

# Prognostički značaj adhezijskih molekula u invazivnom raku dojke

---

Lučin, Ksenija

Doctoral thesis / Disertacija

1997

*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:188:145818>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Rijeci**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ksenija Lučin**

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ ADHEZIJSKIH  
MOLEKULA U INVAZIVNOM RAKU DOJKE**

**Doktorska disertacija**

**SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJEKA**



**Rijeka, 1997.**

Ime i prezime: KSENİJA LUCIN

Datum i mjesto rođenja: 20. siječnja 1963. Rijeka

Naziv fakulteta, odnosno organizacije za postdiplomski studij i datum završene nastave II i III stupnja: Medicinski fakultet Rijeka 1987.  
Medicinski fakultet Rijeka 1991.

Sadašnje zaposlenje: asistent Medicinski fakultet Rijeka

II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA  
PROGNOSTIČKI ZNAČAJ ADREZIJSKIH MOLEKULA U INVAZIVNOM RAKU DOJKE

Naslov rada:

Broj stranica, slika, tabela, bibliografskih podataka: 103 str., 4. tab., 30 slika, 227

Ustanova i mjesto gdje je disertacija izrađena: Medicinski fakultet Rijeka  
K.B.C. Rijeka

Znanstvena disciplina: BIOMEDICINA i zdravstvo

Mentori: Prof.dr.sc. Nives Jonjić

Fakultet na kojem je disertacija obranjena: Medicinski fakultet u Rijeci

III OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme: 3. svibnja 1993.

Datum predaje rada: 1. listopada 1997.

Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen: 11. studenog 1997.  
prof.dr.sc. Daniel Rukavina,  
Prof.dr.sc. Antoa Škarpa, doc.dr.  
Jasminka Jakić-Baramović, prof.  
dr.sc. Nives Jonjić

Datum obrane disertacije: 2. prosinca 1997.

Sastav povjerenstva pred kojim je disertacija obranjena: I s t i

Datum promocije:

Rad je izrađen na Zavodu za patologiju i patološku anatomiju te Zavodu za fiziologiju.

Voditeljica rada: Prof. dr. Nives Jonjić

Rad sadrži 102 stranice, 30 slika i 4 tablice.



Prof. dr. Nives Jonjić, voditeljica rada, pomogla mi je svojim savjetima i kritičkim primjedbama. Cjelokupnu obradu materijala na protočnom citometru učinio je prof. dr. Pero Lučin na Zavodu za fiziologiju. Dr. Toni Valković i laboranti Zavoda pomogli su mi pri izradi histoloških preparata. Svima se najtoplije zahvaljujem.

## SAŽETAK

Ispoljenost adhezijskih molekula ispitivana je u normalnom tkivu dojke i na stanicama raka dojke metodom imunohistokemije i protočne citometrije. Rezultati su uspoređeni s prognostičkim pokazateljima kao što su veličina tumora, status limfnih čvorova, mitotska aktivnost, histološki stupanj te morfometrijski prognostički indeks.

Na uzorku od 135 duktalnih NOS (od engl. non otherwise specified) karcinoma metodom imunohistokemije utvrđena je povezanost smanjene ispoljenosti  $\beta 1$  integrina s visokim morfometrijskim prognostičkim indeksom ( $>0,6$ ). Metodom protočne citometrije na uzorku od 45 tumora utvrđena je viša razina  $\beta 1$  integrina u tumorima s negativnim limfnim čvorovima, visokom mitotskom aktivnošću te histološkim stupnjem 1 i 3. Nije nađena razlika u ispoljenosti  $\beta 1$  integrina na stanicama primarnog tumora u odnosu na metastazu.

Metodom imunohistokemije na uzorku od 67 duktalnih NOS karcinoma utvrđena je povezanost ekspresije ICAM-1 s limfocitnim infiltratima ali ne i s prognostičkim pokazateljima. Rezultati protočne citometrije, dobiveni na uzorku od 45 karcinoma, pokazali su visoku ekspresiju ICAM-1 u velikim tumorima, tumorima s visokom mitotskom aktivnošću te u slabo diferenciranim tumorima. Posebice se ističe razlika u ekspresiji molekule ICAM-1 u duktalnih NOS karcinoma u odnosu na medularne, u kojih je ekspresija ICAM-1 uvijek visoka. Nije nađena razlika u ispoljenosti ICAM-1 molekule na stanicama primarnog tumora u odnosu na metastazu.

Metodom imunohistokemije ispitivana je ispoljenost molekule CD44 u 63 duktalna NOS karcinoma. Nije nađena povezanost ekspresije CD44 i prognostičkih pokazatelja. Rezultati protočne citometrije, dobiveni na uzorku od 45 karcinoma, pokazali su udruženost visoke razine molekule CD44 i visoke mitotske aktivnosti. Primarni tumori imaju manji postotak pozitivnih stanica i nižu razinu ekspresije molekule CD44 u odnosu na metastazu.

Ispoljenost molekule LFA-3 ispitivana je samo metodom protočne citometrije na uzorku od 31 karcinoma dojke. Ispitivanjem svih histoloških tipova utvrđeno je da tumori s većom mitotskom aktivnošću imaju višu razinu molekule LFA-3. Samo u duktalnih NOS karcinoma utvrđena je udruženost visoke razine LFA-3 molekule s velikim tumorima, slabo diferenciranim tumorima i visokim morfometrijskim prognostičkim indeksom. Nije nađena razlika u ekspresiji LFA-3 molekule na primarnim tumorima u odnosu na metastazu.

## SUMMARY

The expression of adhesion molecules on the normal breast tissue and on the breast carcinoma cells was analysed. The results were compared with prognostic parameters such as tumor size, lymph node status, mitotic activity, gradus and morphometric prognostic index.

The expression of  $\beta 1$  integrins on the surface of 135 and 45 ductal NOS carcinomas, respectively, was analysed by immunohistochemistry and flow cytometry. The results obtained by immunohistochemistry indicate the relationship between decreased  $\beta 1$  integrin expression and high morphometric prognostic index ( $>0,6$ ). The results obtained by flow cytometry indicate the relationship between increased  $\beta 1$  integrin expression and negative lymph nodes, high mitotic activity and tumor gradus 1 and 3. There was no difference in  $\beta 1$  integrin expression on the primary carcinoma cells and metastasis.

The results of ICAM-1 expression, obtained by immunohistochemistry on the 67 ductal NOS carcinomas, indicate the correlation between high ICAM-1 expression and lymphocyte infiltrates. Flow cytometry was performed on the 45 carcinoma samples. The expression of ICAM-1 was higher on tumors with high mitotic activity, tumors with diameter over 2 cm as well as low differentiated tumors. In addition, we found the higher ICAM-1 expression on medullary carcinoma cells compared to other types. No difference in ICAM-1 expression between the primary carcinoma cells and metastasis was observed.

The results obtained by immunohistochemistry on 63 ductal NOS carcinomas, did not show any correlation between CD44 expression and prognostic parameters. Flow cytometric analysis of 45 carcinomas showed increased CD44 expression on tumors with high mitotic activity. The tumor cells isolated from metastatic lymph nodes had higher fluorescence intensity than cells from primary tumors.

The LFA-3 expression was analysed on the cell surface of 31 carcinomas by flow cytometry. The LFA-3 expression was higher on tumors with high mitotic activity. If only ductal NOS carcinomas were considered, the higher CD44 expression on large tumors, low differentiated tumors and those with high morphometric prognostic index was found. There was no difference in LFA-3 expression between the primary carcinoma cells and metastasis.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Svrha rada .....	2
1.2. Ciljevi rada .....	2
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	3
2.1. OSNOVNE ZNAČAJKE RAKA DOJKE .....	3
2.1.2. Klasifikacija raka dojke .....	4
2.2. PROGNOŠTIČKI ČIMBENICI RAKA DOJKE .....	7
2.2.1. Veličina tumora .....	7
2.2.2. Steroidni hormonski receptori .....	8
2.2.3. Histološki tip i stupnjevanje tumora .....	8
2.2.4. Stanična kinetika .....	9
2.2.5. Sadržaj DNK .....	10
2.2.6. Invazija tumora u limfne i krvne žile .....	10
2.2.7. Receptor za epidermalni čimbenik rasta .....	10
2.2.8. Onkogen <i>c-erbB-2</i> .....	10
2.2.9. Katepsin D .....	11
2.3. STANIČNA ADHEZIJA .....	12
2.3.1. Funkcionalna jedinica stanične adhezije .....	12
2.3.2. Održavanje tkivne arhitekture .....	13
2.3.2.1. Spojevi tipa adherens .....	13
2.3.2.2. Dezmosomski spojevi .....	13
2.3.2.3. Spojevi tipa okludens .....	14
2.3.2.4. Adhezija stanica za vanstanični matriks i bazalnu membranu ...	14
2.3.3. Regulacija stanične adhezije .....	15
2.3.4. Čvrsta adhezija, širenje i gibanje stanica .....	15
2.3.5. Stanična adhezija i prijenos signala .....	17
2.4. ADHEZIJSKE MOLEKULE .....	19
2.4.1. Integrini .....	19
2.4.1.1. Građa integrina .....	20
2.4.1.2. $\beta$ 1 integrini .....	22
2.4.1.3. $\beta$ 2 integrini .....	23
2.4.1.4. $\beta$ 3 integrini .....	24
2.4.2. Imunoglobulinska superfamilija .....	24
2.4.2.1. ICAM-1 .....	26

