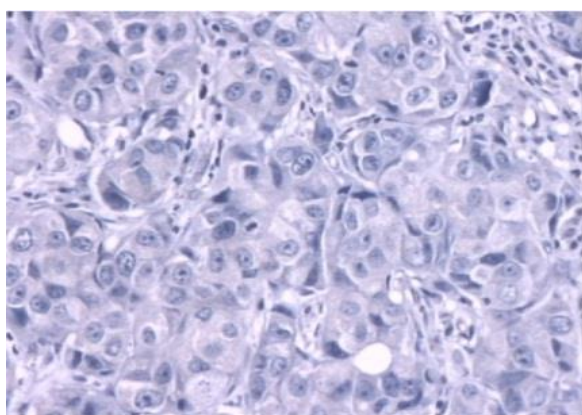
Slika 11. Umjerena ekspresija MMP-2



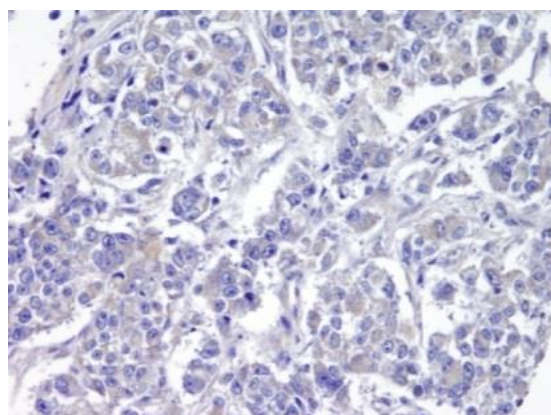
Slika 12. Snažna ekspresija MMP-2

#### 4.1.2. Ekspresija MMP-9

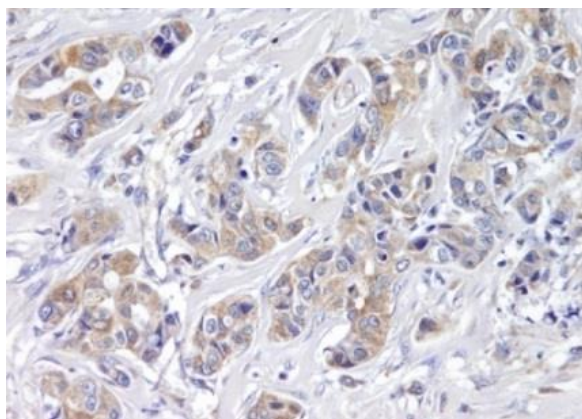
Ekspresija MMP-9 bila je izražena u tumorskim stanicama raka dojke. Pozitivnost se eksprimirala kao difuzna smeđa obojenost citoplazme. S obzirom na intenzitet obojenosti, ekspresija MMP-9 bila je negativna (slika 13), slaba (slika 14), umjerena (slika 15) i snažna (slika 16). Stromalne stanice su mjestimice pokazivale slabu pozitivnost na MMP-9.



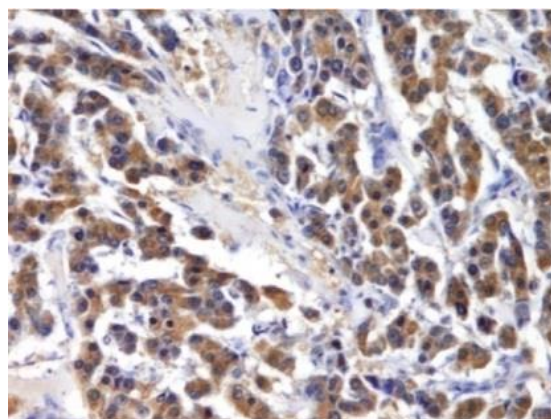
Slika 13. Negativna ekspresija MMP-9



Slika 14. Slaba ekspresija MMP-9



Slika 15. Umjerena ekspresija MMP-9

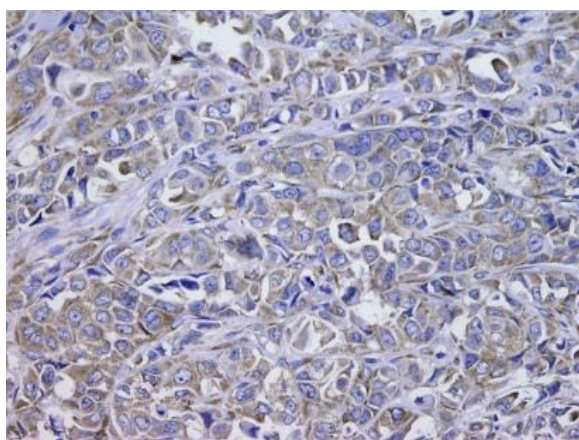


Slika 16. Snažna ekspresija MMP-9

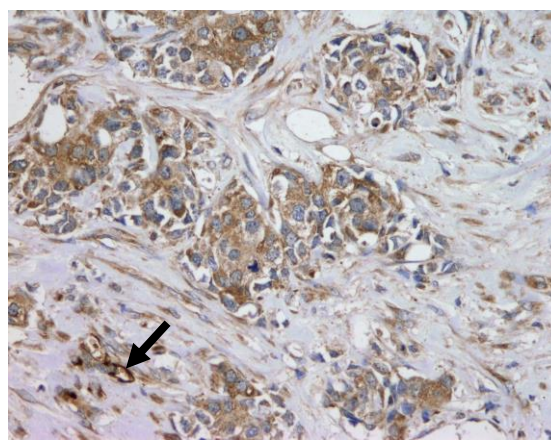


### 4.1.3. Ekspresija VEGF-A

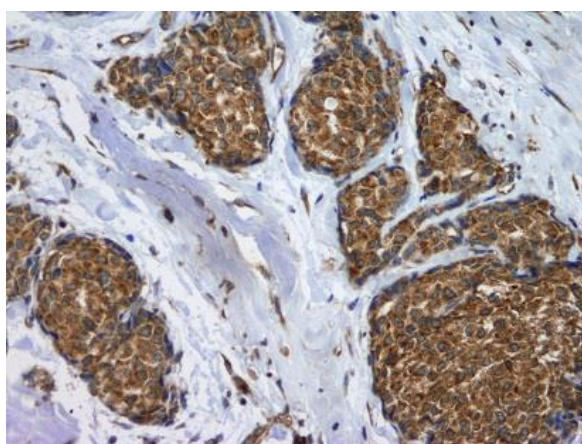
Tumorske stanice ekspimirale su VEGF-A, i to na način da je smeđa obojenost bila prisutna difuzno u citoplazmi. Intenzitet je bio negativan, slab, umjeren ili snažan. Osim tumorskih stanica, pozitivnost je bila prisutna i u citoplazmi endotelnih stanica krvnih žila. Slike 17, 18 i 19 prikazuju ekspresiju različitog intenziteta u tumorskim stanicama karcinoma dojke.



Slika 17. Slaba ekspresija VEGF-A u tumorskim stanicama.



Slika 18. Umjeren ekspresija VEGF-A u tumorskim stanicama. Strelica pokazuje pozitivno obojeni endotel kapilare.



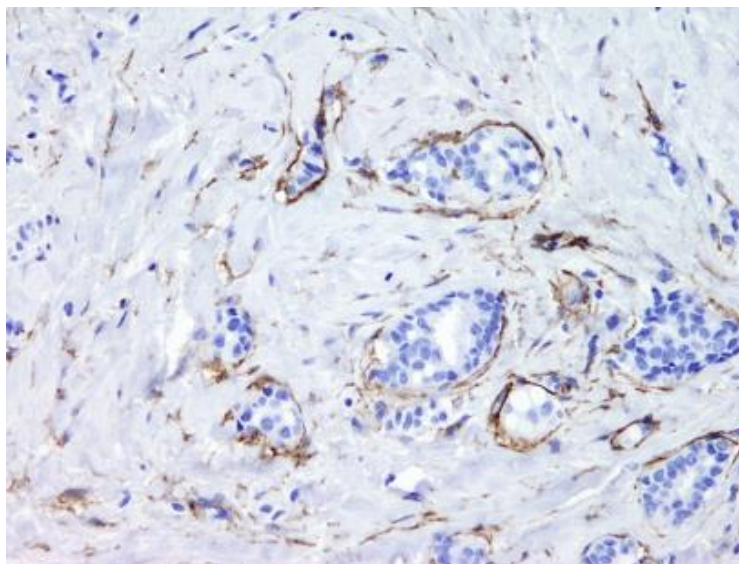
Slika 19. Snažna ekspresija VEGF-A u tumorskim stanicama.

#### **4.1.4. Ekspresija VEGF-C**

Ekspresija VEGF-C bila je izražena kao difuzna smeđa obojenost citoplazme tumorskih stanica, različitog intenziteta (negativno, slabo, umjereno i snažno). Pozitivna ekspresija bila je izražena i u endotelnim stanicama limfnih žila.

#### **4.1.5. Ekspresija D2-40**

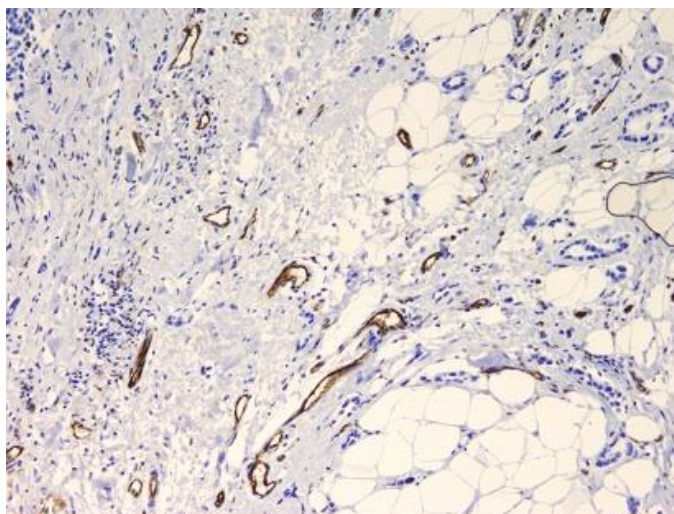
Protutijelom D2-40 vizualizirane su limfne žile, čiji se endotel obojio smeđe, kako se vidi na slici 20.



Slika 20. Pozitivno obojene limfne kapilare.

#### **4.1.6. Ekspresija CD31**

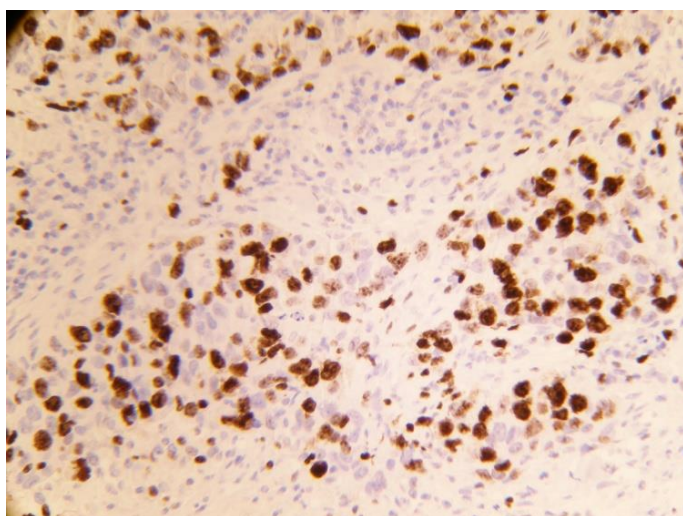
Krvne žile vizualizirane su pomoću anti-CD31 protutijela i smeđe obojene endotelne stanice smatrale su se pozitivnim nalazom. Na slici 21 vide se obojene male krvne žile.



Slika 21. Pozitivno obojene krvne kapilare.

#### **4.1.7. Ekspresija Ki-67**

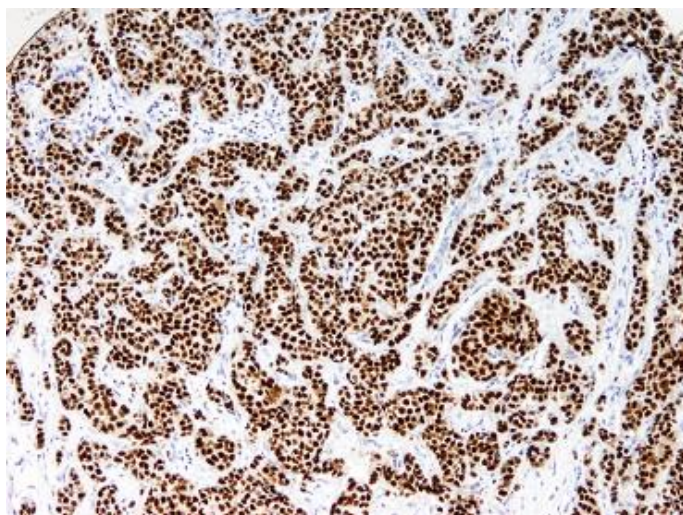
Stanice u proliferaciji vizualizirane su protutijelom na Ki-67, koje se eksprimira kao nuklearna obojenost tumorskih stanica, vidljivo na slici 22.



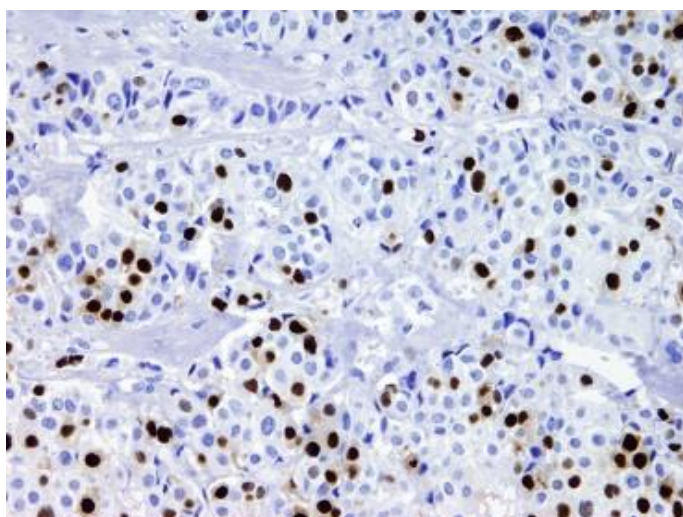
Slika 22. Ki-67 pozitivne jezgre tumorskih stanica.

#### 4.1.8. Ekspresija ER i PR

Hormonski receptori nalaze se u jezgri, pa se imunohistokemijskim bojanjem protutijelom na ER i PR, pozitivnost eksprimirala kao nuklearna smeđa obojenost tumorskih stanica. Slika 23 i 24.



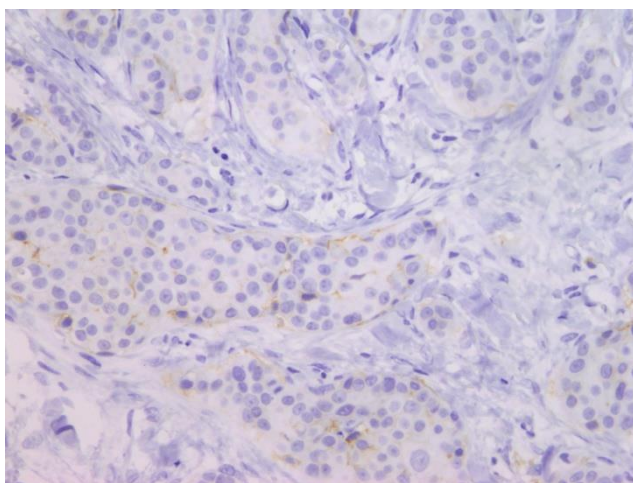
Slika 23. ER pozitivno obojene jezgre u oko 90% tumorskih stanica.



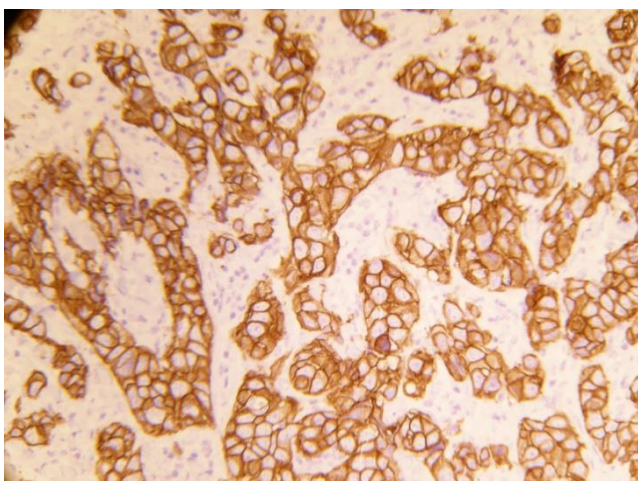
Slika 24. PR pozitivno obojene jezgre u oko 30% tumorskih stanica.

#### 4.1.9. Ekspresija HER2

Ekspresija receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 izražena je kao diskontinuirano ili kontinuirano membransko bojanje na tumorskim stanicama, različitog intenziteta (slabo-slika 25, umjereno ili snažno-slika 26).



Slika 25. Ekspresija HER2 na tumorskim stanicama u obliku slabe diskontinuirane membranske obojenosti.



Slika 26. Ekspresija HER2 na tumorskim stanicama u obliku snažne kontinuirane membranske obojenosti.

## **4.2. Patohistološke i imunohistokemijske karakteristike skupina primarnih tumora i recidiva**

Imunohistokemijske analize rađene su na uzorcima tumorskog tkiva karcinoma dojke - na primarnim tumorima i lokalnim recidivima. Skupina primarnih tumora podijeljena je na tri podskupine, i to:

- a) 25 primarnih tumora bez metastaza (39.68 %)
- b) 38 primarnih tumora s aksilarnim nodalnim metastazama (60.32 %)
- c) 16 primarnih tumora s koštanim metastazama (25.4 %)

Skupina recidiva obuhvatila je 54 tumorska uzorka.

U tablici 1. prikazane su patohistološke prognostičke karakteristike primarnih tumora, a odnose se na veličinu primarnih tumora koja je iznosila 2.2 cm (medijan), histološki i nuklearni gradus tumora. Većina tumora bila je histološkog (46%) i nuklearnog gradusa 2 (58%), a medijan broja metastatskih limfnih čvorova bio je 2 (0-27).

Tablica 1. Patohistološke karakteristike primarnih tumora.

	N	%
<b>Primarni tumori</b>	63	100
bez metastaza	25	39.68
s nodalnim metastazama	38	60.32
s koštanim metastazama	16	25.4
Veličina (cm) *	2.2	0.1-9
Histološki gradus		
1	15	23.81
2	29	46.03
3	19	30.16
Nuklearni gradus		
1	2	3.17
2	37	58.74
3	24	38.09
Broj metastatskih limfnih čvorova *	2	0-27

\*podatak prikazan kao medijan s rasponom

Tablica 2. kategorizira primarne tumore s obzirom na patološku TNM klasifikaciju, i iz nje se može vidjeti da je većina tumora (40 %) bila veličine do 20 mm, odnosno do 50 mm (40 %), da je 40 % primarnih tumora bilo bez limfogenih metastaza i 74 % bez hematogenih metastaza.

Tablica 2. Primarni tumori svrstani u kategorije prema pTNM klasifikaciji i u stadije.

	N	%
<b>pT</b>		
1	26	41.27
2	26	41.27
3	6	9.52
4	5	7.94
<b>pN</b>		
0	25	39.68
1	13	20.64
2	14	22.22
3	11	17.46
<b>pM</b>		
0	47	74.6
1	16	25.4
<b>Stadij</b>		
I	11	17.5
II	15	23.8
III	21	33.3
IV	16	25.4

pT1: tumor  $\leq 20$  mm u najvećem promjeru; pT2: tumor  $> 20$  mm, a  $\leq 50$  mm u najvećem promjeru; pT3: tumor  $> 50$  mm u najvećem promjer; pT4: tumor bilo koje veličine s direktnom ekstenzijom u stijenku grudne šupljine i/ili kožu (ulceracije ili kožni čvorići).

pN0: nema metastaza u regionalne limfne čvorove; pN1: metastaze u 1 do 3 aksilarna limfna čvora; pN2: metastaze u 4 do 9 aksilarnih limfnih čvorova

pN3: metastaze u 10 ili više aksilarnih limfnih čvorova.

pM0: nema udaljenih metastaza; pM1: prisutne udaljene metastaze.



### **4.2.1. Patohistološke karakteristike primarnih tumora bez metastaza**

Primarni nemetastatski tumori bili su većinom (48%) veličine do 20 mm, histološkog (56%) i nuklearnog (60%) gradusa 2, u 68% slučajeva tumorske stanice su pokazivale pozitivnost na estrogenski receptor, a u 56% na progesteronski. Većinom su ti tumori bili negativni na HER2 (88%) i 48% tumora imalo je niski proliferacijski indeks, što je prikazano u tablici 3.

Iz tablice 4. može se vidjeti da je 56% primarnih tumora koji nisu metastazirali niti u aksilarne limfne čvorove niti su dali udaljene metastaze, ekspimiralo MMP-2, a 84% tumora je ekspimiralo MMP-9. Svi tumori bili su pozitivni na VEGF-A i VEGF-C, i to snažno pozitivna ekspresija VEGF-A bila je prisutna u 60% tumora, a ekspresija VEGF-C bila je u 40% slaba i u 36% umjerena. Gustoća limfnih žila bila je veća (20.25) nego gustoća krvnih žila (7.78).

Tablica 3. Patohistološke karakteristike primarnih tumora bez metastaza.

	N	%
<b>Primarni tumori bez metastaza</b>	25	100
Veličina (cm) *	2.1	0.1-6.5
<b>pT</b>		
1	12	48
2	9	36
3	1	4
4	3	12
<b>Histološki gradus</b>		
1	6	24
2	14	56
3	5	20
<b>Nuklearni gradus</b>		
1	2	8
2	15	60
3	8	32
<b>ER</b>		
negativni	8	32
pozitivni	17	68
<b>PR</b>		
negativni	11	44
pozitivni	14	56
<b>HER2</b>		
negativni	22	88
pozitivni	3	12
<b>Proliferacija (Ki67)</b>		
niska	12	48
umjerena	6	24
visoka	6	24

\*podatak prikazan kao medijan s rasponom

Tablica 4. Ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9, vaskularnih endotelnih faktora rasta A i C, te gustoća krvnih i limfnih žila u skupini primarnih tumora bez metastaza.

<b>Primarni tumori bez metastaza</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>MMP-2 (H-score) *</b>	27	0-290
MMP-2 (intenzitet)		
negativno	11	44
pozitivno	14	56
<b>MMP-9 (H-score) *</b>	117	0-297
MMP-9 (intenzitet)		
negativno	4	16
pozitivno	21	84
<b>VEGF-A (H-score) *</b>	230	12-300
VEGF-A (intenzitet)		
negativno	0	0
slabo	4	16
umjereno	5	20
snažno	15	60
<b>VEGF-C (H-score) *</b>	145	67-300
VEGF-C (intenzitet)		
negativno	0	0
slabo	10	40
umjereno	9	36
snažno	5	20
<b>Gustoća limfnih žila *</b>	20.25	1.2-54.25
<b>Gustoća krvnih žila *</b>	7.78	2.91-50.24

\*podatak prikazan kao medijan s rasponom

#### **4.2.2. Patohistološke karakteristike primarnih tumora s aksilarnim nodalnim metastazama**

Skupina primarnih karcinoma dojke koji su metastazirali u limfne čvorove aksile obuhvaćala je 38 tkivnih uzoraka, veličine u medijanima 2.5 cm; 39.5% je bila umjereno diferencirana, 58% nuklearnog gradusa 2, a broj metastatskih limfnih čvorova izražen u medijanima je bio 7.5 (s rasponom od 1 do 27). Većina tumora pokazivala je pozitivnost na hormonske receptore; ER u 71%, PR u 55%, a negativnost na HER2 u 79% slučajeva. Proliferacijski indeks u većini tumora ove skupine (39.5%) bio je nizak. Detalji su prikazani u tablici 5.

U skupini primarnih tumora s aksilarnim nodalnim metastazama, MMP-2 pozitivnost ekspimiralo je 63% tumora, MMP-9 pozitivno bilo je 97% tumora. Svi tumori pokazivali su ekspresiju VEGF-A i VEGF-C, i to većina tumora bila je snažno pozitivna na VEGF-A (60.53%), kao i na VEGF-C (37%). Gustoća limfnih žila bila je veća (20.6) nego gustoća krvnih žila (7.12), što se vidi u tablici 6.

Tablica 5. Karakteristike primarnih tumora s aksilarnim nodalnim metastazama.

	N	%
<b>Primarni tumori s nodalnim metastazama</b>	38	100
Veličina (cm) *	2.5	0.5-9
pT		
1	14	36.84
2	17	44.74
3	5	13.16
4	2	5.26
Histološki gradus		
1	9	23.68
2	15	39.48
3	14	36.84
Nuklearni gradus		
1	0	0
2	22	57.89
3	16	42.11
Broj metastatskih limfnih čvorova *	7.5	1-27
ER		
negativni	11	28.95
pozitivni	27	71.05
PR		
negativni	17	44.74
pozitivni	21	55.26
HER2		
negativni	30	78.95
pozitivni	8	21.05
Proliferacija (Ki-67)		
niska	15	39.5
umjerena	11	28.9
visoka	12	31.6

\*podatak prikazan kao medijan s rasponom

Tablica 6. Ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9, vaskularnih endotelnih faktora rasta A i C, te gustoća krvnih i limfnih žila u skupini primarnih tumora s aksilarnim nodalnim metastazama.

<b>Primarni tumori s nodalnim metastazama</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>MMP-2 (H-score) *</b>	37.5	0-210
MMP-2 (intenzitet)		
negativno	14	36.84
pozitivno	24	63.16
<b>MMP-9 (H-score) *</b>	155	1-300
MMP-9 (intenzitet)		
negativno	1	2.63
pozitivno	37	97.37
<b>VEGF-A (H-score) *</b>	227	107-300
VEGF-A (intenzitet)		
negativno	0	0
slabo	0	0
umjereno	15	39.47
snažno	23	60.53
<b>VEGF-C (H-score) *</b>	190	13-300
VEGF-C (intenzitet)		
negativno	0	0
slabo	10	26.32
umjereno	14	36.84
snažno	14	36.84
<b>Gustoća limfnih žila *</b>	20.6	0-64.07
<b>Gustoća krvnih žila *</b>	7.12	4.09-16.19

\*podatak prikazan kao medijan s rasponom

### **4.2.3. Patohistološke karakteristike primarnih tumora s koštanim metastazama**

Ova skupina obuhvatila je 16 primarnih tumora, veličine u medijanima 2.2 cm (raspon 1-8), dobro (37.5%) do umjereno diferenciranih (37.5%), nuklearnog gradusa 2 (75%) i 3 (25%). Više od 80% tumora ekspimiralo je hormonske receptore, i ER i PR, a 93.7% bilo je negativno na HER2. Većina tumora ove skupine (75%) imala je niski proliferacijski indeks. Detalji su prikazani u tablici 7.

Primarni tumori s koštanim metastazama ekspimirali su MMP-2 u 56% slučajeva, a MMP-9 u 93%. Svi tumori su umjereno (44%) do snažno (56%) ekspimirali VEGF-A i umjereno (12.5%) od snažno (87.5%) VEGF-C. Gustoća limfnih žila bila je veća (20.5) nego gustoća krvnih žila (6.21).

Tablica 7. Karakteristike primarnih tumora s koštanim metastazama.

	N	%
<b>Primarni tumori s koštanim metastazama</b>	16	100
Veličina (cm) *	2.2	1-8
pT		
1	7	43.75
2	7	43.75
3	2	12.5
4	0	0
Histološki gradus		
1	6	37.5
2	6	37.5
3	4	25
Nuklearni gradus		
1	0	0
2	12	75
3	4	25
ER		
negativni	2	12.5
pozitivni	14	87.5
PR		
negativni	3	18.75
pozitivni	13	81.25
HER2		
negativni	15	93.75
pozitivni	1	6.25
Proliferacija (Ki67)		
niska	12	75
umjerena	2	12.5
visoka	2	12.5

\*podatak prikazan kao medijan s rasponom



Tablica 8. Ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9, vaskularnih endotelnih faktora rasta A i C, te gustoća krvnih i limfnih žila u skupini primarnih tumora s koštanim metastazama.

<b>Primarni tumori s koštanim metastazama</b>	N	%
<b>MMP-2 (H-score) *</b>	26	0-167
MMP-2 (intenzitet)		
negativno	7	43.75
pozitivno	9	56.25
<b>MMP-9 (H-score) *</b>	198	0-300
MMP-9 (intenzitet)		
negativno	1	6.25
pozitivno	15	93.75
<b>VEGF-A (H-score) *</b>	231.5	160-300
VEGF-A (intenzitet)		
negativno	0	0
slabo	0	0
umjereno	7	43.75
snažno	9	56.25
<b>VEGF-C (H-score) *</b>	286.5	183-300
VEGF-C (intenzitet)		
negativno	0	0
slabo	0	0
umjereno	2	12.5
snažno	14	87.5
<b>Gustoća limfnih žila *</b>	20.5	0-56.92
<b>Gustoća krvnih žila *</b>	6.21	3.08-11.47

\*podatak prikazan kao medijan s rasponom

#### 4.2.4. Patohistološke karakteristike lokalnih recidiva

Skupina recidiva obuhvatila je 54 tumorska uzorka. Njih 64.8% eksprimiralo je ER, i 37% eksprimiralo je PR. Negativna ekspresija HER2 obuhvaćala je 85% tumora. Proliferacijski indeks Ki-67 je u čak 48.1% tumora bio visok. Detalji su prikazani u tablici 9.

Tablica 9. Ekspresija steroidnih receptora ER i PR, HER2 i Ki-67 proliferacijskog indeksa.

	N	%
<b>Lokalni recidivi</b>	54	100
<b>ER</b>		
negativni	18	33.33
pozitivni	35	64.81
<b>PR</b>		
negativni	33	61.11
pozitivni	20	37.04
<b>HER2</b>		
negativni	46	85.19
pozitivni	6	11.11
<b>Proliferacija (Ki-67)</b>		
niska	16	29.6
umjerena	7	12.9
visoka	26	48.1

U tablici 10. prikazane su karakteristike recidiva s obzirom na ekspresiju istraživanih parametara, pa se može uočiti da je 50% recidiva eksprimiralo MMP-2, a 87% ih je eksprimiralo MMP-9. Svi tumori bili su pozitivni na VEGF-A i VEGF-C, i to snažno pozitivna ekspresija VEGF-A bila je prisutna u 50% tumora, a ekspresija VEGF-C bila je u 51.8% slaba i u 35% umjerena.

Gustoća limfnih žila bila je veća (medijan 15.1) nego gustoća krvnih žila (medijan 7.52).

Tablica 10. Ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9, vaskularnih endotelnih faktora rasta A i C, te gustoća krvnih i limfnih žila u skupini lokalnih recidiva.

<b>Lokalni recidivi</b>	N	%
<b>MMP-2 (H-score) *</b>	18	0-300
MMP-2 (intenzitet)		
negativno	26	48.15
pozitivno	27	50
<b>MMP-9 (H-score) *</b>	166	0-300
MMP-9 (intenzitet)		
negativno	5	9.26
pozitivno	47	87.04
<b>VEGF-A (H-score) *</b>	220	87-300
VEGF-A (intenzitet)		
negativno	0	0
slabo	2	3,7
umjereno	22	40.74
snažno	27	50
<b>VEGF-C (H-score) *</b>	100	0-300
VEGF-C (intenzitet)		
negativno	0	0
slabo	28	51.85
umjereno	19	35.18
snažno	5	9.26
<b>Gustoća limfnih žila *</b>	15.1	0-57.19
<b>Gustoća krvnih žila *</b>	7.52	3.82-25

\*podatak prikazan kao medijan s rasponom

### **4.3. Povezanost MMP-2 i MMP-9 s ispitivanim parametrima unutar definiranih skupina**

Statistički je analizirana povezanost intenziteta ekspresije MMP-2 i MMP-9 s veličinom tumora (u centimetrima), pT, histološkim gradusom, nuklearnim gradusom, brojem metastatskih limfnih čvorova, pN, pM, ekspresijom estrogenskih, progesteronskih i HER2 receptora, Ki-67 proliferacijskim indeksom, ekspresijom VEGF-A, VEGF-C, gustoćom limfnih i krvnih žila, kao i međusobnom usporedbom.

U tablicama 11, 12, 13 i 14 prikazani su odnosi MMP-2 i MMP-9 i svih ispitivanih parametara po skupinama tumora s pripadajućom p vrijednosti. Crvenom bojom su označene p vrijednosti koje su dosegle statističku značajnost.

Tablica 11. Povezanost MMP-2 i MMP-9 s istraživanim parametrima u skupini primarnih tumora bez metastaza.

<b>Primarni tumori bez metastaza</b>	<b>MMP-2 (p)</b>	<b>MMP-9 (p)</b>
veličina	0.80	0.91
pT	0.25	0.30
histološki gradus	0.78	0.40
nuklearni gradus	0.92	0.57
ER	0.66	0.39
PR	0.39	0.39
HER2	0.34	1.00
Ki-67 (%)	0.22	1.00
VEGF-A	<b>0.003</b>	0.25
VEGF-C	0.20	0.89
gustoća limfnih žila	0.64	0.54
gustoća krvnih žila	0.24	0.48
MMP-9	0.60	/

Tablica 12. Povezanost MMP-2 i MMP-9 s istraživanim parametrima u skupini primarnih tumora s aksilarnim metastazama.

<b>Primarni tumori s aksilarnim metastazama</b>	<b>MMP-2 (p)</b>	<b>MMP-9 (p)</b>
veličina	0.38	/
pT	0.51	0.61
histološki gradus	0.73	0.71
nuklearni gradus	0.45	0.86
broj metastatskih limfnih čvorova	0.90	/
pN	0.35	0.70
ER	0.78	<b>0.039</b>
PR	0.74	0.61
HER2	0.16	0.25
Ki-67 (%)	0.99	/
VEGF-A	0.59	0.53
VEGF-C	0.07	0.10
gustoća limfnih žila	0.06	/
gustoća krvnih žila	0.84	/
MMP-9	1.00	/

Tablica 13. Povezanost MMP-2 i MMP-9 s istraživanim parametrima u skupini primarnih tumora s koštanim metastazama.

<b>Primarni tumori s koštanim metastazama</b>	<b>MMP-2 (p)</b>	<b>MMP-9 (p)</b>
veličina	0.75	/
pT	0.48	0.13
histološki gradus	0.99	<b>0.019</b>
nuklearni gradus	0.85	<b>0.039</b>
broj metastatskih limfnih čvorova	0.63	/
pN	0.58	0.50
ER	0.34	0.08
PR	0.15	0.54
HER2	/	0.06
Ki-67 (%)	1.00	<b>0.010</b>
VEGF-A	<b>0.049</b>	0.89
VEGF-C	0.11	0.24
gustoća limfnih žila	0.14	/
gustoća krvnih žila	0.39	/
MMP-9	0.71	/

Tablica 14. Povezanost MMP-2 i MMP-9 s istraživanim parametrima u skupini lokalnih recidiva.

<b>Lokalni recidivi</b>	<b>MMP-2 (p)</b>	<b>MMP-9 (p)</b>
ER	0.66	0.40
PR	0.94	0.54
HER2	0.80	0.76
Ki-67 (%)	0.44	0.55
VEGF-A	0.83	0.35
VEGF-C	0.38	0.54
gustoća limfnih žila	<b>0.0001</b>	0.57
gustoća krvnih žila	0.81	0.62
MMP-9	0.51	/

#### 4.4. Usporedba ekspresije MMP-2 i MMP-9 između definiranih skupina

Statistički je analizirana razlika u intenzitetu ekspresije MMP-2 i MMP-9 između određenih skupina tumora, kako je prikazano u tablici 15, s pripadajućom p vrijednosti.

Tablica 15. Usporedba intenziteta ekspresije MMP-2 i MMP-9 između istraživanih skupina tumora s pripadajućom p vrijednosti.

SKUPINE TUMORA	MMP-2 (p)	MMP-9 (p)
bez metastaza	0.4	0.11
s aksilarnim metastazama		
bez metastaza	0.79	<b>0.045</b>
s koštanim metastazama		
bez metastaza	<b>0.001</b>	0.21
lokalni recidivi		
s aksilarnim metastazama	0.48	0.36
s koštanim metastazama		

U daljnjem tekstu prikazani su samo rezultati koji su dosegli statističku značajnost, na razini  $p < 0.05$ .