2.4.2.3. ICAM-3 .....	27
2.4.2.4. LFA-2 i LFA-3 .....	28
2.4.3. Kadherini .....	28
2.4.4. Selektini .....	29
2.4.6. Proteoglikani stanične membrane .....	30
2.4.7. Molekula CD44 .....	31
2.4.7.1. Građa gena CD44 .....	32
2.4.7.2. Ligandi molekule CD44 .....	33
2.5. INVAZIJA I METASTAZIRANJE TUMORA .....	35
2.5.1. Vanstanični matriks .....	36
2.5.2. Trostepena hipoteza tumorske invazije .....	38
2.5.2.1. Prianjanje tumora za matriks .....	38
2.5.2.2. Proteolitička razgradnja .....	39
2.5.2.3. Kretanje tumorskih stanica .....	40
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>41</b>
3.1. Tkivni uzorci .....	41
3.1.1. Indeks mitotske aktivnosti (IMA).....	41
3.1.2. Morfometrijski prognostički indeks (MPI) .....	41
3.1.3. Histološko stupnjevanje tumora (gradus) .....	42
3.2. Imunohistokemijsko ispitivanje .....	42
3.3. Protutijela .....	43
3.4. Protočna citometrija .....	43
3.5. Puferi .....	44
3.6. Statistička obrada .....	45
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>46</b>
4.1. EKSPRESIJA $\beta$ 1 INTEGRINA .....	46
4.1.1. Rezultati imunohistokemije .....	46
4.1.1.1. Ekspresija $\beta$ 1 integrina u normalnom tkivu dojke .....	46
4.1.1.2. Ekspresija $\beta$ 1 integrina na stanicama duktalnih NOS karcinoma .....	46
4.1.1.3. Ekspresija $\beta$ 1 integrina na stanicama ostalih tipova raka dojke .....	48
4.1.2. Rezultati protočne citometrije .....	48
4.1.2.1. Ekspresija $\beta$ 1 integrina na stanicama primarnog tumora .....	48
4.1.2.2. Usporedba ekspresije $\beta$ 1 integrina na stanicama primarnog tumora i stanicama u metastazi .....	51

4.1.2.2. Usporedba ekspresije $\beta$ 1 integrina na stanicama primarnog tumora i stanicama u metastazi .....	51
4.2. EKSPRESIJA MOLEKULE ICAM-1 .....	51
4.2.1. Rezultati imunohistokemije .....	51
4.2.1.1. Ekspresija molekule ICAM-1 u normalnom tkivu dojke .....	51
4.2.1.2. Ekspresija molekule ICAM-1 na stanicama duktalnih NOS karcinoma .....	51
4.2.1.3. Ekspresija molekule ICAM-1 na stanicama ostalih tipova raka dojke .....	53
4.2.2. Rezultati protočne citometrije .....	53
4.2.2.1. Ekspresija ICAM-1 na stanicama primarnog tumora .....	53
4.2.2.2. Usporedba ekspresije molekule ICAM-1 na stanicama primarnih tumora i stanicama u metastazi .....	56
4.3. EKSPRESIJA MOLEKULE CD44 .....	56
4.3.1. Rezultati imunohistokemije .....	56
4.3.1.1. Ekspresija molekule CD44 u normalnom tkivu dojke .....	56
4.3.1.2. Ekspresija molekule CD44 na stanicama duktalnih NOS karcinoma .....	56
4.3.1.3. Ekspresija molekule CD44 na stanicama ostalih tipova raka dojke .....	58
4.3.2. Rezultati protočne citometrije .....	58
4.3.2.1. Ekspresija molekule CD44 na stanicama primarnog tumora ....	58
4.3.2.2. Usporedba ispoljenosti molekule CD44 na stanicama primarnih tumora i stanicama u metastazi .....	59
4.4. EKSPRESIJA MOLEKULE LFA-3 .....	60
4.4.1. Ekspresija molekule LFA-3 na stanicama primarnog tumora .....	60
4.4.2. Usporedba ispoljenosti molekule LFA-3 na stanicama primarnih tumora i stanicama u metastazi .....	62
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>63</b>
<b>6. ZAKLJUČNI PREGLED .....</b>	<b>88</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>89</b>



## 1. UVOD

Rak dojke najčešći je zloćudni tumor u žena i, nakon raka pluća, najčešći uzrok smrti od raka u žena. U zadnje vrijeme postignut je velik napredak u ranom otkrivanju raka, u terapijskim mogućnostima te saznanjima o etiologiji raka. Usprkos tome, smrtnost od raka dojke nije se značajno promijenila. Glavni problem u liječenju raka dojke je raznoliko biološko ponašanje tumora, posebice onog najčešćeg, dukalnog NOS karcinoma. Prisustvo metastaza u pazušnim limfnim čvorovima glavni je pokazatelj loše prognoze i kriterij za odabir bolesnica koje treba liječiti adjuvantnom kemoterapijom. U bolesnica bez metastaza primjenjuje se samo kirurška terapija u kombinaciji sa zračenjem (55). No, u ovoj skupini nalaze se bolesnice koje će biti izliječene ili će ući u razdoblje dugotrajne remisije, ali isto tako i one kod kojih će razmjerno brzo doći do ponovnog pojavljivanja bolesti. Prepoznavanje ove druge skupine bolesnica, koje također treba liječiti kemoterapijom, od velikog je značenja za uspješno liječenje raka dojke. Stoga su brojna istraživanja danas usmjerena na iznalaženje novih pokazatelja koji mogu predvidjeti biološko ponašanje tumora, odnosno tijek bolesti. Među njima pažnja se pridaje i adhezijskim molekulama.

Adhezijske molekule stanični su površinski glikoproteini koji posreduju prijanjanje među stanicama te prijanjanje stanica za proteine vanstaničnog matriksa. Stanična adhezija omogućuje udruživanje pojedinačnih stanica u tkiva, međusobno povezivanje stanica, a posredstvom veze s citoskeletom, određuje sveukupnu arhitekturu tkiva (69,86). Pored uloge u morfogenezi i određivanju tkivne arhitekture, adhezija ima ključnu ulogu i u brojnim drugim procesima kao što su upala i cijeljenje rana, zgrušavanje krvi te u procesima proliferacije i diferencijacije (5,30,65, 194). Adhezijske molekule se prema strukturi i genskoj organizaciji svrstavaju u nekoliko obitelji: integrini, imunoglobulinska obitelj, selektini, kadherini te molekula CD44 (od engl. cluster of differentiation). Brojni radovi upućuju na moguću ulogu adhezijskih molekula u procesu rasta i širenja zloćudnih tumora (5,35,177). U zloćudnih je tumora, među ostalim, poremećena tkivna arhitektura, a tijekom invazije i metastaziranja tumorske stanice posredstvom adhezijskih molekula prijanjaju uz proteine vanstaničnog matriksa te endotelne stanice limfnih i krvnih žila. Pored toga, adhezijske molekule sudjeluju u imunološkim, obrambenim mehanizmima organizma. One omogućuju prepoznavanje tumorskih stanica i pobuđivanje imunološkog odgovora, što može utjecati na rast tumora i tijek bolesti (116,194). Stoga je opravdana pretpostavka da bi promjene u

ispoljenosti adhezijskih molekula mogle utjecati na ponašanje tumora i poslužiti u predviđanju tijeka bolesti.

## 2.1. Svrha rada

Najznačajniji prognostički pokazatelji raka dojke, koji se široko primjenjuju u kliničkoj praksi, su veličina tumora, prisustvo metastaza u limfnim čvorovima te histološki stupanj tj. gradus (55,57,159). Poznavanje ovih pokazatelja omogućuje primjenu odgovarajuće terapije i predviđanje tijeka bolesti. Morfometrijski prognostički indeks predložen je kao pokazatelj koji može uspješnije predvidjeti tijek bolesti u odnosu na druge pojedinačne ili udružene pokazatelje, a temelji se na veličini tumora, broju mitozu i statusu limfnih čvorova (14). Svrha ovog rada je da se analizira prisustvo adhezijskih molekula na stanicama karcinoma dojke i utvrdi odnos prema prije spomenutim prognostičkim pokazateljima. Na taj način saznat ćemo da li bi neka od analiziranih adhezijskih molekula mogla imati prognostički značaj, odnosno mogla upućivati na daljnji tijek bolesti.

## 2.2. Ciljevi rada

a) utvrditi ispoljenost adhezijskih molekula na stanicama dukalnog NOS raka i odnos prema ispoljenosti u normalnom tkivu dojke

b) usporediti metodu imunohistokemije i protočne citometrije i procijeniti njihovu vrijednost

c) usporediti ispoljenost adhezijskih molekula na stanicama dukalnog NOS raka i stanicama drugih histoloških tipova raka dojke

d) utvrditi odnos između adhezijskih molekula i prognostičkih pokazatelja kao što su veličina tumora, status limfnih čvorova, mitotski indeks te morfometrijski prognostički indeks

e) usporediti ispoljenost adhezijskih molekula na stanicama primarnog tumora i stanicama metastaze



## 2. OPĆI DIO

### 2.1. OSNOVNE ZNAČAJKE RAKA DOJKE

Rak dojke najčešći je zloćudni tumor u žena i drugi po redu uzrok smrti od raka nakon raka pluća. Incidencija raka dojke nije se mijenjala tijekom zadnjih 50 godina. Jedna od 11 žena u SAD dobiva rak dojke, a 27 žena od 100 000 umire od raka dojke (48). Usprkos napretku u ranom otkrivanju raka dojke i u terapijskim mogućnostima, smrtnost se nije značajno smanjila. Stoga mu se pridaje velik značaj i predmet je brojnih istraživanja glede uzroka, dijagnostičkih metoda i liječenja. U industrijaliziranim zemljama s visokom pojavnosću raka dojke, incidencija se povećava tijekom života, iako nešto sporije kod starijih žena. Najveća je između 45 i 60 godine. Unutar populacije niskog rizika incidencija dostiže vrhunac prije menopauze i nakon toga se više ne povećava. Rak dojke nije uobičajen prije 35. godine. Tri su osnovna čimbenika koja mogu utjecati na nastanak raka dojke: genetska predodređenost, hormonska neravnoteža i okolišni čimbenici. Rizik je značajno veći ako je prisutna obiteljska anamneza, odnosno rak među članovima najuže obitelji (majka, sestra, kćerka). Istraživanjem genetske osnove raka dojke unutar obitelji utvrđeno je da se gen koji predodređuje sklonost nalazi na 17q21 koromosomu (91). Gen je nazvan BRCA 1 (od engl. breast carcinoma), a povezan je i s povećanom sklonošću razvoja raka ovarija (172).