## **4.5. Prikaz rezultata koji su dosegli statističku značajnost**

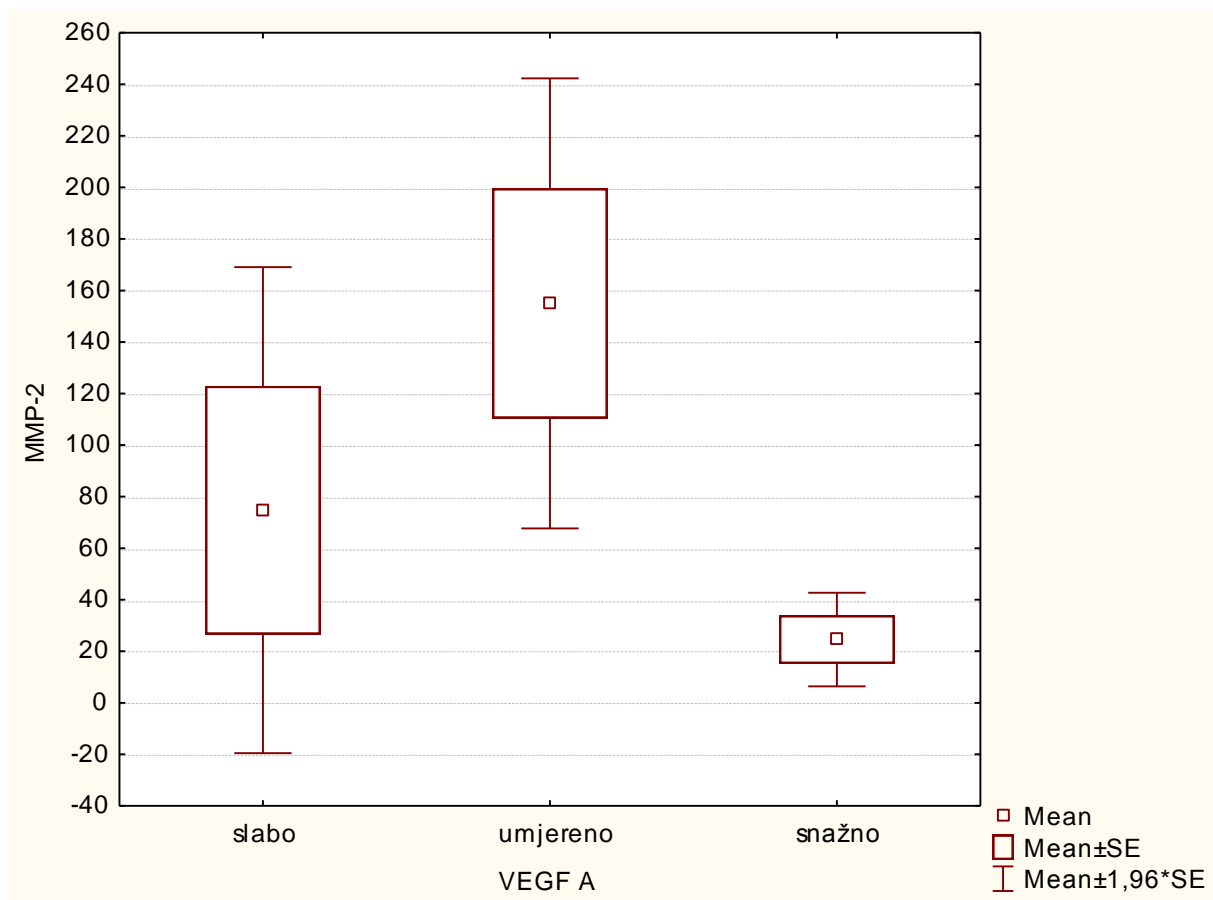
### **4.5.1. Povezanost ekspresije MMP-2 i MMP-9 s ispitivanim parametrima unutar definiranih skupina**

#### **Povezanost ekspresije MMP-2 i VEGF-A u primarnim tumorima bez metastaza**

U skupini primarnih tumora bez metastaza kojoj je ukupno pripadalo 24 uzorka tumora, istražen je odnos ekspresije MMP-2 i VEGF-A. Statistički je dokazano da postoji značajna razlika u ekspresiji MMP-2 s obzirom na intenzitet VEGF-A. Tumori koji su VEGF-A snažno pozitivni, pokazuju slabu ekspresiju MMP-2, na statistički značajnoj razini ( $p=0.003$ ).

Na slici 27. vidi se grafički prikaz međusobne povezanosti MMP-2 i VEGF-A, i jasna razlika između dviju podskupina: primarni tumori bez metastaza sa snažnom ekspresijom MMP-2 povezani su sa slabom ekspresijom VEGF-A, i obratno, tumori MMP-2 slabe ekspresije sa snažnim intenzitetom ekspresije VEGF-A.

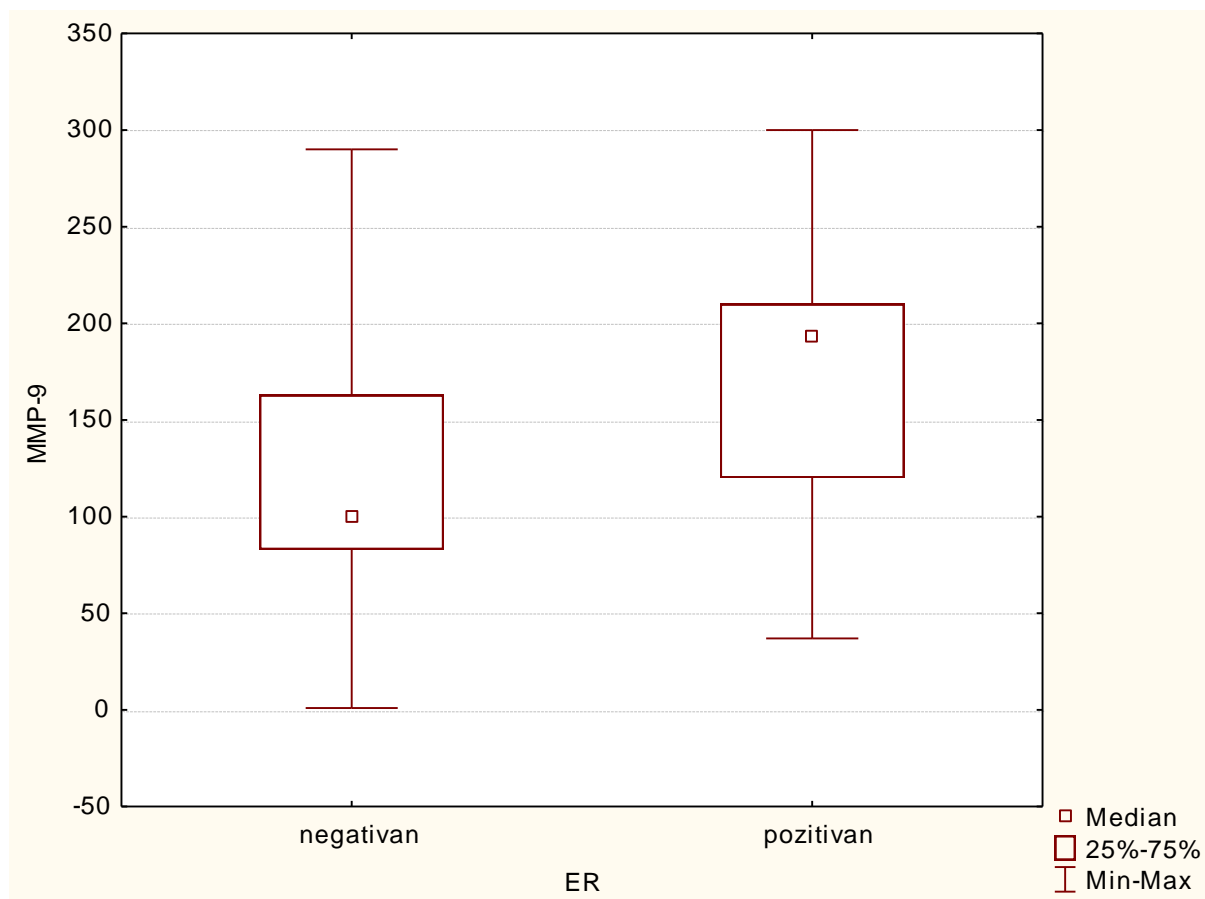




Slika 27. Razlika u intenzitetu ekspresije VEGF-A u korelaciji s MMP-2. Primarni tumori bez metastaza sa snažnom ekspresijom MMP-2 povezani su s umjerenom ekspresijom VEGF-A, dok je niska ekspresija MMP-2 povezana sa snažnom ekspresijom VEGF-A.

## Povezanost ekspresije MMP-9 i ER u primarnim tumorima s aksilarnih metastazama

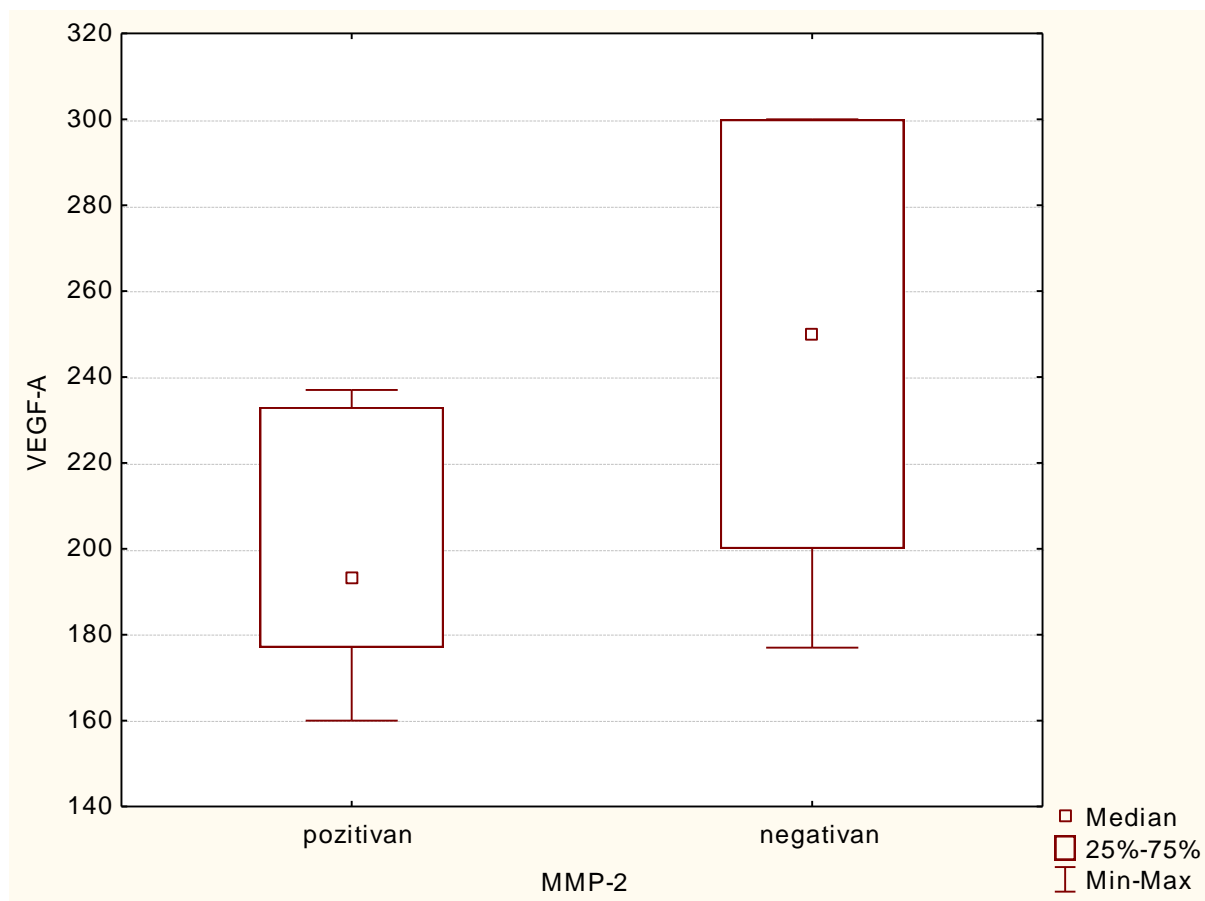
U skupini od 38 primarnih tumora s aksilarnim metastazama, 71% je bilo ER pozitivno, a 29% je bilo ER negativno. Analizom ekspresije MMP-9 na tumorskim stanicama između podskupina s obzirom na ER status, pokazalo se da postoji povezanost između ekspresije ER i MMP-9. Dokazano je na statistički značajnoj razini, da tumori koji jače eksprimiraju MMP-9 su ER pozitivni ( $p=0.039$ ), što se vidi na slici 28.



Slika 28. Korelacija između ekspresije estrogenskih receptora (ER) i MMP-9 u skupini primarnih tumora s aksilarnih metastazama. Može se vidjeti da su ER pozitivni tumori povezani sa snažnijom ekspresijom MMP-9, u odnosu na ER negativne tumore koji su povezani sa slabijom ekspresijom MMP-9.

## Povezanost ekspresije MMP-2 i VEGF-A u primarnim tumorima s koštanim metastazama

U skupini koju je činilo 16 primarnih tumora s koštanim metastazama, njih sedam pokazivalo je negativnu MMP-2 ekspresiju i snažnu VEGF-A ekspresiju, a devet tumora bilo je MMP-2 pozitivno, uz slabiju VEGF-A ekspresiju. Razlika između ove dvije podskupine tumora s obzirom na MMP-2 ekspresiju i negativnu korelaciju s VEGF-A ekspresijom postoji na statistički značajnoj razini ( $p=0.049$ ) (slika 29).



Slika 29. Prikaz korelacije između MMP-2 i VEGF-A u skupini primarnih tumora s koštanim metastazama. Tumori koji snažno ekspimiraju MMP-2 povezani su sa slabijom ekspresijom VEGF-A i obratno.

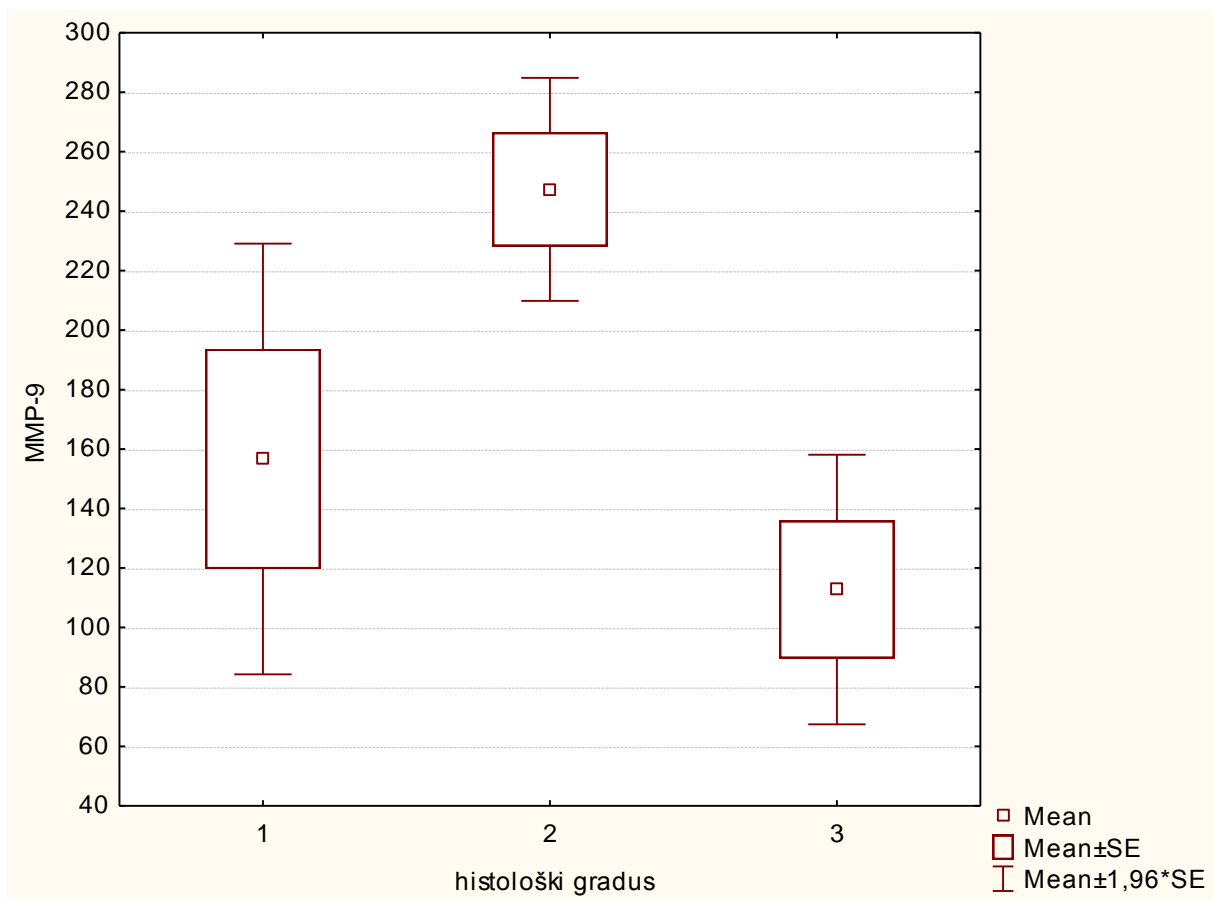
## **Povezanost ekspresije MMP-9 i histološkog gradusa u primarnim tumorima s koštanim metastazama**

U skupini od 16 primarnih tumora s koštanim metastazama analizirana je povezanost intenziteta ekspresije MMP-9 i histološkog gradusa. U podskupini s gradusom 1 bilo je 6 tumora, s gradusom 2 bilo je 6 tumora, a s gradusom 3 bilo je 4 tumora. Analizom varijance utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u intenzitetu ekspresije MMP-9 (histoscore) i histološkog gradusa ( $p=0.019$ ). Kako bi ispitali koje se od skupina značajno razlikuju, napravljen je post hoc Scheffeov test, koji je pokazao da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji MMP-9 između histološkog gradusa 2 i 3 ( $p=0.027$ ). Kod ostalih usporedbi ne postoji značajna razlika (tablica 16).

Primarni tumori s koštanim metastazama koji su histološkog gradusa 2 imaju statistički značajno jaču ekspresiju MMP-9 nego oni gradusa 3 (slika 30).

Tablica 16. Statistički značajna razlika u ekspresiji MMP-9 postoji između histološkog gradusa 2 i 3 u skupini primarnih tumora s koštanim metastazama.

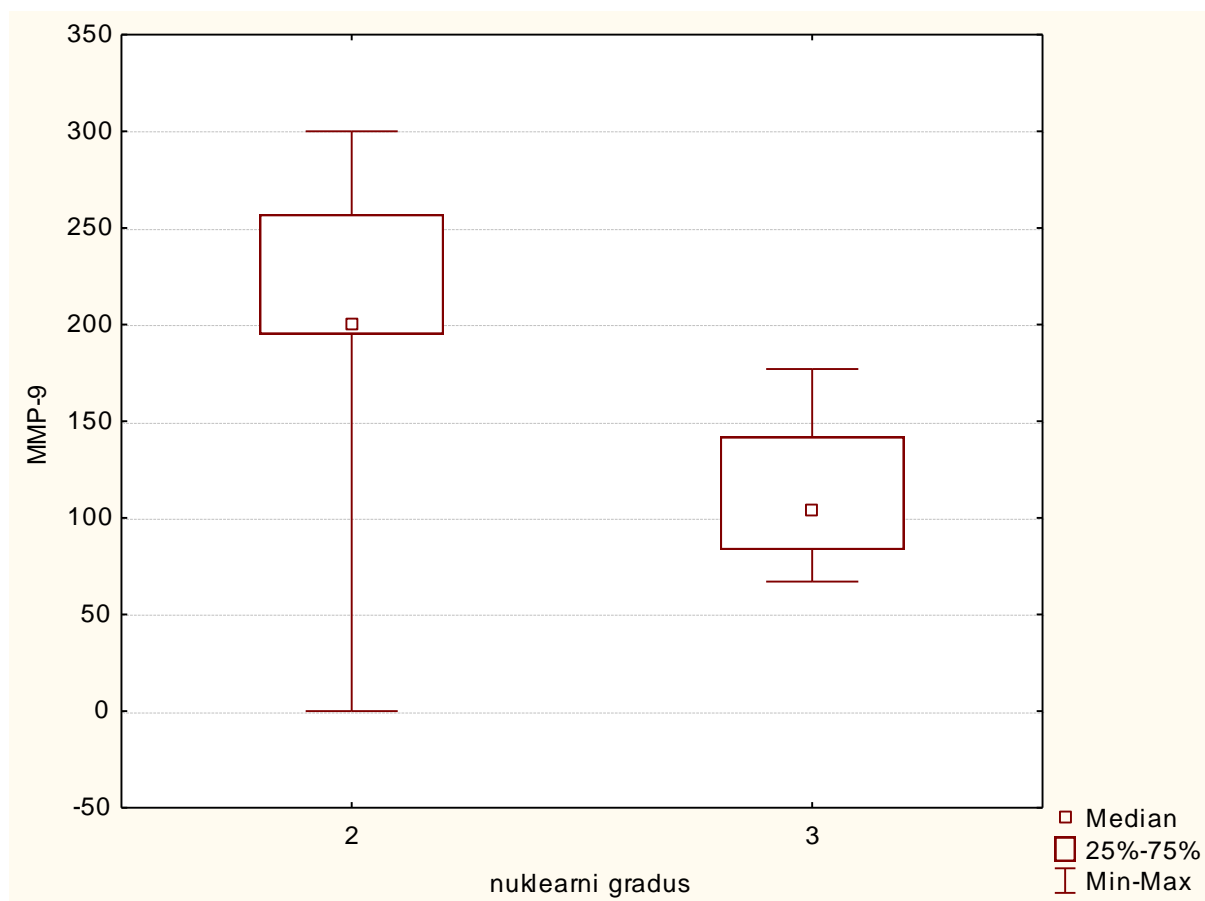
HISTOLOŠKI GRADUS	MMP-9		
	156.6	247.3	112.7
1		0.101	0.609
2	0.101		0.027
3	0.309	0.027	



Slika 30. Primarni tumori s koštanim metastazama histološkog gradusa 2 imaju značajno jaču ekspresiju MMP-9 nego tumori gradusa 3.

## **Povezanost ekspresije MMP-9 i nuklearnog gradusa u primarnim tumorima s koštanim metastazama**

U skupini 16 primarnih tumora s koštanim metastazama analizirali smo povezanost ekspresije MMP-9 (histoscore) i nuklearnog gradusa tumora. Niti jedan tumor ove skupine nije imao nuklearni gradus 1. Nuklearni gradus 2 imalo je 75% tumora (N=12), a nuklearni gradus 3 imalo je 25% tumora (N=4). Primarni tumori s koštanim metastazama nuklearnog gradusa 2 imaju statistički značajno jaču ekspresiju MMP-9 nego tumori nuklearnog gradusa 3 ( $p=0.039$ ), (slika 31).

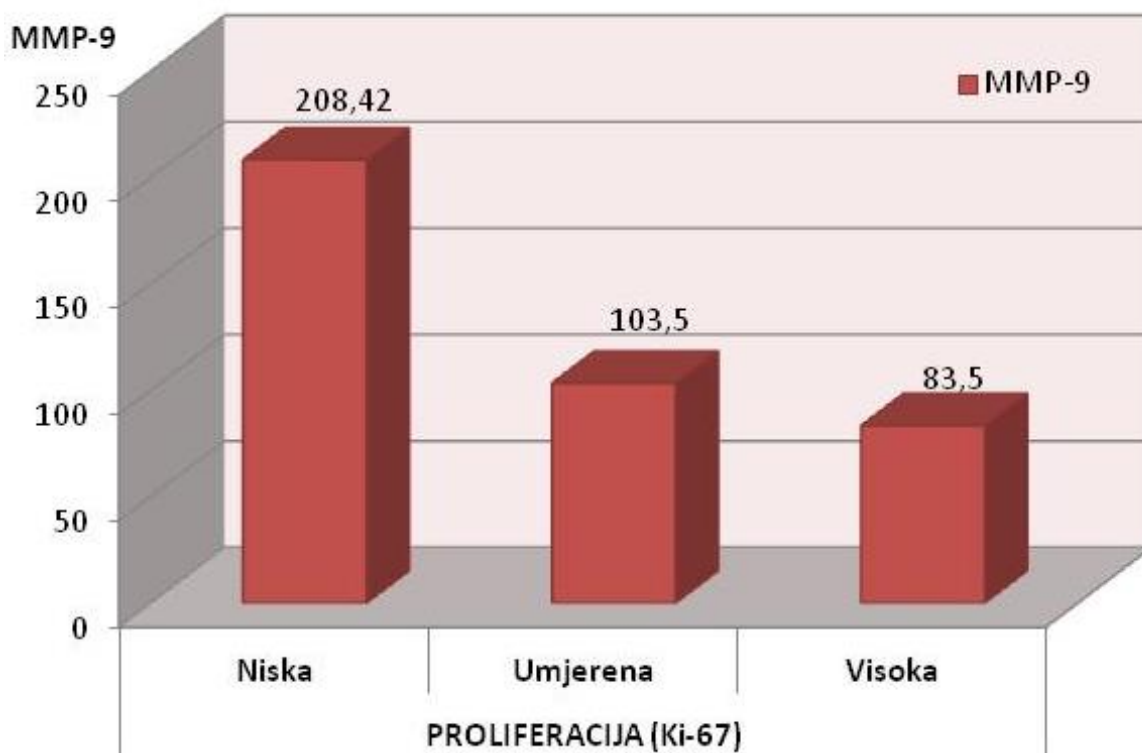


Slika 31. Primarni tumori s koštanim metastazama nuklearnog gradusa 2 imaju značajno jaču ekspresiju MMP-9 nego tumori nuklearnog gradusa 3.

## **Povezanost ekspresije MMP-9 i Ki-67 u primarnim tumorima s koštanim metastazama**

U skupini 16 primarnih tumora s koštanim metastazama analizirali smo povezanost između intenziteta ekspresije MMP-9 i proliferacijskog indeksa Ki-67. Tumori su obzirom na proliferaciju podijeljeni u 3 skupine: niska, umjerena i visoka proliferacija.

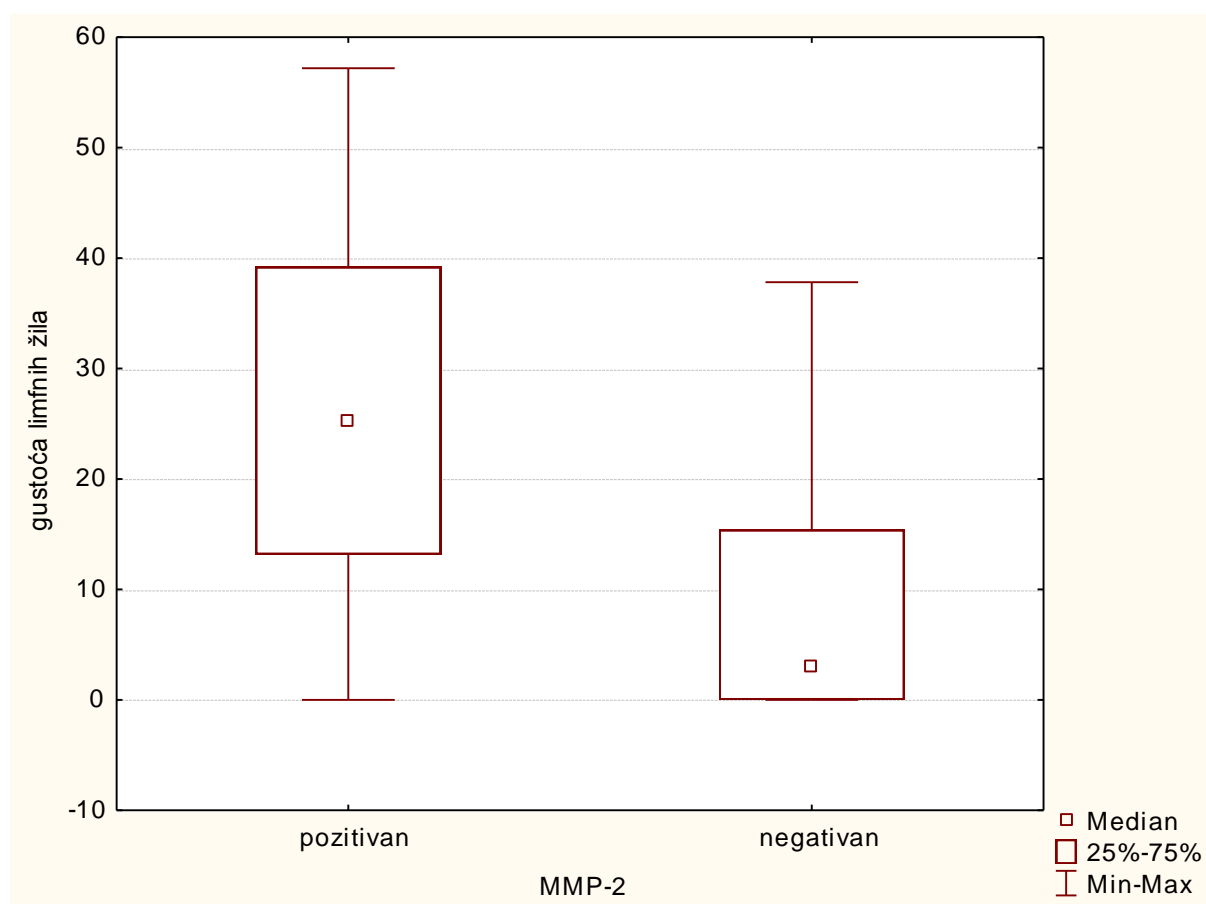
U skupini primarnih tumora s koštanim metastazama postoji negativna korelacija između MMP-9 (histoscore) i proliferacijskog indeksa Ki-67 na statistički značajnoj razini ( $p=0.010$ ). (slika 32).



Slika 32. Negativna korelacija između ekspresije MMP-9 i proliferacije u skupini primarnih tumora s koštanim metastazama.

## Povezanost ekspresije MMP-2 i gustoće limfnih žila u lokalnim recidivima

U skupini od 54 lokalna recidiva analizirali smo međusobnu povezanost intenziteta ekspresije MMP-2 u stanicama strome s gustoćom limfnih žila. Nađena je statistički značajna razlika u gustoći limfnih žila između tumora koji su bili MMP-2 pozitivni i onih koji su bili MMP-2 negativni ( $p=0.0001$ ), kako je prikazano na slici 33.



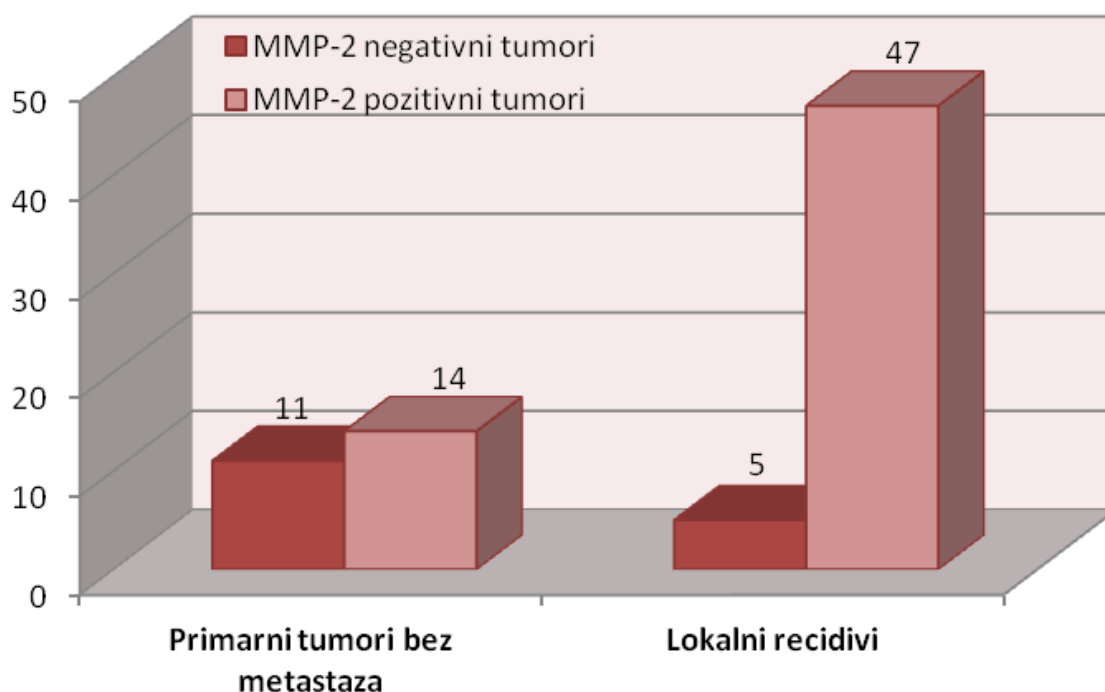
Slika 33. Korelacija između MMP-2 i gustoće limfnih žila u skupini lokalnih recidiva. Može se vidjeti da su MMP-2 pozitivni tumori povezani s povećanom gustoćom limfnih žila, u odnosu na podskupinu MMP-2 negativnih tumora koji su povezani s manjom gustoćom limfnih žila.



#### 4.5.2. Usporedba ekspresije MMP-2 i MMP-9 između definiranih skupina

##### Usporedba ekspresije MMP-2 između primarnih tumora bez metastaza i lokalnih recidiva

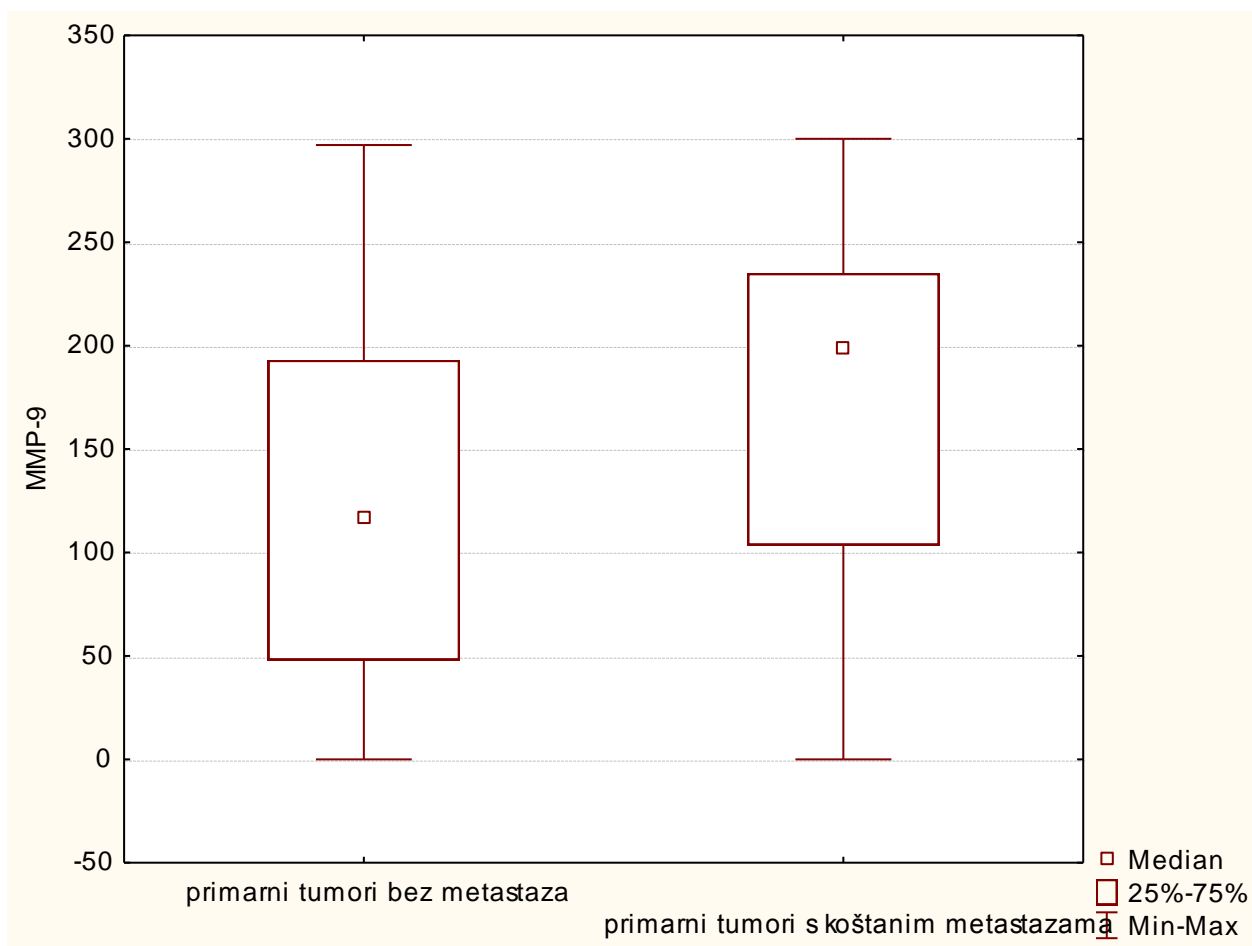
U skupini primarnih tumora bez metastaza kojoj je pripadalo 25 tumora, ukupno 56% (14 tumora) je bilo MMP-2 pozitivno. U skupini lokalnih recidiva kojoj je pripadalo 52 tumora, ukupno 90.4% (47 tumora) je bilo MMP-2 pozitivno. Pokazalo se da je učestalost pozitivne MMP-2 ekspresije statistički značajno veća u skupini lokalnih recidiva u odnosu na skupinu primarnih tumora bez metastaza ( $\chi^2=10.71$ ;  $p=0.001$ ), slika 34.



Slika 34. Učestalost pozitivne ekspresije MMP-2 značajno je viša u skupini lokalnih recidiva u odnosu na primarne tumore bez metastaza.

## Usporedba ekspresije MMP-9 između primarnih tumora bez metastaza i primarnih tumora s koštanim metastazama

U skupini od 25 primarnih tumora bez metastaza i 16 s koštanim metastazama analizirali smo ekspresiju MMP-9 (histoscore). Utvrđeno je da između ove dvije skupine postoji statistički značajna razlika, pa primarni tumori s koštanim metastazama imaju značajno jaču ekspresiju MMP-9 u odnosu na primarne tumore bez metastaza ( $p=0.045$ ) (slika 35).



Slika 35. Ekspresija MMP-9 znatno je jača u primarnim tumorima s koštanim metastazama, nego u primarnim tumorima bez metastaza.

#### **4.6. Analize preživljenja bolesnica s karcinomom dojke**

Praćenje je bilo dostupno za 49 bolesnica, a vrijeme preživljenja izraženo je u mjesecima, od trenutka dijagnoze (datuma operacije) do datuma smrti ili zadnjeg praćenja (1.3.2011.). Medijan preživljenja bio je 98 mjeseci (u rasponu od 4 do 176 mjeseci).