Na ulogu hormona u nastanku raka dojke ukazuje udruženost incidencije raka dojke s dobi menarhe, menopauze i prve trudnoće. Rana menarha, kasna menopauza i prva trudnoća u starijoj dobi povećavaju rizik. Tumorske stanice luče različite promotore rasta kao što su transformirajući čimbenik rasta- $\alpha$ /epidermalni čimbenik rasta, čimbenik rasta porijeklom iz trombocita, čimbenik rasta fibroblasta te inhibitore rasta kao što je transformirajući čimbenik rasta- $\beta$ . Svi oni autokrinim putem mogu utjecati na rast tumora. Lučenje tih čimbenika ovisno je o estrogenima, a smatra se da je međudjelovanje cirkulirajućih hormona, hormonskih receptora na tumorskim stanicama i čimbenika rasta uključeno u progresiju raka dojke (51).

Na utjecaj okolišnih čimbenika ukazuje različita incidencija u genetski homogenoj skupini i zemljopisne razlike u učestalosti. Istražuju se dijetni čimbenici kao npr. masna hrana i alkohol, a nakon otkrića retrovirusa koji uzrokuje tumor u miša (27), također i virusi kao mogući etiološki čimbenici. S tim u svezi treba spomenuti i ulogu onkogeni i gena supresora raka (190). Amplifikacija erb B2/neu gena (sličan je genu za receptor epidermalnog čimbenika rasta)

nađena je u 5-30% raka dojke, a udružena je s prekomjernom ekspresijom proteina p185<sup>erb2</sup>. Prekomjerna ekspresija tog genskog produkta ukazuje na lošu prognozu u bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima. Umetanje aktiviranog erb B2/neu onkogeno u transgenične miševne dovodi do nastanka adenokarcinoma. Opisana je i amplifikacija int-2 (homologan je s čimbenikom rasta fibroblasta), c-ras te c-myc gena. Također, javljaju se i somatske mutacije p53 i Rb supresorskih gena u 50%, odnosno 20% raka dojke (135).

### 2.1.2. Klasifikacija raka dojke

Svjetska zdravstvena organizacija predlaže slijedeću klasifikaciju raka dojke (221):

#### A) NEINVAZIVNI RAK

- 1a. intraduktalni rak
- 1b. intraduktalni rak s Pagetovom bolešću
2. lobularni rak *in situ*

#### B) INVAZIVNI RAK

1. invazivni duktalni rak koji nije drugačije označen (NOS, od engl. non otherwise specified)
2. invazivni lobularni rak
3. medularni rak
4. mucinozni rak
5. tubularni rak
6. adenoid-cistični rak
7. apokrini rak
8. papilarni rak

**Duktalni NOS karcinom** najčešći je tip raka dojke i javlja se u 65-80% svih karcinoma dojke. Dijagnoza se temelji na isključivanju ostalih histoloških tipova. Naziv je dobio po tome što potječe iz duktalnog, a ne lobularnog epitela, premda to mišljenje više nije pouzdano. Čvrste je konzistencije, zvjezdolikih rubova, veličine od 0,5-10 i više cm. Histološki, tumorske stanice u tračcima, gnijezdima, žlijezdanim formacijama i anastomozirajućim masama prožimaju vezivnu stromu koja je često vrlo obilna. Da bi se označio kao duktalni NOS

karcinom, više od 90% tumora mora sačinjavati ovaj histološki tip. Ako čini 10-90% tumorskog tkiva, a ostalo je neki od posebnih tipova, označava se kao miješani tip.

**Lobularni rak** vjerojatno potječe iz terminalnih kanalića, a naziv je dobio po čestoj udruženosti s lobularnim karcinomom *in situ*. Čini 5-10% svih karcinoma, a značajan je jer pokazuje sklonost k obostranom te multicentričnom javljanju. Većinom se predstavlja u obliku jasno vidljive tumorske mase koja je čvrste konzistencije i slabo ograničenih rubova, no ponekad i u obliku makroskopski slabo definirane tumorske mase. Histološki, sastoji se od uskih tračaka stanica, često širine samo jedne stanice, koje infiltriraju obilnu stromu. Stanice imaju male i jednolike jezgre, koje su često ekscentrično smještene, a u citoplazmama se ponekad mogu vidjeti nakupine sluzi.

**Medularni rak** javlja se u 2-10% svih slučajeva raka dojke. Postoje oprečna mišljenja glede dijagnostičkih kriterija i prognoze, mada većina smatra da ima dobru prognozu. Dobro je ograničen, mekane konzistencije, veličine 1-4 cm. Tri su glavna morfološka kriterija za postavljanje dijagnoze medularnog raka. Stanice su raspoređene u anastomozirajuće tračke koji stvaraju mrežu, velike su i pleomorfne s krupnim jezgrama i brojnim mitozama. Stroma sadrži obilne limfocitne infiltrate, koji se ne mogu naći unutar tumorskih gnijezda. Tumorska masa dobro je ograničena, a tumorske stanice na periferiji ne pokazuju infiltrativni rast. Nekroza je minimalna, a duktalni rak *in situ* rijetko se nalazi. Ako nema sve osobine medularnog raka, označava se kao atipični medularni rak.

**Mucinozni rak** javlja se u starijih žena i raste sporo tijekom mnogo godina, a incidencija mu je 1-4%. Mekane je i gelatinozne konzistencije, oštro ograničen, veličine 1-4 cm. Histološki, sastoji se od otočića i nakupina stanica koje ponekad formiraju žlijezde, a uloženi su u obilna "jezera" vanstanične sluzi. Otočići tumorskih stanica mogu stvarati kribriformni ili papilarni uzorak. Stanice su male, a jezgre tamne, unimorfne i s malo mitozama. Nekroza je rijetka.

**Tubularni rak** javlja se u 1-3% svih karcinoma dojke. Makroskopski izgleda poput duktalnog NOS karcinoma, osim što je manjeg promjera, obično između 0,2 i 1,5 cm. Razlikuju se "čisti" i sklerozirajući tip. Čisti tip sadrži centralnu fibrozu i elastoza s rijetkim tubularnim tvorbama koje su radijarno poredane i brojnije na periferiji. Sklerozirajući tip ne sadrži središnju elastoza, a tubuli difuzno prožimaju vezivno i masno tkivo. U oba tipa tubuli zatvaraju okrugle ili ovalne lumene koji su obloženi s jednim slojem epitelnih stanica. Stanice su male, s pravilnim, unimorfnim jezgrama i rijetkim mitozama. Tumor ima vrlo dobru prognozu.

**Adenoid-cistični rak** čini manje od 1% slučajeva. Makroskopski nalikuje na duktalni NOS karcinom, veličine 1-3 cm. Sastoji se od tračaka i otočića malih, pravilnih epitelnih stanica, koje imaju tamne jezgre s malo pleomorfizma i rijetkim mitozama. Unutar otočića stanice zatvaraju lumene što stvara kribriformnu sliku. Uz to mogu se naći i tubularne strukture ili solidni tračci stanica. Ovaj histološki tip također ima vrlo dobru prognozu.

**Invazivni papilarni rak** vrlo je rijedak i javlja se u manje od 1% slučajeva. Obično je dobro ograničen, može biti mekane konzistencije, ali i čvrste poput duktalnog NOS karcinoma, a mjeri 1-3 cm. Stanice formiraju papilarne formacije, često je prisutno i lučenje sluzi. Citološki izgled varira, može biti prisutan nuklearni pleomorfizam i mitoze. Često je istovremeno prisutan mikropapilarni ili kribriformni karcinom *in situ*.

**Apokrini rak** pretežno se sastoji od stanica s obilnom eozinofilnom citoplazmom koja podsjeća na metaplastičke apokrine stanice. Apokrini rak može se javiti žarišno i u drugih tipova raka dojke, no dijagnoza apokrinog karcinoma odnosi se na one tipove u kojih sav ili gotovo sav epitel pokazuje apokrine karakteristike. Incidencija apokrinog raka je 1-4%. Makroskopski i histološki izgledaju poput duktalnog NOS karcinoma, a razlika je samo u citološkom izgledu. Jezgre su povećane i pleomorfne u usporedbi s jezgrama benignih apokrinih stanica i sadrže velike, eozinofilne nukleole. Citoplazme su eozinofilne, homogene ili zrnate. Često se u okolnom tkivu dojke vide tumorski embolusi u limfnim žilama.