Razdoblje odsustva bolesti (preživljenje bez znakova oblosti) definirano je kao vrijeme (u mjesecima) od datuma dijagnoze primarnog tumora do nastanka prvog povrata bolesti u formi lokalnog recidiva za skupinu bolesnica bez metastaza, ili u formi metastaza u limfnim čvorovima aksile za skupinu bolesnica s aksilarnim metastazama. Razdoblje odsustva bolesti vremenski je podijeljeno u nastanak povrata bolesti prije i nakon 24 mjeseca od datuma dijagnoze.

#### 4.6.1. Razdoblje odsustva bolesti s obzirom na ekspresiju

##### MMP-2 i MMP-9

Kod bolesnica bez metastaza i s aksilarnim metastazama analizirali smo vrijeme bez znakova bolesti u odnosu na ekspresiju MMP-2 i MMP-9. U tablici 19 skupno su prikazani rezultati ove analize.

Tablica 19. Razdoblje odsustva bolesti u odnosu na ekspresiju MMP-2 i MMP-9. U tablici je prikazan broj bolesnica unutar pojedinih podskupina i p vrijednosti dobivene hi kvadat testom.

Razdoblje odsustva bolesti kod bolesnica bez metastaza			
Ekspresija MMP-a u tumorima	≤ 24 mjeseca	≥ 25 mjeseci	P
MMP-2 negativni tm.	6	4	1.000
MMP-2 pozitivni tm.	7	5	
MMP-9 negativni tm.	2	1	1.000
MMP-9 pozitivni tm.	11	8	
Razdoblje odsustva bolesti kod bolesnica s aksilarnim metastazama			
Ekspresija MMP-a u tumorima	≤ 24 mjeseca	≥ 25 mjeseci	P
MMP-2 negativni tm.	6	3	0.682
MMP-2 pozitivni tm.	9	9	
MMP-9 negativni tm.	1	1	1.000
MMP-9 pozitivni tm.	14	11	

Kod bolesnica bez metastaza, između onih koje su imale povrat bolesti prije i nakon 24 mjeseca od datuma dijagnoze, ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji MMP-2 ( $p=1.000$ ), kao niti u ekspresiji MMP-9 ( $p=1.000$ ).

Kod bolesnica koje su imale aksilarne metastaze, isto nema razlike u ekspresiji MMP-2 ( $p=0.682$ ) i MMP-9 ( $p=1.000$ ), ovisno o vremenu proteklom do pojave povrata bolesti.

## 4.6.2. Preživljenje s obzirom na metastaze i ekspresiju MMP-2 i MMP-9 (unutar skupina)

Analizirali smo preživljenje (status živa/umrla) bolesnica bez metastaza, s aksilarnim metastazama i s koštanim metastazama u odnosu na ekspresiju MMP-2 i MMP-9, a podaci su prikazani u tablici 20.

Tablica 20. Preživljenje s obzirom na metastaze i ekspresiju MMP-2 i MMP-9. U tablici je prikazan broj bolesnica unutar pojedinih podskupina i p vrijednosti.

Preživljenje bolesnica bez metastaza			
Ekspresija MMP-a u tumorima	umrla	živa	P
MMP-2 negativni tm.	4	5	1.000
MMP-2 pozitivni tm.	6	7	
MMP-9 negativni tm.	3	1	0.293
MMP-9 pozitivni tm.	7	11	
Preživljenje bolesnica s aksilarnim metastazama			
Ekspresija MMP-a u tumorima	umrla	živa	P
MMP-2 negativni tm.	13	2	<b>0.039</b>
MMP-2 pozitivni tm.	12	11	
MMP-9 negativni tm.	1	1	1.000
MMP-9 pozitivni tm.	24	12	
Preživljenje bolesnica s koštanim metastazama			
Ekspresija MMP-a u tumorima	umrla	živa	P
MMP-2 negativni tm.	6	0	0.067
MMP-2 pozitivni tm.	4	3	
MMP-9 negativni tm.	1	0	0.569
MMP-9 pozitivni tm.	9	3	

Ne postoji statistički značajna razlika u preživljenju **bolesnica bez metastaza** u odnosu na ekspresiju MMP-2 ( $p=1.000$ ), kao niti u odnosu na ekspresiju MMP-9 ( $p=0.293$ ).

Kod **bolesnica s aksilarnim metastazama** postoji statistički značajna razlika u preživljenju u odnosu na MMP-2 ekspresiju. U podskupini bolesnica s MMP-2 negativnim tumorima značajno je više umrlih nego živih, odnosno značajno je više živih bolesnica s MMP-2 pozitivnim, nego s MMP-2 negativnim tumorima (hi kvadrat test,  $p=0.039$ ).

Ne postoji statistički značajna razlika u preživljenju **bolesnica s aksilarnim metastazama** u odnosu na ekspresiju MMP-9 ( $p=1.000$ ).

Kod **bolesnica s koštanim metastazama**, između skupine onih koji su preživjeli i onih koji nisu, ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji MMP-2 ( $p=0.067$ ), kao niti u ekspresiji MMP-9 ( $p=0.569$ ).

### 4.6.3. Preživljenje s obzirom na metastaze i ekspresiju

#### MMP-2 i MMP-9 (usporedba među skupinama)

Analizirali smo preživljenje bolesnica bez metastaza, s aksilarnim metastazama i s koštanim metastazama u odnosu na ekspresiju MMP-2 i MMP-9.

U tablici 17. skupno su prikazani rezultati analize preživljenja bolesnica prema skupinama u odnosu na ekspresiju MMP-2 i MMP-9, prema Kaplan-Meierovoj metodi, a vrednovani log-rank testom. Skupina MMP-9 negativnih tumora bila je premalena za statističku analizu preživljenja.

Tablica 17. Preživljenje između skupina s obzirom na ekspresiju MMP-2 i MMP-9 (crvenim je označen rezultat koji je statistički značajan).

Preživljenje bolesnica bez metastaza i bolesnica s aksilarnim metastazama			
varijabla	log-rank (p)	relativni rizik	95% interval pouzdanosti
MMP-2 negativni tm.	0.278	0.499	0.142 – 1.752
MMP-2 pozitivni tm.	0.381	0.656	0.256 – 1.683
MMP-9 pozitivni tm.	0.141	0.558	0.256 – 1.214
Preživljenje bolesnica bez metastaza i bolesnica s koštanim metastazama			
varijabla	log-rank (p)	relativni rizik	95% interval pouzdanosti
MMP-2 negativni tm.	<b>0.039</b>	<b>0.21</b>	<b>0.047 – 0.927</b>
MMP-2 pozitivni tm.	0.318	0.541	0.162 – 1.806
MMP-9 pozitivni tm.	0.061	0.394	0.149 – 1.044

### **Preživljenje bolesnica bez metastaza i s aksilarnim metastazama u odnosu na ekspresiju MMP-2 i MMP-9**

Ne postoji statistički značajna razlika u preživljenju bolesnica bez metastaza i onih s aksilarnim metastazama u skupini MMP-2 negativnih tumora (log-rank,  $p=0.278$ ), u skupini MMP-2 pozitivnih tumora (log-rank,  $p=0.381$ ), kao i u skupini MMP-9 pozitivnih tumora (log-rank,  $p=0.141$ ).

### **Preživljenje bolesnica bez metastaza i s koštanim metastazama u odnosu na ekspresiju MMP-2 i MMP-9**

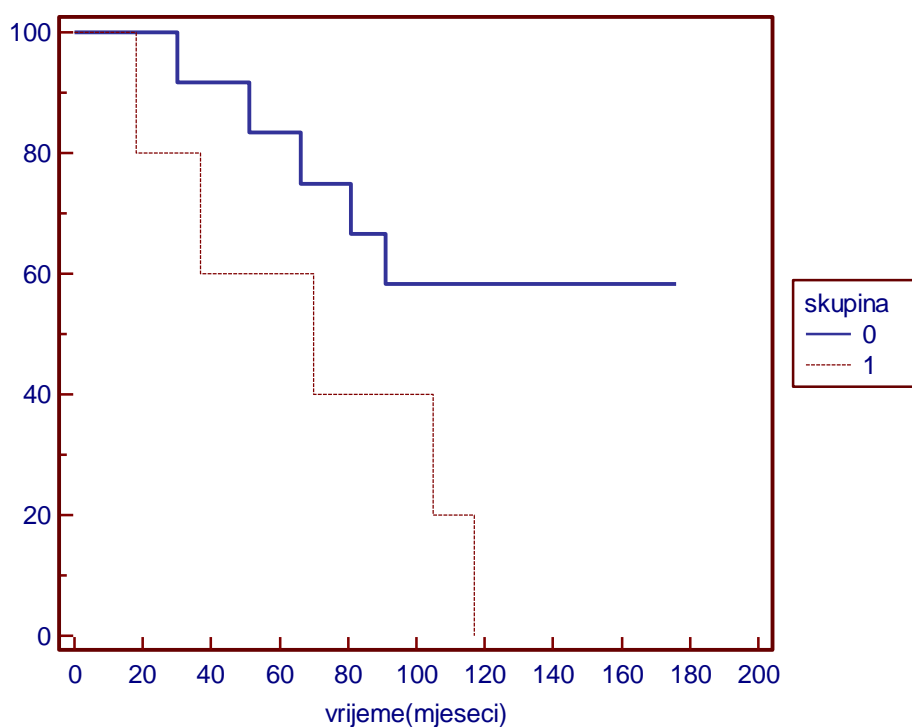
Ne postoji statistički značajna razlika u preživljenju bolesnica bez metastaza i onih s koštanim metastazama u skupini MMP-2 pozitivnih tumora (log-rank,  $p=0.318$ ), kao i u skupini MMP-9 pozitivnih tumora ( $p=0.061$ ).

Međutim, kada smo usporedili preživljenje bolesnica bez metastaza i onih s koštanim metastazama u skupini **MMP-2 negativnih tumora**, log-rank test je pokazao statističku značajnost ( **$p=0.039$** ). Medijan preživljenja (50%-tna vjerojatnost preživljenja izražena u mjesecima) u skupini bolesnica koje su imale koštane metastaze je bio 70 mjeseci, dok je medijan preživljenja za sve bolesnice bez metastaza bio veći od 70. Petogodišnje preživljenje bolesnica bez metastaza bilo je 83%, a onih s koštanim metastazama 60%. Omjer rizika (hazard ratio) u odnosu na smrtni ishod bio je 4.76 za bolesnice s koštanim metastazama, s intervalom pouzdanosti od 95% između 0.047 do 0.927 (što ne uključuje 1), čime je omjer rizika statistički značajan. To znači



da na jednu bolesnicu bez metastaza koja neće preživjeti dolazi 4.76 bolesnica s koštanim metastazama koje neće preživjeti (ili obratno, omjer rizika u odnosu na preživljenje je 0.21, što znači da na jednu bolesnicu bez metastaza koja će preživjeti, dolazi 0.21 bolesnica s koštanim metastazama koja će preživjeti).

Na slici 36 prikazano je **kraće preživljenje bolesnica s koštanim metastazama u odnosu na bolesnice bez metastaza, u skupini MMP-2 negativnih tumora**, Kaplan-Meierovom krivuljom.



Slika 36. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja bolesnica bez metastaza (*skupina 0*) i onih s koštanim metastazama (*skupina 1*), s MMP-2 negativnim tumorima.

#### 4.6.4. Preživljenje prema stadijima u odnosu na ekspresiju

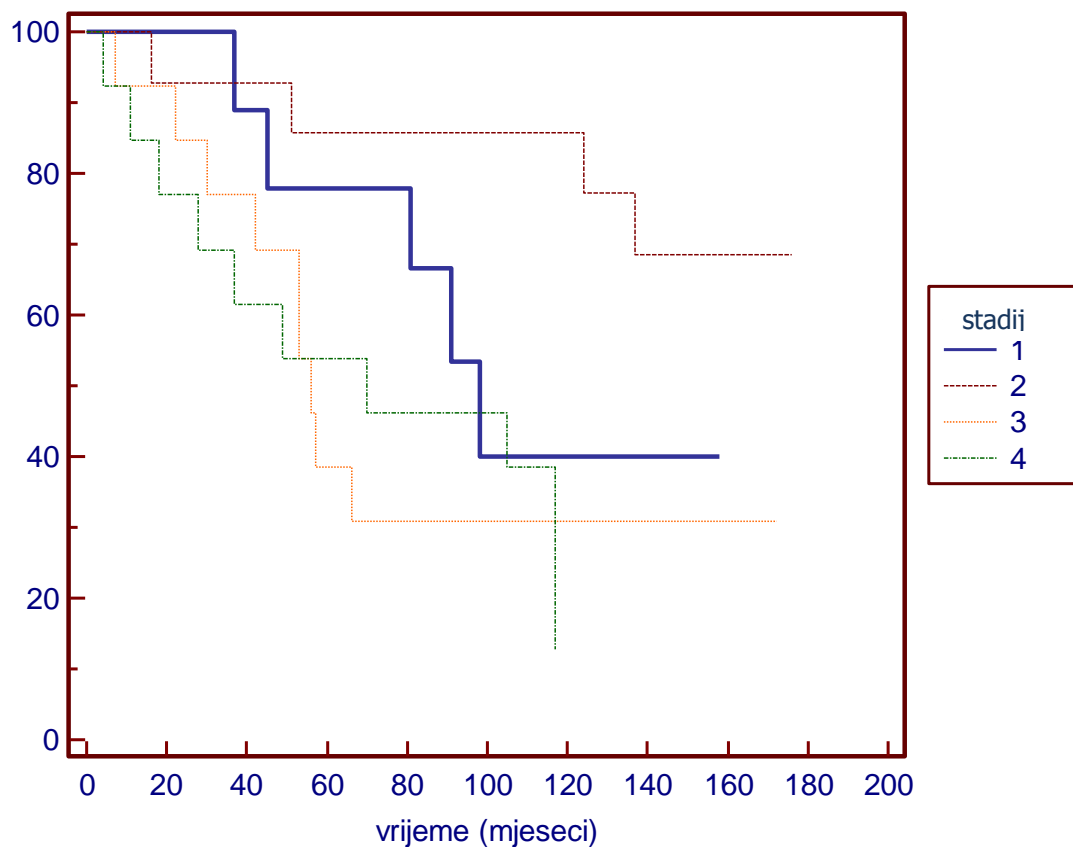
##### MMP-2 i MMP-9

Rezultati analize preživljenja bolesnica prema stadijima, u odnosu na ekspresiju MMP-2 i MMP-9, skupno su prikazani u tablici 18.

Tablica 18. prikazuje preživljenje po stadijima bez obzira na MMP ekspresiju, kao i u odnosu na ekspresiju MMP-2 i MMP-9. Prikazane su p vrijednosti dobivene hi kvadrat testom (crvenim su označene p vrijednosti koje su dosegle statističku značajnost).

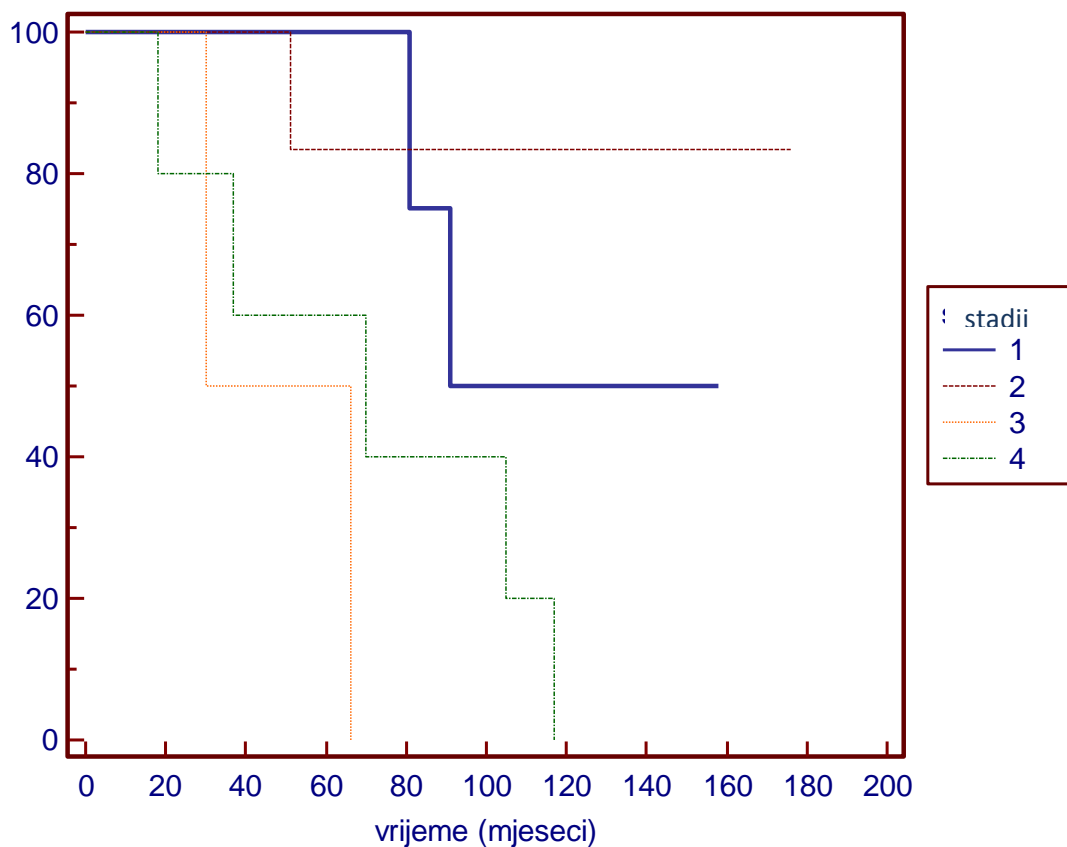
	STADIJI				p
	s medijanom preživljenja (mjeseci)				
	1	2	3	4	
Tumori bez obzira na MMP ekspresiju	98	/	56	70	<b>0.024</b>
MMP-2 pozitivni tm.	98	/	56	83	0.389
MMP-2 negativni tm.	/	/	48	70	<b>0.010</b>
MMP-9 pozitivni tm.	91	/	53	49	<b>0.007</b>

1. Log-rank test pokazao je da postoji inverzna povezanost između stadija bolesti i preživljenja ( $p=0.024$ ), bez obzira na MMP ekspresiju, kako je prikazano na slici 37.



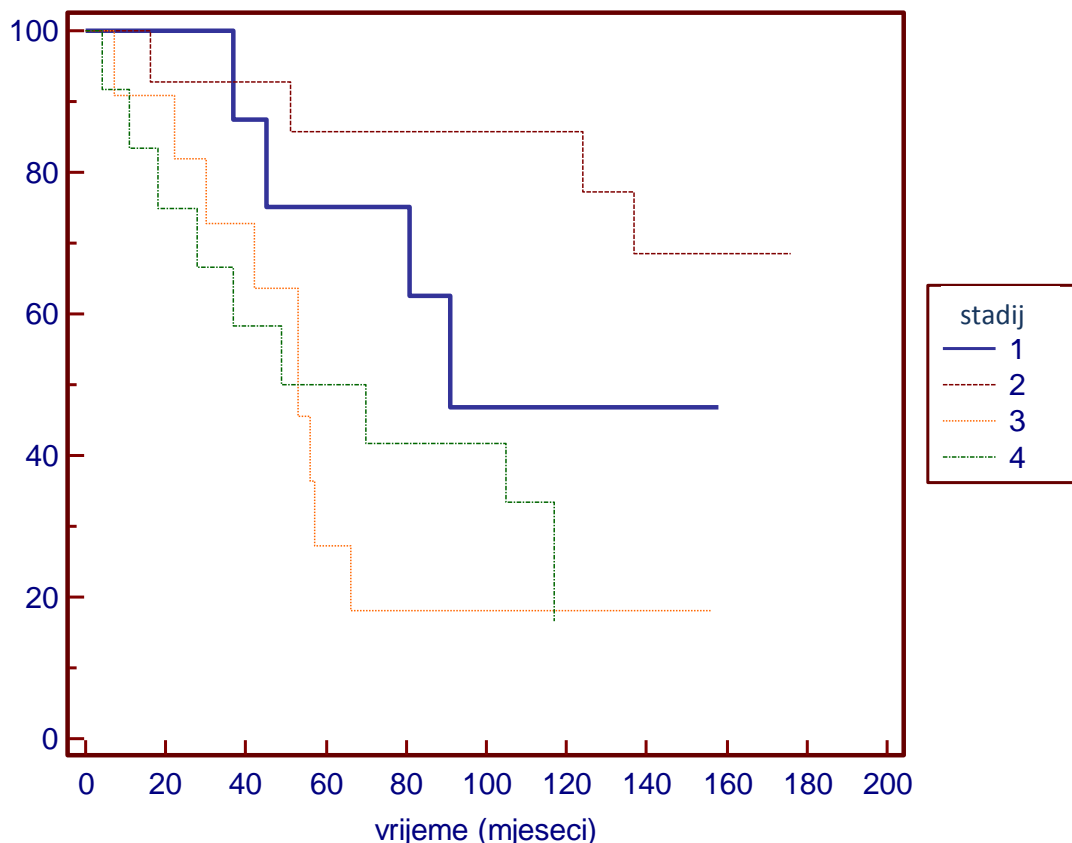
Slika 37. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja bolesnica pokazuje inverznu povezanost stadija bolesti i preživljenja.

2. Analiza preživljenja s obzirom na stadij, u skupini **MMP-2 pozitivnih tumora**, pokazala je da ne postoji inverzna povezanost na statistički značajnoj razini (log-rank;  $p=0.389$ ).
3. Analiza preživljenja s obzirom na stadij, u skupini **MMP-2 negativnih tumora**, potvrđuje inverznu povezanost preživljenja i stadija bolesti (log-rank;  **$p=0.010$** ), kako se vidi na slici 38.



Slika 38. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja prema stadijima, u skupini MMP-2 negativnih tumora.

4. Uzevši unutar svih stadija samo **MMP-9 pozitivne tumore**, log-rank analiza potvrdila je inverznu povezanost stadija i preživljenja (**p=0.007**), kako se vidi na slici 39. U tablici 18 može se vidjeti da su bolesnice s MMP-9 pozitivnim tumorima imale manji medijan preživljenja u stadijima u odnosu na čitavu skupinu bolesnica analiziranu prema stadijima bez obzira na MMP ekspresiju, i da najmanji medijan preživljenja u IV stadiju (u kojem su jedino prisutne koštane metastaze) imaju bolesnice s MMP-9 pozitivnim tumorima (49 mjeseci).



Slika 39. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja prema stadijima s MMP-9 pozitivnim tumorima.

## **5. RASPRAVA**

Povrat bolesti (relaps) u formi metastaza unutar 5 godina od operacije javlja se u otprilike polovice žena s primarnim karcinomima dojke s naoko lokaliziranim tumorima. Međutim, teško je predvidjeti ovaj događaj, jer je karcinom dojke heterogena bolest s različitim patološkim entitetima i širokim rasponom kliničkog ponašanja, čak i u skupini bolesnica koje su klinički slične. Stoga, i unatoč klasičnim prognostičkim pokazateljima, potrebno je identificirati nove prognostičke faktore zbog racionalnijeg liječenja bolesnica s karcinomom dojke.

Tumorska invazija i metastaziranje su primarne odrednice ishoda bolesti, i molekule uključene u ove procese su očigledni kandidati za nove prognostičke markere. S obzirom da su matriksne metaloproteinaze primarno definirane kao molekule s protumorskim djelovanjem, to je i razlog za njihovo istraživanje.

Utjecaj matriksnih metaloproteinaza na biološko ponašanje primarnih tumora sa i bez metastaza (regionalnih i udaljenih), te recidivnih tumora u literaturi nije dovoljno istražen. Premda je poznata uloga metaloproteinaza u angiogenezi, a vrlo malo u limfangiogenezi, rezultati studija donekle su oprečni. Stoga je istraživanje uloge matriksnih metaloproteinaza u procesu progresije karcinoma dojke kroz regulaciju angiogeneze, limfangiogeneze, te hormonskog utjecaja izrazito važno za razumijevanje tumorske biologije.

U ovom istraživanju MMP-9 je snažno eksprimirana u skupini primarnih tumora koji su metastazirali u kosti u odnosu na primarne tumore bez metastaza, u kojima je ekspresija MMP-9 u tumorskim stanicama niska. U skladu s ovim nalazom je i još jedan rezultat ove studije, pri čemu se analiziralo preživljenje bolesnica s MMP-9 pozitivnim tumorima prema stadijima. Naime, odabirom samo MMP-9 pozitivnih tumora dobivena je inverzna korelacija sa stadijima, a u usporedbi sa svim tumorima analiziranim prema stadijima, bez obzira na MMP ekspresiju, MMP-9 pozitivni tumori imali su manji medijan preživljenja, čime je MMP-9 ekspresija povezana s lošijom prognozom.

Međutim, isto smo tako istraživanjem povezanosti ekspresije MMP-9 s histološkim i nuklearnim gradusom (koji predstavlja jedan od faktora za određivanja histološkog gradusa) dobili da je ekspresija MMP-9 značajno viša u tumorima (histološkog i nuklearnog) gradusa 2 u odnosu na gradus 3. Rezultati ove studije podudaraju se s istraživanjem Kohrmanna i suradnika 2009. godine (132) koji su analizirali ekspresiju 14 MMP-ova na 25 tkivnih uzoraka dojke (5 normalnog tkiva, 10 karcinoma gradusa 2 i 10 uzoraka karcinoma gradusa 3) i detektirali visoke razine MMP-9 mRNA u tumorima gradusa 2 u usporedbi s tumorima gradusa 3, gdje su razine bile niske; osim toga detektirali su povišene vrijednosti svih ispitivanih MMP-ova u uzorcima tkiva karcinoma dojke u usporedbi s normalnim tkivom dojke, čime bi MMP-ovi mogli biti povezani s tumorskom progresijom. Wu i suradnici (133) korelirali su serumske nivoe i razinu tkivne ekspresije MMP-9 i TIMP-1 u karcinomima dojke i njihova je ekspresija bila povezana s kliničko-



patološkim karakteristikama. Serumski nivoi MMP-9 i TIMP-a su bili značajno viši u karcinomima dojke, nego u benignim bolestima dojke ili kontrolnoj skupini. Visoke razine tkivne ekspresije, kao i visoke razine serumskog nivoa MMP-9 i TIMP-1 bile su povezane s metastazama u limfne čvorove, višim gradusom tumora, smanjenim periodom relapsa i smanjenim sveukupnim preživljenjem, čime su njihovi rezultati u skladu s našima. Vizoso i suradnici (134) su 2007. godine u svojem istraživanju primarnih invazivnih karcinoma dojke na tkivnim mikroarejama pokazali da je visoka ekspresija MMP-9, MMP-11, TIMP-1 i TIMP-2 značajno povezana s povećanom incidencijom metastaza unutar 5 godina od operacije, što opet govori u prilog agresivnijeg biološkog ponašanja karcinoma dojke koji snažno eksprimiraju MMP-9. Quaranta i suradnici (135) su u 88 bolesnica s karcinomom dojke istraživali povezanost MMP-2 i MMP-9 u serumu, kao i serumske razine VEGF i CA 15.3 prije operacije, i nakon jednog i šest mjeseci nakon operacije. Izvjestili su da nisu pronašli povezanost istraživanih parametara s kliničko-patološkim karakteristikama, kao niti međusobnu povezanost MMP-2 s MMP-9, niti MMP-2 i MMP-9 s VEGF-om. Nadalje, nisu našli korelaciju između serumske ekspresije MMP-2 prije i nakon operacije, sugerirajući da ova gelatinaza možda i nema značajnu ulogu u razvoju tumora. Međutim serumski nivoi MMP-9 drastično su bili smanjeni u bolesnica jedan i šest mjeseci nakon operacije, a ekspresija MMP-9 korelirala je i sa slabijim preživljenjem, čime su ukazali da bi MMP-9 mogla imati prognostičku važnost.

Za razliku od toga, McGowan (136) je 2008. godine istražio povezanost 17 metaloproteinaza u karcinomima dojke s tumorskim karakteristikama i ishodom bolesti. U svojoj je studiji izvjestio da je MMP-9 bila značajno viša u tumorima gradusa 3, u odnosu na one gradusa 1 i 2, kao i da je visoka ekspresija MMP-9 mRNA bila značajno povezana s lošijim sveukupnim preživljenjem, čime je zaključio kako je MMP-9 uključena u tumorsku progresiju, povezana s lošim preživljenjem, i kao takva predstavlja osnovu za ciljanu terapiju specifičnim MMP inhibitorima u liječenju karcinoma dojke.

Di Carlo sa suradnicima (137) navodi kako je omjer MMP-9 i MMP-2 uvećan u bolesnica s karcinomom, u usporedbi s onima koji su zdravi ili su imali benignu bolest. Stoga, visoka koncentracija ovih proteaza primijećena u tumorskim stanicama, fibroblastima strome i upalnim stanicama korelira s tumorskom invazijom, metastatskim potencijalom i lošom prognozom.

U istraživanju iz 2006. pokazano je kako kompleks i zajednička ekspresija MMP-14, TIMP-2 i MMP-2 predstavljaju prediktore loše prognoze kod karcinoma dojke, ali rezultat nije dostigao statističku značajnost. Premda je MMP-14 bio snažno povezan s prognozom, bio je ovisan o HER2, što ga potencijalno ograničava kao neovisnog prognostičkog markera (138).

Pellikainen i suradnici (139), istraživali su ekspresiju MMP-2 i MMP-9 u karcinomu dojke i njihovi su rezultati pokazali kako je snažna MMP-9 ekspresija u tumorskim stanicama povezana s duljim razdobljem odsustva bolesti s boljim sveukupnim preživljenjem. Međutim, u svom istraživanju su koristili protutijela koje su prepoznala molekulu proMMP-2 i oba oblika

MMP-9: i proMMP-9 i aktivni oblik MMP-9, u odnosu na naše istraživanje u kojem su protutijela usmjerena samo na aktivne oblike MMP-2 i MMP-9. Osim toga, pozitivnost imunohistokemijski obojanih tkiva bio je prisutan u citoplazmi i tumorskih i stromalnih stanica, koje su odvojeno i prikazali u odnosu na preživljenje. U našem istraživanju, MMP-2 eksprimirala se samo u stromalnim stanicama, a MMP-9 u tumorskim. Razlika u metodologiji i broju uzoraka mogla je dovesti do diskrepanci u rezultatima, koja i inače postoji u studijama koje se bave metaloproteinazama. Postoje razni načini određivanja pozitivnosti, i premda svi istraživači prepoznaju smeđu obojenost citoplazme tkiva kao pozitivnost, način u kvantifikaciji i određivanju graničnih vrijednosti je različit. Osim toga, postoji i različito selektiranje i grupiranje podataka, a to sve skupa vjerojatno doprinosi i različitim rezultatima studija.

Limfangiogeneza igra značajnu ulogu u tumorskoj biologiji, stoga što je povezana s formiranje limfatičnih metastaza. Indirektni dokazi da su matriksne metaloproteinaze uključene u proces limfangiogeneze potkrijepljeni su brojnim istraživanjima MMP-inhibitora - TIMP-ova. Nakamura je sa suradnicima (126) ispitivao antimetastatsku sposobnost sintetskog inhibitora metaloproteinaze - MMI270 na mišjem modelu metastatskog limfnog čvora karcinoma pluća. Primjetio je da MMI270 utječe na znatno manju težinu metastatskog limfnog čvora. Stoga je proširio istraživanje i ispitao antilimfangiogene i antiinvazivne efekte MMI270 in

vitro. To je ujedno bilo i prvo istraživanje o MMP-2, MMP-9 i MT1-MMP na mišjem modelu limfatičnih endotelih stanica. Zaključio je da inhibitor metaloproteinaza osim što inhibira aktivnosti MMP-2 i-9 koje su stvorile stanice karcinoma pluća, inhibira i invazivnu sposobnost karcinomskih stanica kroz Matrigel. To znači da se inhibicijom MMP-2 i MMP-9 umanjila angiogeneza i limfangiogeneza, kao i broj limfatičnih metastaza, što ukazuje na protumorsku i proangiogenu ulogu obje metaloproteinaze.

Ueno (140) je sa suradnicima istraživao jačinu ekspresije tri različita tipa MT-MMP, i to MT1-, MT2- i MT3-MMP za koje se smatra da aktiviraju pro-MMP-2 u karcinomu dojke. Najjače se ekspimirao MT1-MMP, čiji je nivo ekspresije korelirao s prisutnošću metastaza u limfnim čvorovima i udaljenim sijelima, kliničkim stadijem i veličinom tumora. Aktivacija pro-MMP-2 bila je značajno viša u karcinomima koji su metastazirali u limfne čvorove ili u udaljena sijela u odnosu na karcinome bez metastaza. Pojačana aktivacija proMMP-2 korelirala je s ekspresijom MT1-MMP, čime se došlo do zaključka da MT1-MMP ima ključnu ulogu u invaziji i metastaziranju karcinoma dojke u ljudi, putem aktivacije proMMP-2.

Međutim, postoji relativno mali broj istraživanja koji povezuje MMP-ove sa stvaranjem novih limfatičnih žila. Najdirektniji dokaz toga dolazi iz eksperimentalnog modela limfangiogeneze koji je napravio Bruyere (141). Ovaj model dokaz je da postoje različiti koraci u limfangiogenezi, uključujući stvaranje novih limfnih žila iz prethodno postojećih, i to staničnom proliferacijom, migracijom i diferencijacijom u kapilare. Bruyere je pokazao

da se aktivacija MMP-2 vjerojatno događa na površini stanice u kolagenom matriksu, a TIMP-2 koji je fiziološki inhibitor metaloproteinaza, inducira smanjeno formiranje limfatične mreže ovisno o primjenjenoj dozi. Osim toga, RO-28-2653 - sintetski inhibitor MMP-a, čije su ciljne molekule uglavnom MMP-2, MMP-9 i MMP-14, inhibira rast limfnih žila. Najvažniji rezultat ove studije je da prsteni duktusa toracikusa koji su potekli iz MMP-2 nul miševa pokazuju oštećenu limfangiogenezu u usporedbi s divljim tipom miševa. Ovi podaci pokazuju da je MMP-2 važan faktor limfangiogeneze i to je do danas najdirektniji (eksperimentalni) dokaz o povezanosti MMP i limfangiogeneze.

Rezultati ovih istraživanja u skladu su s rezultatima dobivenim u ovoj studiji, gdje se pokazalo da recidivni tumori koji snažno eksprimiraju MMP-2 imaju veći broj limfnih žila u usporedbi s onim tumorima koji imaju slabu MMP-2 ekspresiju i značajno manji broj limfnih žila. Time se dovodi u pozitivnu korelaciju jačina ekspresije MMP-2 i limfangiogeneza. Osim toga, u našoj studiji je pokazano i da recidivni tumori pokazuju jaču ekspresiju MMP-2 nego primarni tumori bez metastazama. U skladu s ovim rezultatima su i rezultati studije Langenskiöld i suradnika (142), koji su istraživali ekspresiju MMP-1, MMP-2, MMP-3 i MMP-9 tumorskom tkivu kolorektalnog karcinoma i okolnom netumorskom tkivu. Našli su izrazito povišene koncentracije MMP-1, MMP-2, MMP-3 i MMP-9 proteinske ekspresije u tumorskom tkivu u odnosu na normalno tkivo debelog crijeva. Status limfnih čvorova korelirao je s nivoom MMP-2 u plazmi, i bio je značajno povišen u bolesnika s metastatskim limfnim čvorovima u usporedbi s bolesnicima bez nodalnih metastaza. Osim toga, nivo MMP-2 u plazmi bio je viši u T3 i T2

tumorima u odnosu na T4 tumore. Tako njihovi rezultati govore da nivo MMP-2 u plazmi može vjerojatno biti upotrijebljen kao prediktor u kolorektalnom karcinomu. Osim toga, indirektno se može zaključiti da istraživane metaloproteinaze imaju prolimfangiogenu ulogu.

Matriksne metaloproteinaze razgrađuju vaskularnu bazalnu membranu i proteine ECM-a, utječući tako na migraciju endotelnih stanica i formaciju novih krvnih žila. Proangiogeni citokin VEGF-A stimulira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica i pod utjecajem je MMP-9, što dokazuju brojne eksperimentalne studije. Tijekom karcinogeneze pankreasnih otočića u transgeničnim miševima, angiogena sklopka („switch“) aktivira uspavanu vaskulaturu, a pokazalo se da MMP-9 u tome ima ulogu, jer može normalne otočiće učiniti angiogenim otpuštajući VEGF. Vidjelo se da MMP inhibitori reduciraju angiogenu sklopku, kao i broj tumora i njihov rast. Isti učinak postiže se i genetičkom ablacijom MMP-9. Rezultati ove studije pokazuju da je MMP-9 komponenta angiogene sklopke (116).

Lee je 2005. godine testirao hipotezu da VEGF može biti supstrat MMP-ovima; učinio je to in vitro eksperimentom i dokazao da nekoliko MMP-ova, između ostalog MMP-9 može cijepati izoforme VEGF-a vezane uz matriks i na taj način se stvaraju njegovi otopljeni fragmenti. Ti fragmenti izazivaju kapilarnu dilataciju postojećih žila i posreduju u rubnoj neovaskularizaciji tumora. VEGF izoforme koje su otporne na cijepanje MMP-om izazivaju drugi

obrazac vaskularnog signaliranja, što uključuje izraziti rast tankih žila s brojnim točkama grananja. To je još jedan dokaz o povezanosti MMP-9 i VEGF-A (121).