## 2.2. PROGNOŠTIČKI ČIMBENICI RAKA DOJKE

Prvi korak u liječenju raka dojke kirurško je odstranjenje tumora, a daljnje liječenje ovisi o karakteristikama tumora, odnosno o prognostičkim pokazateljima. Oko 50% žena ulazi u stanje dugotrajne remisije ili će biti potpuno izliječena nakon kirurškog odstranjenja primarnog tumora, samog za sebe ili u kombinaciji sa zračenjem. Drugu grupu čine žene sa nepovoljnom prognozom u kojih će razmjerno brzo doći do sekundarnog tumorskog rasta te stoga zahtijevaju adjuvantnu sistemsku terapiju. Prisustvo tumora u pazušnim limfnim čvorovima najbolje može predvidjeti ponovno pojavljivanje bolesti te je stoga u žena s pozitivnim limfnim čvorovima opravdana sistemska terapija. Ukoliko su limfni čvorovi negativni, prognoza je znatno povoljnija te će svega u jednoj trećini slučajeva doći do ponovnog pojavljivanja tumora unutar 10 godina. Važno je prepoznati ovu skupinu žena koje, iako nemaju metastaze u limfnim čvorovima, imaju nepovoljnu prognozu te stoga moraju biti podvrgnute sistemskoj terapiji. Limfni čvorovi gube svoj značaj u predviđanju tijeka bolesti i stoga što se danas pomoću preventivne mamografije tumori otkrivaju u ranijoj fazi, dok se još nisu proširili u limfne čvorove. Važno je, stoga, pažnju usmjeriti na primarne tumore i na temelju njihovih karakteristika predvidjeti prognozu, što ujedno određuje i odgovarajuću terapiju.

Neki su prognostički parametri dobro utvrđeni i široko se primjenjuju, dok su drugi tek predloženi i njihov se stvarni značaj tek treba utvrditi.

### 2.2.1. Veličina tumora

Prognostički značaj veličine tumora odavno je poznat i prihvaćen, veći tumori češće se ponovno javljaju i metastaziraju (38,55,63,159). Istraživanjem koje je uključilo preko 2500 bolesnica utvrđena je veza između porasta veličine tumora i učestalosti metastaza u limfnim čvorovima (38). Na temelju veličine tumora može se predvidjeti ukupno preživljavanje, a isto tako i razdoblje bez ponovnog pojavljivanja bolesti. Ukoliko su limfni čvorovi negativni, petogodišnje preživljavanje je manje što je tumor veći (38). Bolesnice s malim tumorima (manjim od 1cm) imaju vrlo dobru prognozu, unutar 5 godina umire ih manje od 2%. No, prate li se bolesnice kroz duže razdoblje, u četvrtine bolesnica bolest se ponovo javlja u tijeku 10 godina.

Značaj veličine tumora kao prognostičkog pokazatelja neosporan je, to je možda i najznačajniji pojedinačni parametar u predviđanju metastaziranja tumora. Ipak, veličina tumora

se može koristiti samo kao grubi predskazatelj biološkog ponašanja tumora jer, čak i tumori s promjerom manjim od 1cm mogu metastazirati u klinički značajnom postotku (63). Obrnuto, manji broj karcinoma dosegne veliki promjer bez istovremenog prisustva metastaze.

### **2.2.2. Steroidni hormonski receptori**

U posljednjih 20 godina, otkako je prvi put predloženo korištenje estrogenih receptora kao prognostičnog parametra, objavljene su brojne studije često s oprečnim podacima. U istraživanjima koja su uključila oko 2000 žena, koje su praćene u dužem razdoblju, zaključeno je da prisustvo estrogenih receptora ukazuje na duže preživljavanje, ali samo u žena s pozitivnim limfnim čvorovima (143,159). U žena s negativnim limfnim čvorovima razlike u preživljavanju vrlo su male. Prisutnost estrogenih receptora treba procjenjivati zajedno s drugim osobinama tumora, npr. nuklearnim gradusom, što ima veći prognostički značaj nego kada se ti pokazatelji analiziraju pojedinačno (62). Određivanje hormonskih receptora u bolesnica s rakom dojke danas je rutinski postupak koji pomaže u odabiru bolesnica za adjuvantnu hormonsku terapiju. Tumori bez estrogenskih i progesteronskih receptora rijetko odgovaraju na hormonsku terapiju, stoga je glavni značaj steroidnih receptora u predviđanju učinka hormonske terapije, ali ne i daljnjeg tijeka bolesti.

### **2.2.3. Histološki tip i stupnjevanje tumora**

Odavno se zna da određeni histološki tipovi imaju dobru prognozu. To je prvo uočeno kod mucinoznih karcinoma (133), a kasnije je utvrđeno i za tubularni (57), invazivni kribriiformni (80) te medularni tip karcinoma (28). Istraživanje na velikoj skupini od 1621 bolesnice potvrđuje prognostički značaj ovih posebnih tipova dukalnog karcinoma, osim medularnog, kod kojeg je preživljavanje bilo istovjetno preživljavanju bolesnica s NOS rakom (56). U ovom istraživanju izdvojen je tip tubularnog miješanog karcinoma koji se, s obzirom na prognozu, nalazi između čistog tubularnog i dukalnog NOS karcinoma. Nadalje, ni svi podtipovi lobularnog karcinoma nemaju istu prognozu. Klasični lobularni, tubulo-lobularni i miješani lobularni tipovi imaju bolju prognozu od dukalnog NOS karcinoma, ali ne i solidni tip lobularnog karcinoma (56). Prognoza tubulo-lobularnog karcinoma vrlo je dobra i gotovo jednaka onoj kod čistih posebnih tipova dukalnog karcinoma.

Histološko stupnjevanje tumora kombinira detalje stanične morfologije (pleomorfizam jezgara) sa diferencijacijom (stvaranje tubularnih formacija) i proliferacijom (broj mitozu).

Opisano je više metoda histološkog stupnjevanja (28,57,80), a u svim istraživanjima potvrđen je značaj stupnja I u predviđanju dobre prognoze, u odnosu na stupanj II i III. Danas je prihvaćena Elstonova modifikacija Bloom-Richardsonove metode (57).

U nekim studijama koje su obuhvaćale žene bez metastaza nuklearni gradus je sam za sebe bio značajan prognostički parametar (64,171). Žene sa niskim nuklearnim gradusom imale su značajno duže preživljavanje.

#### **2.2.4. Stanična kinetika**

Odavno je poznato da procjena proliferacije pomoću određivanja mitotske aktivnosti može predvidjeti biološko ponašanje tumora. Baak je pokazao da se na temelju mitotske aktivnosti mogu razlikovati karcinomi niskog i visokog rizika, odnosno da karcinomi s manjim brojem mitozu imaju bolju prognozu nego oni s mnogo mitozu (15). Proliferacija tumorskih stanica može se procjenjivati na više načina.

Određivanjem indeksa obilježavanja s timidinom mjeri se proporcija tumorskih stanica koje sintetiziraju DNK. Utvrđeno je da je niska mitotska aktivnost povezana s dugim razdobljem bez ponovnog pojavljivanja bolesti, neovisno o veličini tumora, prisustvu hormonskih receptora ili histološkom gradusu (151).

Protočnom citometrijom može se odrediti ploidijska i postotak stanica koje su u S fazi staničnog ciklusa, tj. koje su aktivne u sintezi DNK. Objavljeni podaci ukazuju na to da se S-faza može koristiti kao prognostički parametar. Velik broj stanica u S-fazi predviđa brzo ponovno pojavljivanje bolesti i nisko preživljenje neovisno o stanju limfnih čvorova (47,55).

Proliferativni potencijal tumorskih stanica može se analizirati i imunohistokemijski. Protutijelo Ki-67 razlikuje sve stanice koje su ušle u stanični ciklus ( $G_1$ , S,  $G_2$ , M faze) od stanica u mirovanju ( $G_0$  faza staničnog ciklusa). Stanice koje su u S fazi mogu se prikazati i pomoću protutijela koje prepoznaje nuklearni protein PCNA (od engl. proliferation cell nuclear antigen). Brojenjem obojenih jezgara može se odrediti proporcija stanica koje se dijele u odnosu na ukupnu populaciju stanica.

Ispoljenost Ki-67 antigena veća je kod slabo diferenciranih lezija s puno mitozu i korelira s ranim ponovnim pojavljivanjem bolesti (31).

### **2.2.5. Sadržaj DNK**

Većina tumora dojke ima abnormalni sadržaj DNK. U većini istraživanja sadržaj DNK u karcinomu dojke određivan je protočnom citometrijom, a rezultati uspoređeni s biološkim aspektima ponašanja tumora. Vrlo često aneuploidija je udružena s niskim stupnjem diferencijacije, kraćim razdobljem bez bolesti i kraćim preživljavanjem (13,59).

### **2.2.6. Invazija tumora u limfne i krvne žile**

Prisustvo limfatične ili vaskularne invazije u okolini primarnog tumora jedna je od najznačajnijih histoloških osobina od prognostičnog značaja i praktične koristi. Istraživanjem na 1704 bolesnica utvrđena je povezanost vaskularne invazije s veličinom tumora, statusom limfnih čvorova te stupnjem diferencijacije (168). Bolesnice s tumorima bez vaskularne invazije imale su duže razdoblje bez ponovnog pojavljivanja bolesti i duže preživljavanje.

### **2.2.7. Receptor za epidermalni čimbenik rasta**

Receptor za epidermalni čimbenik rasta (EGF od engl. epidermal growth factor) može se prikazati munohistokemijski na membranama izoliranih tumorskih stanica dobivenim iz karcinoma dojke ili metastaze u limfnom čvoru. Mnogi karcinomi dojke sadrže ili otpuštaju EGF i/ili transformirajući čimbenik rasta  $\alpha$  (TGF, od engl. transforming growth factor ) koji se može vezati i za receptor epidermalnog čimbenika rasta. Izlučivanje tih čimbenika rasta može, ukoliko je prisutan receptor za EGF, utjecati na proliferaciju tumorskih stanica. Karcinomi koji sadrže visoku razinu receptora za epidermalni čimbenik rasta slabije su diferencirani, imaju manje estrogenih receptora i općenito agresivnije ponašanje (179). Ujedno imaju i veći indeks proliferacije (16) te se stoga u tih bolesnica može očekivati dobar učinak kemoterapije.

### **2.2.8. Onkogen *c-erbB-2***

Opisane su brojne abnormalnosti onkogeni u raku dojke. Gen *c-erbB-2* kodira stanični površinski receptor koji je srodan receptoru za EGF. Amplifikacija *erb B2/neu* gena uočena je u 5-30% slučajeva raka dojke, a praćena je s prekomjernom ekspresijom proteina p185<sup>erb2</sup> (202). Pretjerana ispoljenost ovog gena javlja se kod agresivnijih lezija sa lošom prognozom (83),



premda ima i drugačijih opažanja (7). U miševa transgeničnih za onkogen erb B2/neu vrlo često se javlja adenokarcinom. Sainsbury i suradnici utvrdili su da je prisustvo receptora za EGF značajni parametar u predviđanju preživljavanja u bolesnica s negativnim limfnim čvorovima (178).

### **2.2.9. Katepsin D**

Katepsini su porodica enzima koja razgrađuje unutrašnje veze različitih proteina. Normalno tkivo dojke sadrži malo ovog enzima, ali u raka dojke dolazi do pojačanog lučenja (173). Pretpostavlja se da ovaj enzim ima ulogu u razgradnji bazalne membrane i vanstaničnog matriksa, što je jedna od stepenica u metastatskom procesu. Također, može direktno podraživati stanice raka dojke na rast (215). U bolesnica s višom razinom katepsina D, razdoblje bez ponovnog pojavljivanja bolesti i preživljavanje je kraće, neovisno o stanju hormonskih receptora, veličini tumora i stanju limfnih čvorova (207). Razina ovog enzima može predvidjeti i pojavu metastaze (195).

## **2.3. STANIČNA ADHEZIJA**

Funkcioniranje mnogostaničnih organizama temelji se na odgovarajućoj integraciji sastavnih elemenata, uključujući stanice i vanstanični matriks. Integracija pri tom podrazumijeva odgovarajuću adheziju, kao i komunikaciju između stanica.

Stanična adhezija podrazumijeva međusobno prianjanje stanica te prianjanje stanica za proteine vanstaničnog matriksa. Omogućuje međusobno povezivanje stanica i, posredstvom veze sa citoskeletom, određuje općenitu arhitekturu tkiva. Prema tome, stanične adhezijske sustave treba posmatrati kao mehanizme koji pomažu u prevođenju osnovne genetske informacije u složeni trodimenzionalni uzorak stanica u tkivima.

Pored uloge u morfogenezi i održavanju tkivne arhitekture, adhezija ima značajnu ulogu u brojnim drugim procesima kao što su upala, zgrušavanje krvi, cijeljenje rana, aktivacija limfocita, programirana stanična smrt te u procesima proliferacije i diferencijacije (5,46,86,177,194).

### **2.3.1. Funkcionalna jedinica stanične adhezije**

Funkcionalna jedinica stanične adhezije je kompleks tri vrste proteina: stanične adhezijske molekule/adhezijskog receptora, proteina vanstaničnog matriksa te proteina citoplazmatske ploče i perifernog dijela membrane (86).

Stanični adhezijski receptori transmembranski su glikoproteini koji posreduju vezivanje s ligandom preko vanstaničnog dijela i određuju specifičnost međustaničnog prepoznavanja, odnosno prepoznavanja stanica i vanstaničnog matriksa. Oni uključuju članove integrinske, kadherinske, imunoglobulinske, selektinske i proteoglikanske superfamilije te molekulu CD44. Na vanstaničnoj površini stanični adhezijski receptori prepoznaju i vežu se za drugi stanični adhezijski receptor ili za proteine vanstaničnog matriksa.

Proteini vanstaničnog matriksa su glikoproteinske makromolekule, kao što su kolageni, fibronektini, laminini i proteoglikani, koji se udružuju u fibrile ili druge složene makromolekularne strukture. Zahvaljujući vezivanju za stanični adhezijski receptor, oni se mogu biti čvrsto vezati na staničnu površinu.

Na unutarstaničnoj površini membrane stanični adhezijski receptori povezani su s citoplazmatskom pločom i proteinima perifernog dijela membrane. Proteini citoplazmatske

ploče povezuju adhezijske sustave sa citoskeletom, reguliraju funkciju adhezijske molekule i prenose signale koji su stvoreni na površini stanice posredstvom adhezijskog receptora.

### **2.3.2. Održavanje tkivne arhitekture**

Adhezivni elementi koji stabilno povezuju stanice imaju značajnu ulogu u općoj organizaciji i funkciji tkiva. Iako su adhezivni kontakti prilično stabilni, ne treba ih posmatrati kao statične, jer u mnogim slučajevima održavanje stabilnih veza zahtijeva aktivne stanične procese.

#### **2.3.2.1. Spojevi tipa adherens**

Jedna od najznačajnijih i najčešćih adhezijskih interakcija koja je neophodna za održavanje solidnih tkiva posredovana je kadherinskim adhezijskim molekulama (86). Kadherini su transmembranski proteini koji posreduju o kalciju ovisnu adheziju (5,69,202). U velikoj količini nalaze se gotovo u svim solidnim tkivima. Kontinuirana ispoljenost i funkcionalna aktivnost kadherina omogućuje čvrsto udruživanje stanica u epitele i održavanje u tom obliku. Brojni drugi adhezijski i spojni proteini na epitelnim stanicama ne mogu održati međustaničnu adheziju bez kadherina. Za održavanje adhezijske funkcije kadherini moraju stvarati komplekse sa kateninima, proteinima citoplazmatske ploče i s aktinskim citoskeletom.

Kadherini su glavni adhezijski receptori epitelnih spojeva tipa zonula adherens, gdje su u vezi sa snopovima aktinskih filamenata. Aktinski filamentu nisu uvijek neophodni za ostvarivanje čvrste adhezije. Ovakav tip međustaničnog spoja i udruženost sa aktinskim filamentima potreban je u epitelima koji su izloženi snažnim kontraktilnim ili mehaničkim silama na apikalnom polu, npr. u probavnom sustavu ili u području uvlačenja epitela te na mjestu cijeljenja rana.

Strukturne i ostale karakteristike kadherina opisane su u poglavlju 2.4.3.

#### **2.3.2.2 Dezmosomski spojevi**

Dezmosomi su adhezivni elementi u epitelu i srčanom mišiću. Povezani su s citoskeletnom mrežom intermedijarnih filamenata (citokeratinima u epitelnim stanicama te dezminskim filamentima u mišićnim stanicama). Adhezijski receptori dezmosoma članovi su

cadherinske superfamilije, a povezani su s mrežom intermedijarnih filamenata pomoću dezmozoplakina i plakoglobina, proteina citoplazmatske ploče. Dezmosomi zajedno s intermedijarnim filamentima čine kontinuiranu mežu kroz tkiva koja im daje napetost i odgovarajuću mehaničku snagu za održavanje tkivnog integriteta, što je od posebne važnosti za tkiva koja su podložna snažnom mehaničkom opterećenju. Značaj ovog adhezijskog sustava u održavanju tkivnog integriteta najbolje oslikavaju autoimune i nasljedne bolesti, npr. pemfigus, u kojeg se, zbog poremećaja na razini dezmosoma, stvaraju bule u epidermisu (86).

### **2.3.2.3. Spojevi tipa okludens**

Sposobnost stvaranja selektivno propusne barijere jedna je od najznačajnijih funkcijskih osobina tkiva. Stanice su često organizirane u tkivne odjeljke koji služe za regulaciju kretanja stanica, makromolekula, otopljenih tvari i iona. Uobičajeni primjeri su kontrola prometa leukocita kroz endotel i epitel, selektivna adsorpcija hranjivih tvari u probavnom traktu, održavanje elektrolitne ravnoteže u živčanom sustavu pomoću krvno-moždane barijere. Čvrsti spojevi tipa zonula okludens najznačajniji su adhezivni elementi koji stvaraju selektivno propusne barijere u tkivima poput epitela i endotela. Čvrsti spojevi imaju dvostruku ulogu: određuju propusnost prostora između susjednih stanica i dijele površinu stanice u dvije funkcionalno i biokemijski različite regije koje su udružene s jednim od dva fiziološka odjeljka.

### **2.3.2.4. Adhezija stanica za vanstanični matriks i bazalnu membranu**

Adhezija stanica za vanstanični matriks ključna je za održavanje integriteta tkiva. Stanice prijanjaju za proteine intersticijskog matriksa ili za bazalnu membranu koja predstavlja omotač vanstaničnog matriksa oko različitih epitelnih i mezenhimalnih tkiva. Stanice koriste različite adhezijske receptore za prijanjanje uz vanstanični matriks, a najznačajniji su integrini i sindekani, stanični površni proteoglikani (30,177). Značenje ove adhezije pokazuju brojne nasljedne i autoimune bolesti u kojih je poremećena struktura u vanstaničnom matriksu ili adhezija stanica za vanstanični matriks. Primjer je Duchenn-ova mišićna distrofija, nasljedna bolest u koje je promijenjen protein citoplazmatske ploče, distrofin. Taj protein povezuje citoplazmatski skelet s receptorom za laminin bazalne membrane. Gubitak funkcionalnog prijanjanja stanične membrane mišićnog vlakna za bazalnu membranu dovodi do poremećaja funkcije mišićnog tkiva. U ovom slučaju adhezijski proteinski kompleks nema samo ulogu u

razvoju mišićnog tkiva, već ima potpornu ulogu, čineći mišićna vlakna otpornim na naprezanje pri mišićnim kontrakcijama.