U ovom istraživanju, u skupini primarnih tumora bez metastaza i onima s koštanim metastazama, može se uočiti negativna korelacija između ekspresije MMP-2 u stanicama tumorske strome i intenziteta ekspresije VEGF-A u tumorskim stanicama, čime se u ovom istraživanju ne može definirati proangiogeni učinak MMP-2 mehanizmom koji uključuje VEGF-A. Vjerojatno dolazi do pojačane ekspresije VEGF-A u tumorskim stanicama neovisno o MMP-2, a u bioregulatorne mehanizme se uključuju druge molekule, koje su izvan dometa ovog istraživanja. Nedostatak povezanosti između MMP-2 s ekspresijom VEGF-A mogao bi ukazati na to da ova proteaza, kao i VEGF-A ovisi o aktivnosti tumora, a ne o stadiju bolesti ili histološkom tipu tumora. Isto je tako moguće da MMP-ove ne produciraju direktno samo tumorske ili stromalne stanice, nego da postoje i neka druga mjesta odgovorna za povećane nivoe ekspresije proteinaza koja koreliraju s postojanjem tumorskog tkiva. Eccles u svom radu iznosi činjenicu da tijekom angiogeneze, "invazija" kapilarnih pupoljaka zahtijeva lokalnu proteolizu, koja je dijelom regulirana putem MT1-MMP, MMP-2, MMP-9 zajedno s uPA, a za MMP-9 je poznato da je implicirana u angiogenu sklopku (switch) otpuštajući VEGF njegovim cijepanjem u ECM. Međutim i MT1-MMP pojačava ekspresiju VEGF-A, čak u MMP-2 negativnim stanicama, stoga je ovo predloženi novi mehanizam aktivacije i pojačane ekspresije VEGF-A neovisan o MMP-2 (143).

Postoji studija na kulturi ljudskih retinalnih pigmentnih epitelnih (RPE) stanica (144) koja je istražila mijenja li direktna MMP-2 ili MMP-9 stimulacija stanica gensku ekspresiju ili sekreciju VEGF-A. Pokazalo se da egzogena MMP-9, izaziva prolazno povećanje genske i proteinske ekspresije VEGF-A u retinalnih pigmentnim epitelnim stanicama, dok egzogena MMP-2 reducira sekreciju VEGF. Stoga se može reći da MMP-9, osim što proteolizom razgrađuje bazalne membrane i komponente ECM-a, olakšava neovaskularizaciju direktnom stimulacijom ekspresije angiogenih faktora u RPE. Na taj bi način inhibicija MMP-9 mogla biti obećavajuća metoda za poboljšanje učinkovitosti anti-VEGF terapije u okularnim neovaskularizacijama. Ovo je primjer direktne negativne veze između MMP-2 i VEGF-A, koja postoji i u našim rezultatima.

Povezanost preživljenja i MMP-2 ekspresije u ovom istraživanju pokazala se kroz više nivoa. Prvo, kada smo usporedili preživljenje bolesnica s koštanim metastazama u usporedbi s onima bez metastaza, a uzevši u obzir samo MMP-2 negativne tumore, pokazalo se da postoji signifikantno kraće preživljenje u bolesnica s koštanim metastazama. Petogodišnje preživljenje bolesnica bez metastaza bilo je 83%, a onih s koštanim metastazama 60%. Omjer rizika u odnosu na smrtni ishod bio je 4.76 za bolesnice s koštanim metastazama. Zatim, kad smo promatrali preživljenje u odnosu na stadije bolesti, vidjelo se da postoji njihova inverzna povezanost, koja nestaje na statistički značajnoj razini kad se u obzir uzmu samo MMP-2 pozitivni



tumori. Ali uzevši u obzir samo MMP-2 negativne tumore, opet se javlja inverzna korelacija na statistički značajnoj razini, između preživljenja i stadija. I na kraju, analizirali smo povezanost ekspresije MMP-2 i MMP-9 u odnosu na status živa/umrla, unutar skupina bolesnica bez metastaza, s aksilarnim metastazama i s koštanim metastazama. Statistička analiza je potvrdila da usporedbom živih i umrlih u skupini bolesnica s aksilarnim metastazama u odnosu na MMP-2 ekspresiju, postoji statistički značajna razlika; u podskupini bolesnica s MMP-2 negativnim tumorima značajno je više umrlih nego živih. Sve provedene analize preživljenja u odnosu na MMP-2 ukazuju na isto: MMP-2 negativnost, koja se u ovom istraživanju eksprimirala u stromi, povezana je sa slabijom prognozom.

Rezultat koji nije u skladu s našim, dobiven je u studiji Leppa i suradnika (145), koji su u 133 bolesnica određivali serumske razine MMP-2 i MMP-9 u primarnim nemetastatskim karcinomima dojke. Dobili su da je sveukupno preživljenje, kao i razdoblje odsustva bolesti bolje u skupini bolesnica s niskim razinama MMP-2, nego u onih s visokim, a prognostička vrijednost MMP-2 nivoa bila je još više izražena u podskupini ER+ bolesnika, dok MMP-9 nije korelirala s preživljenjem. U još jednom istraživanju Talvensaari (146) i suradnika, koja je istraživala skupinu od 453 bolesnika s karcinomom dojke, pokazano je da postoji povezanost MMP-2 negativnosti sa statistički značajno boljom prognozom, u hormonski negativnim tumorima, što nije u skladu s našim rezultatima. Iz ovih studija može se zaključiti da je pojačana ekspresija MMP-2 povezana s progresijom karcinoma dojke, a niske razine MMP-2 utječu na bolju prognozu kod bolesnika s hormonski neovisnim

tumorima. Ideja koja se nameće je da se blokiranjem MMP-2 sekrecije i aktivacije tijekom razvoja karcinoma dojke može smanjiti metastaziranje.

Postoji istraživanje na nemetastatskim karcinomima debelog crijeva (147), u kojem je imunohistokemijski procijenjena prognostička uloga MMP-2 na 152 tumora. Pozitivnost se ekspimirala na karcinomskim stanicama, a njegova jaka ekspresija bila je prediktor loše prognoze. Ovaj se rezultat ne podudara s našim rezultatom, a objašnjenje možda leži u protutijelu, koje je u prikazanoj studiji reagiralo s proMMP-2 i aktivnim oblikom MMP-2, a pozitivnost se ekspimirala u tumorskim stanicama, dok je u našem istraživanju MMP-2 protutijelo imalo specifičnost samo za aktivni oblik MMP-2 i pozitivnost se ekspimirala u stromalnim stanicama. Osim toga, vjerojatno postoji i različita tkivna specifičnost u ekspresiji MMP-2, pa i to može biti razlog drugačijeg rezultata.

Steroidni hormoni – estrogen i progesteron su već davno prepoznati u transformaciji normalnog žljezdanog tkiva dojke u maligno. Iako se ER i PR ekspimiraju u malom broju normalnih žljezdanih stanica, otprilike 2/3 karcinoma ekspimirira ER, a 1/2 i ER i PR, dok samo 1/3 ne ekspimirira oba receptora (148).

U našem istraživanju, u skupini primarnih tumora s metastazama u regionalne limfne čvorove, analizom ekspresije MMP-9 i ER statusa, pokazalo se da su ER pozitivni tumori povezani s jačom ekspresijom MMP-9. Nadalje,

u skupini primarnih tumora s koštanim metastazama uvidjelo se da postoji negativna korelacija između MMP-9 i proliferacije.

Rast mnogih karcinoma dojke je hormonski ovisan. Koncentracija estrogena u tumorskom tkivu dojke je nekoliko puta veća nego koncentracija u plazmi postmenopauzalnih žena. Ekspresija enzima aromataze, koja pretvara androgene u estrogene, u karcinomskim i stromalnim stanicama ukazuje na to da in situ sinteza estrogena ima ulogu u formaciji tumora. Vežanje estrogena za receptor u hormonski-ovisnim tumorima stimulira njihov rast. Stoga je cilj hormonske terapije blokirati estrogen prije vezanja za receptor na tumorskoj stanici (antiestrogena terapija) ili inhibirati biosintezu estrogena (inhibitorima aromataza, npr. letrozol). U jednoj grčkoj studiji (149), na kulturi humanih karcinomskih ER+ stanica dojke, istraživali su utjecaj letrozola na invaziju i metastatski potencijal putem MMP-ova. Rezultati su pokazali da egzogeni  $17\beta$  estradiol pojačava oslobađanje MMP-a iz tumorskih stanica, vežući se za svoj stanični receptor. Ovaj rezultat je u skladu s našim, i vjerojatno može objasniti pozitivnu korelaciju između MMP-9 i ER.

Postoji još nekoliko istraživanja, koji pokazuju da estrogen regulira aktivnost MMP-2 i MMP-9 u ER+ karcinomskim stanicama dojke (150) i da postoji pozitivna korelacija između ERa ekspresije i efekata estrogena na MMP gensku ekspresiju u karcinomskim stanicama dojke (151). Rajoria (152) je na staničnim linijama karcinoma štitnjače, koja je kao i karcinom dojke ovisna o hormonima, ispitivao svojstva prirodnog dijetetskog sastojka koje je

može naći u kruciferanom povrću – 3,3'-diindolilmetan (DIM) u odnosu na metastatski fenotip karcinomskih stanica štitnjače putem funkcionalnog estrogenskog receptora. Rezultati studije pokazali su da DIM eksprimira antiestrogensku aktivnost inhibirajući estradiolom pojačanu proliferaciju stanica karcinoma štitnjače i in vitro znakove metastaziranja (adheziju, migraciju i invaziju). Otkrili su i da su MMP-2 i MMP-9 ciljne molekule DIM-a; naime MMP-2 i MMP-9 sekrecija bila je povećana kad su se ER<sup>+</sup> stanice karcinoma štitnjače tretirale estrogenom, a suprimirale tretmanom s DIM-om. To je ukazalo na korelaciju između estrogena i ER-a u odnosu na regulaciju MMP sekrecije.

Poznato je naime da su ER, PR i HER2 status tri značajne molekularne karakteristike karcinoma dojke. ER i PR su faktori nuklearne transkripcije koji reguliraju rast stanice i uobičajeno se procjenjuju imunohistokemijski, a količina ekspimiranog proteina direktno je povezana s odgovorom na endokrinu terapiju, što ih čini dobrim prediktivnim faktorima. Bez obzira na te poznate činjenice, ER, PR i HER2 još uvijek ne mogu predvidjeti točan odgovor na terapiju u mnogih bolesnika, što motivira na dodatna istraživanja novih i snažnih faktora (153).

Prikazani rezultati raznih studija su prilično različiti. Jedno od objašnjenja je i intratumorska heterogenost. Postoje dvije hipoteze za njezino objašnjenje (7):

1. hipoteza tumorske matične stanice u kojoj tumorske stanice imaju karakteristike matične stanice i od nje mogu nastati stanice potomci s različitom diferencijacijom
2. hipoteza klonalne evolucije objašnjava heterogenost kao posljedicu genomske nestabilnosti, koja rezultira stalnim stjecanjem somatskih promjena, kombiniranih s klonalnom selekcijom tumorskih stanica s najadekvatnijim fenotipom.

Hipoteza tumorskih matičnih stanica ima ograničenja u objašnjavanju određenih kliničkih karakteristika tumora kao što su rezistencija klonova na liječenje nakon primarnog tretmana.

Hipoteza klonalne evolucije s druge strane predlaže da iako postoji dominantni klon unutar tumora, postoje i brojni drugi klonovi. Ovisno o promjenama u okolišu ili zbog terapijske intervencije, identitet dominantnog klona može se mijenjati kako tumor progredira. Kao posljedica, heterogeni tumori s izrazito velikom razlikom u klonalnosti skloniji su progresiji i rezistenciji na terapiju. Jednu od najsveobuhvatnijih studija koja se bavi ovom problematikom vodio je Maley i suradnici (154), a istraživanje je bilo usmjereno na premalignu leziju jednjaka poznatu kao Barrett-ov ezofagus. Oni su razrezali ove premaligne lezije na komadiće veličine 1 cm i svaki od njih analizirali s obzirom na DNA sadržaj i genetske promjene, uključujući

mutacije p53 i CDKN2A, kao i gubitak heterozigotnosti na brojnim lokusima. Zaključak studije bio je da veća klonalna različitost predviđa veći rizik progresije u invazivni karcinom.

Prognostički i prediktivni faktori predstavljaju važno oruđe za individualizaciju terapije bolesnika s karcinomom dojke, omogućavaju učinkovito liječenje i štede bolesnike s nisko rizičnim tumorima od neželjenih nuspojava zbog pretjeranog liječenja (overtreatment).

Matriksne metaloproteinaze su velika i raznolika skupina enzima, čije funkcionalne razlike, kao i mnogobrojni putevi kojima su uključene u tumorsku progresiju tek izbijaju na površinu. Postavlja se pitanje zašto ima tako mnogo različitih MMP molekula: možda zbog brojnih i raznovrsnih supstrata, različite regulacije ili tkivne ekspresije? Tijekom zadnjeg desetljeća, postalo je jasno da MMP rade puno više od jednostavne razgradnje strukturnih proteina ekstracelularnog matriksa zbog promoviranja invazije i metastaziranja. Da li onda brojne i protivne funkcije metaloproteinaza utječu na tumorsku progresiju ili inhibiciju? Jesu li matriksne metaloproteinaze „dobre“ ili „loše“?

Većina literature podržava ideju da MMP ipak promoviraju tumorsku progresiju, a ne tako mnogo istraživanja definiralo je MMP kao negativne regulatore tumorske progresije. To je možda i razlog zašto rezultati

ispitivanja MMP inhibitora nisu toliko ohrabrujući. Zato je važno bolje okarakterizirati antitumorske funkcije MMP-ova, ne bi li se iskoristili u terapijske svrhe.

Istraživanjem razlike u ekspresiji matriksnih metaloproteinaza na uzorcima tkiva karcinoma dojke - primarnih nemetastatskih tumora, primarnih tumora s metastazama u regionalnim limfnim čvorovima ili u udaljenim sijelima i u lokalnim recidivnim tumorima, cilj je bio odgovoriti na pitanje imaju li MMP-2 i MMP-9 ulogu u tumorskoj progresiji i jesu li povezane s prognozom bolesti. U ovom istraživanju pokazalo se da bolesnice s pozitivnom ekspresijom MMP-9 i negativnom ekspresijom MMP-2 imaju lošije preživljenje.

## **6. ZAKLJUČCI**



1. Imunohistokemijska analiza matriksnih metaloproteinaza pokazala je da se MMP-2 eksprimira u stromalnim stanicama karcinoma dojke, i to predominantno u fibroblastima i endotelnim stanicama, difuzno u citoplazmi, dok se MMP-9 eksprimira difuzno u citoplazmama tumorskih stanica.
2. Ispitivanjem ekspresije MMP-a i patohistoloških karakteristika, statističke analize su potvrdile da postoji pozitivna povezanost između MMP-9 i histološkog gradusa ( $p=0.019$ ), nuklearnog gradusa ( $p=0.039$ ) i ER pozitivnosti ( $p=0.039$ ), a negativna s proliferacijskim indeksom ( $p=0.010$ ).
3. Ispitivanjem ekspresije MMP-a i angiogeneze, kao i limfangiogeneze, utvrđeno je da MMP-2 negativno korelira s ekspresijom VEGF-A u skupini primarnih nemetastatskih tumora ( $p=0.003$ ) i u skupini primarnih tumora s koštanim metastazama ( $p=0.049$ ), a pozitivno korelira s povećanim brojem limfnih žila u skupini recidivnih tumora ( $p=0.0001$ ).
4. Usporedbom ekspresije MMP-a između definiranih skupina, vidjelo se da postoji jača ekspresija MMP-2 u recidivnim tumorima u odnosu na primarne nemetastatske tumore ( $p=0.001$ ), odnosno da postoji jača ekspresija MMP-9 u skupini primarnih tumora s koštanim metastazama u odnosu na primarne nemetastatske tumore ( $p=0.045$ ).

5. Analize preživljenja s obzirom na metastaze, koštane odnosno limfogene u aksilarnim limfnim čvorovima, pokazale su da je preživljenje značajno kraće u bolesnica s koštanim ( $p=0.039$ ), odnosno aksilarnim metastazama ( $p=0.039$ ) čiji su tumori MMP-2 negativni.
  
6. Analize preživljenja s obzirom na stadij bolesti potvrdile su inverznu povezanost stadija i preživljenja bolesnica s MMP-9 pozitivnim tumorima ( $p=0.007$ ), odnosno s MMP-2 negativnim tumorima ( $p=0.010$ ).

## 7. LITERATURA

1. Colleoni M, Zahrieh D, Gelber RD i sur. Site of Primary Tumor Has a Prognostic Role in Operable Breast Cancer: The International Breast Cancer Study Group Experience. *J Clin Oncol* 2005;23:1390-400.
2. Hazrah P, Dhir M, Gupta SD, Deo V, Parshad R. Prognostic significance of location of the primary tumor in operable breast cancers. *Indian J Cancer* 2009;46:139-45.
3. Boecker W. Preneoplasia of the breast. A new conceptual approach do proliferative breast disease. Elsevier Saunders, Munich 2006, 1-28.
4. Kumar R, Abbas A, DeLancex A, Malone E, ur. Pathologic basis of disease. Eighth edition. Philadelphia: Elsevier; 2010, str. 1065-95.
5. Tavassoli FA, Devilee P, eds. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, France: IARC Press; 2003, str. 9-110.
6. Azzopardi JG. Problems in Breast Pathology. W.B. Saunders: Philadelphia, 1978:193-202.
7. Polyak K. Is breast tumor progression really linear? *Clin Cancer Res* 2008;14:339-41.
8. Perou CM, Sorlie T, Elsen MB. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-52.
9. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R i sur. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-74.

10. Yang XR, Sherman ME, Rimm DL i sur. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:439-43.
11. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K i sur. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5367-74.
12. Carey LA, Perou CM, Livasy CA i sur. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006;295:2492-502.
13. Page DL. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 1991;15:334-49.
14. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-7
15. Fitzgibbons PL, Page, DL, Weaver D i sur. Prognostic Factors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966-78.
16. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Tr* 2008;107:309-30.
17. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;22:207-19.
18. Ellis IO, Elston CW. Histologic grade. U: O'Malley FP, Pinder SE, ur. *Breast pathology*. Philadelphia, PA: Elsevier, 2006; str. 225-33.
19. Lee AHS, Pinder SE, Macmillan RD i sur. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer* 2006;42:357-62.

20. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr-Relat Cancer* 2010;17:245-62.
21. Linderholm B, Andersson J, Lindh B, Beckman L i sur. Overexpression of c-erbB-2 is related to a higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and constitutes an independent prognostic factor in primary node-positive breast cancer after adjuvant systemic treatment. *Eur J Cancer* 2004;40:33-42.
22. Azambuja E, Cardoso F, Castro Jr G i sur. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Brit J Cancer* 2007;96:1504–13.
23. Marks A, Sutherland DR, Bailey D i sur. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumors. *Br J Cancer* 1999;80:569–8.
24. Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 2002;15:434 –40.
25. Newman PJ. The Biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997;99:3-8.
26. Sun J, Paddock C, Shubert J, Zhang HB i sur. Contributions of the extracellular and cytoplasmic domains of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) in regulating cell-cell localization. *J Cell Sci* 2000;113:1459-69.
27. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto, Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 2003;28:488-94.

28. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002;200:581-97.
29. Weinstein BM. What guides early embryonic blood vessel formation? *Dev Dyn* 1999;215:2-11.
30. Rakesh K Jain. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*. 2003;9:685-693.
31. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S i sur. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996;122:3829-37.
32. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A i sur. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J*, 1996;15:290-8.
33. Joukov V, Sorsa T, Kumar V i sur. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *Embo J* 1997;16:3898-3911.
34. Cao Y, Linden P, Farnebo J i sur. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14389-94.
35. Witte D, Thomas A, Ali N, Carlson N, Younes M. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:1463-6.
36. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M i sur. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up. *Mod Pathol* 2003;16:309-14.

37. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M i sur. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005;91:125–32.
38. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci* 2008;121:255–64.
39. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:608–16.
40. Kyriakides TR, Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb Haemost* 2003;90:986–92.
41. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286–92.
42. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827–39.
43. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.
44. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Principles of molecular cell biology of cancer: cancer metastasis. U: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, ur. *Cancer: principles and practice of oncology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott; 1993, str. 134-49.
45. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889;133: 571-73.

46. Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2007;7:139-47.
47. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinase regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
48. Chang HY, Chi JT, Dudoit S *et al*. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12877-82.
49. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003;200:448-64.
50. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1260-70.
51. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000;10:415-33.
52. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci* 2011;15:166-79
53. Foda HD, Zucker S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov Today* 2001;6:478-82.
54. Nagasse H, Woessner, JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-4.
55. Gross J, Lapiere CN. Collagenolytic activity in amphibian tissue: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1962;48:1014-22.
56. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:221-33.



57. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:617-29.
58. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM i sur. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996;97:761-8.
59. Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K i sur. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1997;76:717-28.
60. Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinases family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol* 1996;149:273-82.
61. Uria JA, Balbin M, Lopez JM i sur. Collagenase-2 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. *Am J Pathol* 1998;153:91-101.
62. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *Faseb J* 1998;12:1075-95.
63. Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of Cell Migration by Matrix Metalloprotease-2 Cleavage of Laminin-5. *Science* 1997;227:225-8.

64. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase: inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 1995;270:5872–76.
65. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem* 1990;265:16485-90.
66. Itoh T, Ikeda T, Gomi H, Nakao S, Suzuki T, Itohara S. Unaltered secretion of  $\beta$ -amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) - deficient mice. *J Biol Chem* 1997;272:22389–92.
67. Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA i sur. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet* 2001;28:261–5.
68. Mohan R, Rinehart WB, Bargagna-Mohan P, Fini ME. Gelatinase B/lacZ transgenic mice, a model for mapping gelatinase B expression during developmental and injury-related tissue remodeling. *J Biol Chem* 1998;273:25903–14.
69. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK i sur. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
70. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990;29:10261–70.
71. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 1997;272:2446–51.

72. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J i sur. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 1999;99:81–92.
73. Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001;86:346–55.
74. D'Ortho MP, Will H, Atkinson S i sur. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 1997;250:751-7.
75. Sekine-Aizawa Y, Hama E, Watanabe K i sur. Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. *Eur J Neurosci* 2001;13:935–48.
76. Velasco G, Cal S, Merlos-Suárez A i sur. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res* 2000;60:877– 82.
77. Folgueras AR, Pendás A M, Sánchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004;48:411–24.
78. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5578-82.

79. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000;36:1621-30.
80. Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:20-8.
81. Strongin A, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995;270:5331-8.
82. Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem* 2000;275:26411-5.
83. Deryugina EI, Ratnikova B, Monosov E. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin  $\alpha\beta 3$  promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2001;263:209-23.
84. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2001;86:324-33.
85. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinase: An overview. *Mol Cell Biochem* 2003;253:269-85.
86. Brown PD, Giavazzi R. Matrix metalloproteinase inhibition: A review of anti-tumour activity. *Ann Oncol* 1995;6:967-74.

87. Stahle-Backdahl M, Parks WC. 92-kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1993;142:995-1000.
88. Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:634-40.
89. Xu J, Rodriguez D, Petitclerc E. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Cell Biol* 2001;154:1069-80.
90. Manes S, Mira E, Barbacid M i sur. Identification of insulin-like growth factorbinding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem* 1997;272:25706-12.
91. Manes S, Llorente M, Lacalle RA i sur. The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem* 1999;274:6935-45.
92. Whitelock J M, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* 1996;271:10079-86.
93. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161-74.
94. Liotta LA, Abe S, Gehron Robey PG, Martin GR. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76:2268-72.

95. Birkedal-Hansen H . Proteolytic remodeling of extracellular mytrix. *Curr Opin Oncol* 1995;7:728-35.
96. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980;284:67-8.
97. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein, a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer* 1998;83:1153-62.
98. Ornstein DL, MacNab J, Cohn KH. Evidence for tumor-host cooperation in regulating MMP-2 expression in human colon cancer. *Clin Exp Metastas* 1999;17:205-12.
99. Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K i sur. Increased Expression of Matrix Metalloproteinases (MMP)-2, MMP- 9, and the Urokinase-Type Plasminogen Activator Is Associated with Progression from Benign to Advanced Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7: 2396-404.
100. Guo CB, Wang S, Deng C, Zhang DL, Wang FL, Jin XQ. Relationship between matrix metalloproteinase 2 and lung cancer progression. *Mol Diagn Ther.* 2007;11:183-92.
101. Kanda K, Takahashi M, Murakami Y, Kanayama H, Kagawa S. The role of the activated form of matrix metalloproteinase-2 in urothelial cancer. *BJU Int* 2000;86:553-7.

102. Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan j, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am J Pathol* 1990;136:585-92.
103. Vaisanen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol* 1998;186:51-8.
104. Iurlaro M, Loverro G, Vacca A i sur. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Eur J Clin Invest* 1999;29:793-801.
105. Trudel D, Fradet Y, Meyer F i sur. Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Cancer Res* 2003;63:8511-15.
106. Ylisirniö S, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer--TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res* 2000;20:1311-6.
107. Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Parvinen LM i sur. Serum matrix metalloproteinase-2 as a prognostic marker in advanced cutaneous melanoma. *Acta Oncol* 2000;39:877-9.
108. Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 1999;9:1441-7.

109. Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* 2001;61:577–81.
110. Yu WH, Woessner JF Jr, McNeish JD, Stamenkovic I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev* 2002;16:307–23.
111. Ryden L, Linderholm B, Nielsen NH, Emdin S, Jönsson PE, Landberg G. Tumor specific VEGF-A and VEGFR2/KDR protein are co-expressed in breast cancer. *Breast Cancer Res Tr* 2003;82:147–54.
112. Hinsbergh VWM, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res* 2008;78:203–12.
113. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353–64.
114. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307:58–62.
115. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E i sur. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002;296:1883–86.
116. Bergers G, Brekken R, McMahon G i sur. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737–44.
117. Pepper MS. Role of the Matrix Metalloproteinase and Plasminogen Activator–Plasmin Systems in Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1104–17.



118. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000;2:252-7.
119. Fang J, Shing Y, Wiederschain D. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3884-9.
120. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1998;58:1048-51.
121. Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* 2005;169:681-91.
122. Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H i sur. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* 2003;3: 589-601.
123. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 2010;141:52-67.
124. Podgrabinska S, Braun P, Velasco P i sur. Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16069-74.
125. Rutkowski JM, Boardman KC, Swartz MS. Characterization of lymphangiogenesis in a model of adult skin regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:1402-10.

126. Nakamura ES, Koizumi K, Kobayashi M, Saiki I. Inhibition of lymphangiogenesis-related properties of murine lymphatic endothelial cells and lymph node metastasis of lung cancer by the matrix metalloproteinase inhibitor MMI270. *Cancer Sci* 2004;95:25–31.
127. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:657-62.
128. Gonzalez LO, Pidal I, Junquera S i sur. Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse. *Brit J Cancer* 2007;97:957-63.
129. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1474-81.
130. Wolff AC, Elizabeth M, Hammond H, Schwartz JN i sur. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-145.
131. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurliman B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus of the Primary therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol* 2009;20:1319-29.

132. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer* 2009;9:188.
133. Wu ZS, Wu Q, Yang JH i sur. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122:2050-6.
134. Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD i sur. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 2007;96:903-11.
135. Quaranta M, Daniele A, Coviello M i sur. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. *Anticancer Res* 2007;27:3593-3600.
136. McGowan PM, Duffy MJ. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. *Ann Oncol* 2008;19:1566-72.
137. Di Carlo A, Terracciano D, Mariano A, Macchia V. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 type IV collagenases in serum of patients with pleural effusions. *Int J Oncol* 2005;26:363-8.
138. Tetu B, Brisson J, Wang CS i sur. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res.* 2006;8:R28.

139. Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in Breast Cancer with a Special Reference to Activator Protein-2, HER2, and Prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:7621-28.
140. Ueno H, Nakamura H, Inoue M i sur. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:2055-60.
141. Bruyere F, Melen-Lamalle L, Blacher S i sur. Modeling lymphangiogenesis in a three-dimensional culture system. *Nat Methods* 2008;5:431-7.
142. Langenskiold M, Holmdahl L, Falk P, Ivarsson ML. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2005;20:245-52.
143. Eccles SA. Parallels in invasion and angiogenesis provide pivotal points for therapeutic intervention. *Int J Dev Biol* 2004;48:583-98.
144. Hollborn M, Stathopoulos C, Steffen A, Wiedemann P, Kohen L, Bringmann A. Positive Feedback Regulation between MMP-9 and VEGF in Human RPE Cells. *Invest Ophth Vis Sci* 2007;48:4360-7.
145. Leppa S, Saarto T, Vehmanen L, Blomqvist C, Elomaa I. A high serum matrix metalloproteinase-2 level is associated with an adverse prognosis in node-positive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:1057-63.
146. Talvensaaari-Mattila A, P Paakko A, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Brit J Cancer* 2003;89:1270-5.

147. Šundov Ž, Tomić S, Vilović K, Kunac N, Kalebić M, Bezić J. Immunohistochemically detected high expression of matrix metalloproteinase-2 as predictor of poor prognosis in Dukes B colon cancer. *Croat Med J* 2008;49:636-42.
148. McGuire WL. Steroid Receptors in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 1978;38:4289-91.
149. Mitropoulou T, Tzanakakis GN, Kletsas D, Kalofonos HP, Karamanos NK. Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 AND MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int J Cancer* 2003;104:155–60.
150. Nilsson U, Garvin S, Dabrosin C. MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2007;102:253–61.
151. Kousidou OC, Berdiaki A, Kletsas D i sur. Estradiol–estrogen receptor: A key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells. *Mol Oncology* 2008;2:223–32.
152. Rajoria S, Suriano R, George A i sur. Estrogen Induced Metastatic Modulators MMP-2 and MMP-9 Are Targets of 3,39-Diindolylmethane in Thyroid Cancer. *PLoS ONE* 2011; 6(1): e15879. doi:10.1371/journal.pone.0015879.
153. Allred DC. The utility of conventional and molecular pathology in managing breast cancer 2008;10:Suppl 4.
154. Maley CC, Galipeau PC, C Finley JC. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nat Genet* 2006;38:468-73.

# ŽIVOTOPIS

## OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Dora Fučkar Čupić
Adresa	Ive Marinkovića 7, 51000 Rijeka
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	21. rujna 1970.
Matični broj iz Upisnika	247710

## RADNO ISKUSTVO

Datumi (od – do)	Od 2001 do 2011
Ustanova zaposlenja	Zavod za patologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
Naziv radnog mjesta	Znanstveni novak
Funkcija	Znanstveni novak
Područje rada	Istraživanje i nastava

## ŠKOLOVANJE

Datum	Diplomirala 1998.
Mjesto	U Rijeci
Ustanova	Medicinski fakultet u Rijeci
Zvanje	Doktor medicine

Datum	1999 do danas
Mjesto	U Rijeci
Ustanova	Medicinski fakultet u Rijeci
Zvanje	Poslijediplomski znanstveni studij iz Biomedicine

Datum	Od 2008
Mjesto	U Rijeci
Ustanova	Medicinski fakultet u Rijeci
Zvanje	Specijalizacija iz Patologije

## USAVRŠAVANJE

Godina	The Second European-American Intensive Course in Clinical and Forensic Genetics (Frontiers in Molecular and Cellular Medicine Session). Dubrovnik, Croatia, 2001, September 3-14.  XIX memorijalni sastanak prof. Sergija Saltikowa, Zagreb, listopad 2001.
--------	---

XXIVth International Congress Of The International Academy Of Pathology. Amsterdam, Netherlands, October 2002.

The 19<sup>th</sup> European Congress of Pathology. Ljubljana, Slovenija, September 2003.

Adriatic Society Of Pathology, XVIII. International Meeting, Opicina-Trieste, Italy, June 2004.

HPV infekcija – epidemiologija, dijagnostika, terapija i prevencija, stručni sastanak. 3. prosinca 2004. Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska.

3. Hrvatski kongres patologije i sudske medicine, Opatija, svibanj 2005.

**OSOBNJE VJEŠTINE**

**I KOMPETENCIJE**

Materinji jezik hrvatski  
Strani jezici

Jezik engleski  
Govori da  
Piše da  
Čita da

**TEHNIČKE** Rad na računalu

**VJEŠTINE I**

**OSTALE VJEŠTINE I**

**KOMPETENCIJE**

- 2002.-2010. vježbe i seminari iz dodiplomskog predmeta Patologija za studij medicine, Medicinski fakultet u Rijeci
- 2003.-2010. seminari iz dodiplomskog predmeta Patologija, studij Medicinsko-radiološki inženjeri, Medicinski fakultet u Rijeci
- 2009.-2010. seminari iz dodiplomskog predmeta Patologija, studij Stomatologije, Medicinski fakultet u Rijeci
- sudjelovala u izradi Atlasa iz patologije koji je na temelju pozitivne ocjene stručnog povjerenstva (Povjerenstvo za izdavačku djelatnost Medicinski fakultet u Rijeci) uvršten u obaveznu nastavnu literaturu za predmet Patologija

**Izvorni znanstveni radovi**

Valencić M, Španjol J, Maričić A, Markić D, Fučkar D, Bobinac M. Cystocoele and sensory urgency-our experience. *Coll Antropol.* 2008 Oct;32 Suppl 2:207-9.

Bobinac D, Spanjol J, Marinović M, Zorčić Cvek S, Marić I, Cicvarić T, Fuckar D, Markić D, Vojniković B. Expression of bone morphogenetic proteins, cartilage-derived morphogenetic proteins and related receptors in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Coll Antropol.* 2008 Oct;32 Suppl 2:83-7.

Spanjol J, Marčić A, Valencić M, Oguić R, Krpina K, Protić A, Ivancić A, Bobinac M, Fuckar D, Vojniković B. Influence of insolation on osteoporosis progression in androgen deprived nonmetastatic prostate cancer patients. *Coll Antropol.* 2008 Oct;32 Suppl 2:79-81.

Spanjol J, Marčić A, Cicvarić T, Valencić M, Oguić R, Tadin T, Fuckar D, Bobinac M. Epidemiology of prostate cancer in the mediterranean population of Croatia-a thirty-three year retrospective study. *Coll Antropol.* 2007 Mar;31(1):235-9.

Fuckar D, Dekanić A, Stifter S, Mustać E, Krstulja M, Dobrila F, Jonjić N. VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in patients with breast cancer. *Int J Surg Pathol.* 2006 Jan;14(1):49-55.

Valković T, Fuckar D, Stifter S, Matusan K, Hasan M, Dobrila F, Jonjić N. Macrophage level is not affected by monocyte chemotactic protein-1 in invasive ductal breast carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005 Jul;131(7):453-8. Epub 2005 May 10.

Kovac D, Gasparović I, Jasic M, Fuckar D, Dobi-Babić R, Haller H. Endometrial stromal sarcoma arising in extrauterine endometriosis: a case report. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2005;26(1):113-6.

Stemberga V, Dobi-Babić R, Bosnar A, Cuculić D, Fuckar D, Stifter S, Kusec R, Marusić-Vrsalović M, Jonjić N. Primary non-Hodgkin lymphoma of the humerus following traumatic injury: case report. *Hematol Oncol.* 2003 Sep;21(3):109-14.



Jonjic N, Zamolo G, Stifter S, Fuckar D, Gruber F, Sasso F, Rizzardi C, Melato M. Cytomorphological variations, proliferation and angiogenesis in the prognosis of cutaneous melanoma. Clin Exp Dermatol. 2003 May;28(3):310-4.

**PRIVITCI**

**Sažeci u zbornicima domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova**

1. V. Stemberga, R. Dobi-Babić, A. Bosnar, D. Cuculić, D. Fučkar, N. Jonjić. Primary non-Hodgkin lymphoma of the humerus: Case report. XIX memorijalni sastanak prof. Sergija Saltikowa, Zagreb, listopad 2001.
2. S. Štifter, D. Fučkar, A. Duletić-Načinović. Angiogenesis and proliferation in non-Hodgkin lymphoma. (poster prezentacija) XXIVth International Congress Of The International Academy Of Pathology. Amsterdam, Netherlands, October 2002. Histopathology, 41 (Supl.1), 64-206:94-95.
3. D. Fučkar, G. Zamolo, S. Štifter, N. Jonjić. Dysplastic naevus and cutaneous melanoma - an immunohistochemical comparative study. XXIVth International Congress Of The International Academy Of Pathology. Amsterdam, Netherlands, October 2002. Histopathology, 41 (Supl. 1), 64-206:150.
4. D. Fučkar, T. Valković, M. Hasan, S. Štifter, K. Matušan, N. Jonjić. Expression of MCP-1 mRNA and macrophage infiltrates in invasive breast carcinoma. The 19<sup>th</sup> European Congress of Pathology. Ljubljana, Slovenija, September 2003. Virchows Archiv 2003; 443 (3): 304.
5. G. Zamolo, D. Fučkar, N. Jonjić, T. Batinac, D. Stojanović, V. Mičović. Proliferative and apoptotic markers in cutaneous melanocytic lesions. The 19<sup>th</sup> European Congress of Pathology. Ljubljana, Slovenija, September 2003. Virchows Archiv 2003; 443 (3): 376.
6. D. Fučkar, A. Dekanić, E. Mustać, N. Jonjić. Correlation between VEGF and HER2 expression on tumor cells of breast cancer. Adriatic Society Of Pathology, XVIII. International Meeting, Opicina-Trieste, Italy, June 2004.
7. N. Jonjić, D. Fučkar, A. Dekanić, S. Štifter, E. Mustać, M. Krstulja, F. Dobrila. VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in breast cancer patients. 3. Hrvatski kongres patologije i sudske medicine, Opatija, svibanj 2005.

# **POPIS KRATICA**

MMP – matriksne metaloproteinaze

MT-MMP - membranski tip matriksnih metaloproteinaza

TIMP – tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza

ECM – ekstracelularni matriks

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta

ER – estrogenski receptor

PR – progesteronski receptor

HER2 – receptor za humani epidermalni faktor rasta 2

TMA – tkivni mikroareji