Pored mehaničke uloge bazalna membrana sadrži informaciju koja određuje položaj stanica koje za nju prijanjaju. Primjer je razvoj epitelnog polariteta, gdje prijanjanje stanica za bazalnu membranu potiče stvaranje apikalno-bazalne osovine.

### **2.3.3. Regulacija stanične adhezije**

Promjenjivost stanične adhezije ukazuje na potrebu njene regulacije. Najbolje je proučena regulacija integrinskih receptora, a odvija se na nekoliko razina. Najčešći načini regulacije su promjena afiniteta adhezijskog receptora za ligand te grupiranje adhezijskih receptora. Ta regulatorna zbivanja javljaju se ili u odgovoru na unutarstanične promjene (često se označava kao signaliranje iznutra prema van) ili kao posljedica vezivanja za ligand (često se označava kao zbivanja nakon receptorskog zauzeća), a često nakon oba mehanizma.

Promjena afiniteta adhezijskog receptora glavni je mehanizam aktivacije trombocitnog integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 te poticanja adhezije posredovane leukocitnim  $\beta$ 2 integrinima. Te molekule za vrijeme aktivacije podliježu konformacijskim promjenama, čime se mijenja afinitet za ligand. Tijekom aktivacije trombocita integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 provodi se u stanje visokog afiniteta za topivi fibrin ili von Willebrandov faktor. Ta regulacija od izuzetnog je biološkog značaja jer se tako sprečava agregacija cirkulirajućih trombocita u odsustvu odgovarajućeg hemostatskog podražaja.

### **2.3.4. Čvrsta adhezija, širenje i gibanje stanica**

Integrini su dobili ime po svojoj ulozi posrednika između vanstaničnog matriksa i citoskeleta stanice. Većina integrina veže se za snopove aktinskih filamenata. Izuzetak je integrin u sastavu hemidezmosoma ( $\alpha$ 6 $\beta$ 4) koji se veže za intermedijarne filamente. Nakon vezivanja integrina za ligand, citoplazmatski rep  $\beta$  lanca veže se za talin i a-aktinin, a to dovodi do udruživanja kompleksa unutarstaničnih proteina koji povezuju integrin za aktinske filamente. Na taj način stvaraju se žarišni kontakti između stanica i vanstaničnog matriksa. Povezivanje s citoskeletom također omogućuje grupiranje integrina na površini stanica, što je uvjet ostvarivanja čvrstog spoja. Naime, integrini se razlikuju od staničnih površnih receptora za hormone i druge topive signalne molekule po slabom afinitetu vezivanja za ligand te po 10-



100 puta većoj koncentraciji na površini stanice u odnosu na druge receptore. Vežući se istovremeno za brojne makromolekule matriksa, ali slabim afinitetom, stanica može istraživati svoj mikrokoliš. Ako bi vezivanje bilo presnažno, stanice bi vjerojatno postale nepovratno priljubljene uz matriks, što bi im onemogućilo kretanje.

Žarišni kontakti uobičajeni su tip adhezivnih kontakata koje stanice ostvaruju s vanstaničnim matriksom. Oni se ostvaruju pomoću integrina kao glavnih adhezijskih receptora (premda su značajni i membranski proteoglikani) i proteina citoplazmatske ploče kao što su  $\alpha$ -aktinin, talin, vinkulin te brojne protein-kinaze. Žarišni kontakti glavna su mjesta prijanjanja aktinskih filamenata za staničnu površinu, a njihovo stvaranje je udruženo s promjenom oblika stanice u vidu širenja, tj. rastezanja, što je preduvjet za pokretljivost stanice. Naime, kretanje stanice uvjetovano je ciklusom procesa širenja, rastezanja posredovanog citoskeletom, stvaranjem adhezivnih kontakata na predvođem kraju stanice te gubitkom adhezivnih kontakata i retrakcijom, također ovisnom o skeletu, na suprotnom kraju stanice.

Stvaranje žarišnih kontakata regulirano je vezivanjem za ligand, a također i unutarstaničnim signalnim zbivanjima. Vezivanje za ligand potiče smještanje  $\beta 1$  i  $\beta 3$  integrina u područje žarišnih kontakata (182). Citoplazmatska domena  $\beta$  podjedinice posjeduje unutrašnji signal za smještanje u područje žarišnog kontakata, ali  $\alpha$  podjedinica to sprečava. Vezivanje liganda otpušta tu inhibiciju i daje citoplazmatskom repu  $\beta$  podjedinice signal za usmjeravanje integrinskog dimera u žarišne kontakte. Za djelotvorno stvaranje žarišnih kontakata neophodno je i grupiranje receptora i njegovo zauzeće. Kombinacija grupiranja i zauzeća pokreće sinergistički odgovor koji uključuje reorganizaciju citoskeleta, udruživanje proteina citoplazmatske ploče te aktivaciju lokalnih signalnih puteva (182).

Stvaranje i otpuštanje žarišnih kontakata regulirano je i lokalno stvorenim unutarstaničnim signalnim putevima. U stvaranje žarišnih kontakata uključene su kinaze FAK (od engl. focal adhesion kinase) (111), druge ne-receptorske kinaze te fosforilacija tirozina adhezijskih proteina kao što su paksilin i tenzin. Žarišne kontakte regulira i Rho subporodica proteina koji vežu GTP. Te GTP-aze djeluju stepenasto u regulaciji različitih tipova udruživanja aktina i stanične membrane. Integrini mogu regulirati nivo fosfatidil-inozitol-bifosfata ( $PIP_2$ ) na način koji je ovisan o Rho proteinim, a  $PIP_2$  dovodi do polimerizacije aktinskih filamenata. Ti podaci ukazuju na to da Rho i druge GTP-aze mogu također sudjelovati u lokalnim signalnim zbivanjima koja vezivanje integrina s ligandom udružuju sa stvaranjem žarišnih kontakata.

Signali pokrenuti izvana, putem receptora za čimbenike rasta, također snažno djeluju na adheziju i pokretljivost stanice. Ti su signalni putevi vrlo slični lokalnim signalima koji su potaknuti stvaranjem žarišnih kontakata. Npr. Rho subporodicu GTP-aza stimuliraju serumski čimbenici, a metabolizam fosfatidil-inozitola vezan je za funkciju brojnih staničnih površinskih receptora. To preklapanje lokalno stvorenih signala i signalnih zbivanja pokrenutih receptorima za čimbenike rasta predstavlja način na koji vanjski signali reguliraju udruživanje u žarišne kontakte i njihovo otpuštanje. Drugi proteini koji prenose signal, kao što su protein-kinaza C i fosfolipaza A2, također mogu potaknuti udruživanje u žarišne kontakte i gibanje stanice.

### 2.3.5. Stanična adhezija i prijenos signala

Adhezijske molekule sudjeluju u brojnim signalnim zbivanjima, važnim za regulaciju adhezije i stanične pokretljivosti, rasta stanica, apoptoze te regulaciju nekih gena (86,101,111). Za integrine dobro su poznati biokemijski signalni putevi koji uključuju fosforilaciju proteina i stvaranje citoplazmatskih "drugih glasnika".

Prije svega, postavlja se pitanje zašto postoji potreba za odašiljanjem signala putem adhezijskih molekula, čija je glavna uloga u posredovanju fizičkih veza među stanicama, kad postoji obilje staničnih površinskih receptora čija je prvenstvena uloga odašiljanje signala. Iako se može reći da je adhezijske molekule jednostavno priroda odabrala da obnašaju obje funkcije, očigledno postoje i funkcionalni razlozi za povezivanje određenih signalnih zbivanja s određenim adhezijskim zbivanjima. S tim u svezi, korisno je razlikovati 2 oblika signalnih zbivanja: signali koji kontroliraju lokalne citoplazmatske procese i signali koji utječu na rast i diferencijaciju, posebice oni koji utječu na regulaciju staničnog ciklusa i prepisivanje gena.

Lokalna regulacija citoplazmatskih procesa, uključujući promjene citoskeleta, sekreciju i kontrolu same adhezije, glavna je osobina signalnih zbivanja posredovanih integrinima. To se najbolje uočava na primjeru trombocita, staničnih fragmenta bez jezgre i bez kontrole staničnog ciklusa. U trombocitima se integrinima pokreće većina glavnih zbivanja fosforilacije, a u njima sudjeluju i brojne kinaze i njihovi supstrati, kao i sistemi za stvaranje "drugih glasnika". Njihova uloga je regulacija zbivanja nakon agregacije trombocita, kao što je širenje trombocita (sukladno staničnom), kontrakcija trombocita radi retrakcije ugruška i sekrecija trombocitnih granula putem egzocitoze. Razlog zbog kojeg ti signali ovise o adheziji posredovanoj integrinima (preko  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) je očigledan: oni su potrebni samo nakon agregacije trombocita.

Slično tome, većina signala koji se javljaju u područjima adhezije za vanstanični matriks vjerojatno predstavlja lokalnu regulaciju udruživanja u žarišne kontakte te regulaciju staničnog gibanja, iako se ti signali mogu koristiti i za kontrolu rasta i diferencijacije stanica. Snažno prianjanje za supstrat posredovano integrinima služi kao zapreka za nastavak staničnog ciklusa. To je osobina stanica koja se gubi tijekom zloćudne transformacije stanice. Brojne činjenice upućuju na povezanost signala, koji nastaju žarišnim kontaktima, s putevima koji reguliraju staničnu proliferaciju. Adhezija fibroblasta za fibronektin dovodi do aktivacije Ras/MAP kinaze, koji je inače aktiviran mitogenim čimbenicima rasta. Biokemijski mehanizmi za aktivaciju Ras/MAP kinaze pomoću integrina je prethodno opisan. Kinaza FAK, koja je udružena sa žarišnim adhezijskim proteinima, povezana je preko posrednika s ras porodicom proteina, što predstavlja vezu između aktivacije FAK proteina i dobro poznatih puteva mitogeneze.

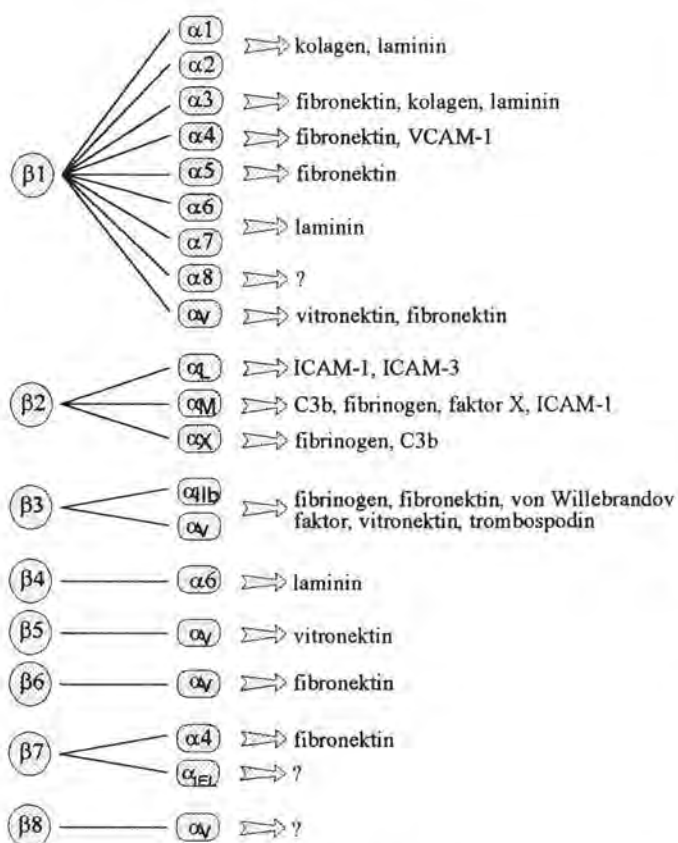
Odašiljanje signala vezano uz staničnu adheziju važno je za razvoj tkiva tijekom embriogeneze. Za kontrolu uzorka morfogeneze neophodni su lokalizirani signali u vanstaničnom matriksu. Bazalna membrana sadrži takve signale, koji mogu inducirati široki raspon tipova endotelnih stanica i tipova epitelnih stanica duž sloja kontinuiranog epitela, kao što su tubuli bubrega. Primjer je i s-laminin lokaliziran u bazalnoj membrani sinaptičke regije mišićnog vlakna. Iako i laminin i s-laminin mogu omogućiti adheziju motoneurona i pokretljivost aksona tijekom rasta, s-laminin daje specifični stop signal koji određuje mjesto stvaranja sinapse. Na rast aksona utječu i semiforini, članovi imunoglobulinske superfamilije. Kada aksoni tijekom rasta dođu u kontakt s adhezijskim receptorima na površini stanice, skvrčavaju se i zatim kreću drugim smjerom. Svi ovi primjeri potvrđuju da proteini vanstaničnog matriksa i adhezijske molekule imaju primarnu ulogu u lokalizaciji signala, a ne u ostvarivanju čvrstih fizičkih kontakata.



## 2.4. ADHEZIJSKE MOLEKULE

Adhezijske molekule su površinski stanični receptori koji posreduju veze među stanicama te veze stanica s proteinima vanstaničnog matriksa (69,73). Međusobno prianjanje stanica, kao i prianjanje za proteine vanstaničnog matriksa, značajno je zbivanje tijekom embrionalnog razvoja, u upalnom odgovoru i cijeljenju rana, imunološkom odgovoru kao i za održavanje arhitekture tkiva. Adhezija utječe na brojne značajne stanične aktivnosti kao što su proliferacija, diferencijacija i apoptoza. Poznato je nekoliko obitelji adhezijskih receptora: integrini, imunoglobulinska superfamilija, kadherini, selektini, proteoglikani stanične membrane i porodica CD44.

### 2.4.1. Integrini

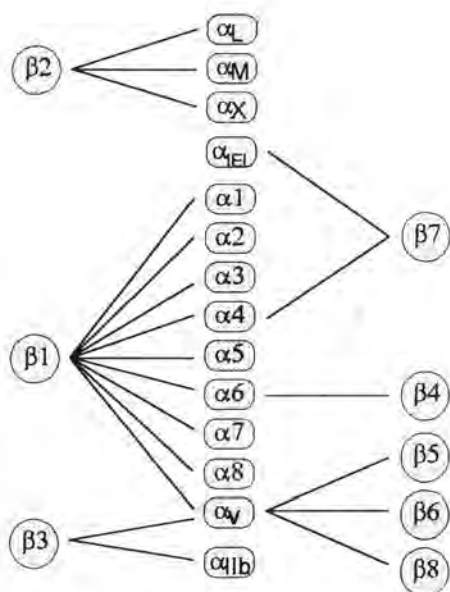


Slika 1. Obitelj integrinskih receptora

Integrini su heterodimeri koji se sastoje od nekovalentno udružene  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice (36,95,100, 116,177). Neki od integrina djeluju kao receptori za proteine vanstaničnog matriksa kao što su fibronektin, laminin, fibrinogen i vitronektin, drugi omogućuju međustanično prianjanje, a neki imaju obje uloge (slika 1). Naziv su dobili po pretpostavljenoj ulozi da integriraju vanstanični mikrookoliš (vanstanični matriks ili druge stanice) s unutarstaničnom mrežom. Većina integrina ispoljena je na različitim vrstama stanica, a pojedinačne stanice ispoljavaju nekoliko različitih integrina. Prisutni su

gotovo kroz čitavo filogenetsko stablo, specifične strukturne osobine konzervirane su u različitim vrstama, uključujući sisavce, ptice, vodozemce, insekte i gljivice (96,144). Do sada je

poznato 14  $\alpha$  i 8  $\beta$  podjedinica (3,5,30,101). Iako se najčešće koristi nomenklatura iz slike, u literaturi se još uvijek spominju i stariji nazivi. Npr. integrin specifičan za trombocite,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, često se označava kao gpIIb-IIIa, također, leukocitni  $\beta$ 2 integrini često se označavaju starijim imenima kao što su LFA-1, Mac-1 i p150,95. To su jedini integrini za koje se često koristi CD nomenklature ( $\beta$ 2 = CD18, pridružene  $\alpha$  jedinice = CD11a,b,c). Neki  $\beta$ 1 integrini označavaju se kao VLA antigeni (od engl. very late after activation antigens) zbog kasne pojave  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 (VLA1) i  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (VLA2) na limfocitima T nakon aktivacije *in vitro* (96).



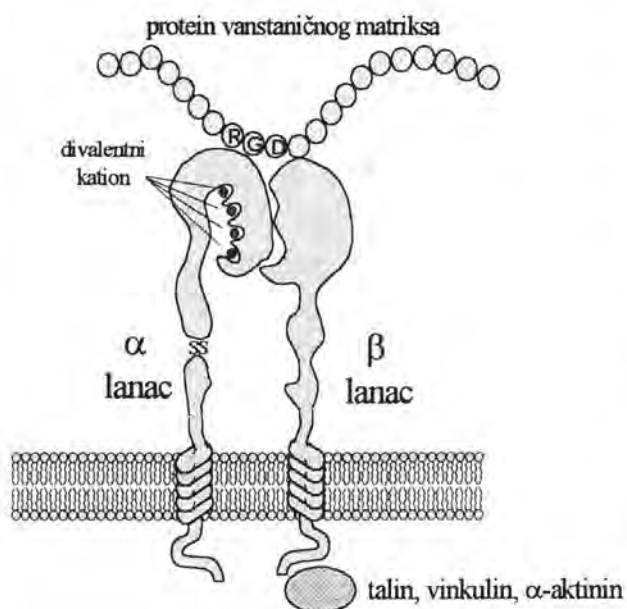
Slika 2. Udruživanje integrinskih podjedinica

Iako bi 8  $\beta$  i 14  $\alpha$  podjedinica teoretski mogli dati više od 100 različitih integrinskih heterodimera, njihov broj ipak je mnogo manji s obzirom da se neke  $\alpha$  jedinice udružuju samo s određenom  $\beta$  jedinicom. Npr. leukociti ispoljavaju i  $\beta$ 1 i  $\beta$ 2 integrine, ali se  $\alpha$  jedinice udružuju samo s jednom od te dvije  $\beta$  jedinice. Ipak, neke  $\alpha$  jedinice udružuju se s više  $\beta$  jedinica, naročito  $\alpha$ v (slika 2). Određeni integrini često se mogu vezati za više liganda. Isto tako, jedan ligand je često prepoznat od više integrina. Neki integrini specifični su za određenu vrstu stanica, npr.  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ispoljen je isključivo na megakariocitima i trombocitima, a  $\beta$ 2 integrini ispoljeni su samo na leukocitima (194).  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 je specifičan za epitelne stanice i tumore koji od njih potječu (113).

#### 2.4.1.1. Građa integrina

Obje podjedinice transmembranski su glikoproteini, svaka posjeduje hidrofobni transmembranski segment (slika 3). U većine integrina citoplazmatska domena je kratka i sadrži 50-ak aminokiselina. Izuzetak je  $\beta$ 4 podjedinica, u koje se citoplazmatska domena sastoji od preko 1000 aminokiselina. Vanstanične domene (više od 75 kDa za  $\beta$  i više od 100 kDa za  $\alpha$  podjedinicu) udružene su u  $\alpha\beta$  heterodimer. Ispitivanja elektronskim mikroskopom pokazala su da integrini sadrže globularnu glavu koja se sastoji od N-terminalnih dijelova obje podjedinica i dva odvojena repa koja se pružaju u lipidni dvosloj i predstavljaju C-terminalni

dio molekule. Obje podjedinice sadrže brojne disulfidne veze. Sve  $\alpha$  podjedinice sadrže 7 puta ponovljeni homologni segment koji se nalazi u N-terminalnoj polovici molekule. Također, sadrže 18-24 cisteinskih ostataka od kojih je 14-16 konzervirano kod svih poznatih  $\alpha$  podjedinica. Dok je ukupna sličnost među  $\alpha$  podjedinicama oko 20-30%, njihove kratke citoplazmatske domene (15-53 aminokiselina) pokazuju vrlo malo homologije, što ukazuje na mogućnost jedinstvenih citoskeletalnih interakcija za svaki tip  $\alpha$  podjedinice. Suprotno tome, među različitim vrstama homologija između C-terminalnih citoplazmatskih domena  $\alpha$  podjedinica može biti visoka.



**Slika 3. Građa integrina**

tske sekvence, a različiti receptori za određeni ligand mogu se razlikovati po udruživanju s citoskeletom.

Vezivanje integrina za njihove ligande ovisno je o kationima. Integrini prepoznaju specifične aminokiselinske sekvence liganda. Najbolje istražena je RGD sekvenca (Arg-Gly-Asp), koju posjeduju brojni proteini vanstaničnog matriksa kao što su fibronektin, fibrinogen, trombospondin, vitronektin, laminin i tip1 kolagena (180). Ipak, ta RGD sekvenca nije dostupna na svim molekulama matriksa. RGD sekvenca na lamininskom A lancu je skrivena, a isto tako i dvije RGD sekvence na fibronektinskom  $\alpha$  lancu. One postaju izložene nakon proteolitičke razgradnje liganda. To ukazuje da interakcije integrina i matriksa *in vivo* mogu biti regulirane proteolitičkim cijepanjem, što se zbiva u akutnoj upali ili u područjima

Među  $\beta$  podjedinicama postoji sličnost od 44-47% s potpunim konzerviranjem svih 56 cisteina. Većina tih cisteinskih ostataka nalazi se unutar 4 ponovljene domene u C-terminalnoj polovici molekule. N-terminalni kraj (45-50 kDa) nabran je unutarlančanim disulfidnim petljama i pripada domeni koja veže ligand.

Citoplazmatske domene povezuju se s proteinima citoskeleta, a vjerojatno i s drugim citoplazmatskim molekulama. Kao što je spomenuto, različite  $\alpha$  podjedinice imaju različite citoplazma-

invazivnog rasta tumorskih stanica. Za neke integrine utvrđene su druge sekvence, npr. LGGAKQAGDV za fibrinogen i GPEILDUPST za fibronektin (3,30).

Afinitet integrina za njihove ligande reguliran je i drugim mehanizmima. U nekih integrina na vezivanje utječu dvovalentni kationi. Npr.  $Mg^{2+}$  pojačava vezivanje  $\alpha 5\beta 1$  za fibronektin i  $\alpha 6\beta 1$  za laminin, a  $\alpha 6\beta 1$  ne veže laminin ako je prisutan samo kalcij (30). Afinitet nekih integrina ovisi o fosfolipidnom sastavu okolne stanične membrane te o glikozilaciji i fosforilaciji integrinske molekule. Neki integrinski lanci sadrže brojna fosforilacijska mjesta (serin i tirozin). Konačni mehanizam kojim se može mijenjati afinitet integrina je izmjenično cijepanje RNK za  $\alpha$  i  $\beta$  lanac.

Prema tome, može se zaključiti da je RGD sekvenca ključni element vezivanja integrina i matriksa, no različiti mehanizmi određuju na kojoj stanici, na kojim membranskim domenama i pod kojim uvjetima su integrini prisutni u funkcionalno aktivnom obliku.

#### 2.4.1.2. $\beta 1$ integrini

Ova skupina obuhvaća najveći broj integrina, a označavaju se i kao VLA antigeni (96). VLA antigeni su molekule koje se javljaju na limfocitima nekoliko dana nakon aktivacije mitogenima. Svi imaju zajedničku  $\beta$  podjedinicu, a razlikuju se u  $\alpha$  podjedinicama ( $\alpha 1-8$  te  $\alpha v$ ). Sudjeluju u međusobnom povezivanju stanica te povezivanju stanica za proteine vanstaničnog matriksa. Klasični fibronektinski receptor ( $\alpha 5\beta 1$ ),  $\alpha v\beta 1$  fibronektinski receptor, te lamininski receptori  $\alpha 6,7,8\beta 1$  imaju jedinstvene ligande, dok se ostali  $\beta 1$  integrini mogu vezati za više liganda. Također, prepoznavanje određenog liganda ovisi o tipu stanice na kojoj je integrin ispoljen.

$\beta 1$  integrini ubikvitarne su molekule. Barem jedan član integrinske obitelji nađen je na bilo kojoj ispitivanoj stanici ili tkivu. Stanice većine tkiva ispoljavaju  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  i  $\alpha 6\beta 1$  integrine koji vežu kolagen i laminin, dok je  $\alpha 5\beta 1$  fibronektinski receptor slabo zastupljen u većine tkiva. Izuzetak je endotel velikih krvnih žila. Leukociti sadrže integrine  $\beta 2$  porodice zajedno s  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta$ ,  $\alpha 6\beta 1$  i  $\alpha 4\beta 7$  (5,96).

Imunohistokemijska ispitivanja lokalizacije  $\beta 1$  lanca pokazale su njegovu široku zastupljenost. Prisutan je na gotovo svim tipovima epitela, a nalazi se na bazalnoj površini stanice u dodiru s bazalnom membranom te na bočnim površinama između epitelnih stanica. U epidermisu,  $\alpha 3\beta 1$  na bazalnoj površini bazalnih stanica specifično se veže s epiligrinom,



proteinom epidermalne bazalne membrane (39).  $\beta 1$  lanac nalazi se i na bazalnoj površini endotela, na brojnim stanicama mezenhimalnog porijekla uključujući leukocite, trombocite, fibroblaste, mišićne i živčane stanice.

Specifičnost za ligand različitih  $\beta 1$  heterodimera ovisna je o specifičnim karakteristikama  $\alpha$  lanaca.

#### 2.4.1.3. $\beta 2$ integrini

Integrini  $\beta 2$  skupine poznati su i kao LEU-CAM budući da se nalaze isključivo na leukocitima, a u CD nomenklaturi nose oznaku CD18. Skupinu čine tri leukocitna adhezijska receptora: LFA-1, Mac-1 i p150,95 (116). Beta lanac molekularne težine 95 kDa zajednički je za sva tri člana, dok im se alfa lanci razlikuju (MT 180, 170, odnosno 150 kD) i nose oznaku CD11a, b i c.

LFA-1 (od engl.lymphocyte function antigen) nalazi se na većini stanica bijele loze, a sudjeluje u interakciji među leukocitima te adheziji leukocita za endotel. Osim toga, posreduje priljublivanje citotoksičnih limfocita T za ciljne stanice, u miješanoj limfocitnoj reakciji, proliferaciji limfocita T izazvanoj antigenom ili mitogenom te u odgovoru protutijela ovisom o limfocitima T (65,130,162). Ligandi za LFA-1 su ICAM-1, -2 i -3, članovi imunoglobulinske superfamilije. LFA-1 molekula javlja se u dva oblika, aktivnom i neaktivnom. Ukoliko bi postojao samo jedan oblik, došlo bi do spontanog agregiranja leukocita periferne krvi. Svježe izolirani leukociti ne stvaraju agregate iako imaju vrlo visoku razinu LFA-1 i ICAM-1 molekule. No, nakon stimulacije s antigenom ili stimulacijom limfocita putem CD3 ili CD28 molekule, dolazi do brze agregacije citotoksičnih limfocita T, a ona je odraz promjene aktivnosti LFA-1 molekule (65,162).

Mac-1 (CR3,CD11b/CD18,  $\alpha_M\beta_2$ ) ima ograničenu tkivnu raspodjelu u usporedbi s LFA-1. Nalazi se na monocitima, makrofagima, granulocitima, velikim granuliranim limfocitima i nezrelim CD5+ stanicama (116,170). Prepoznaje brojne ligande kao što su proteini vanstaničnog matriksa (fibronektin, laminin, kolagen, elastaze), članovi imunoglobulinske superfamilije (ICAM-1 i ICAM-2), proteini uključeni u zgrušavanje krvi (fibrinogen, faktor X, kininogen) te iC3b, produkt aktivacije komplementa. Uz proteinske, prepoznaje i brojne neproteinske ligande kao što su lipopolisaharid, zymosan, beta-glikani, heparini i proteoglikani (170). Vezivanje s ligandom pokreće različita unutarstanična signalna

zbivanja koja reguliraju odgovor leukocita, kao što je fagocitoza, degranulacija, adhezija, migracija, agregacija, ispoljavanje prokoagulantne aktivnosti i adherencija za mikroorganizme. Zajedno sa LFA-1 igra središnju ulogu u posredovanju čvrste adhezije leukocita za endotel.

Protein p150,95 ima sličnu tkivnu raspodjelu kao i Mac-1. Ispoljen je i na nekim aktiviranim limfocitima i marker je za leukemiju vlasastih stanica (116). Posreduje interakcije među leukocitima te između leukocita i endotelnih stanica. Osim u upali, uključen je i u kemotaksiju, aktivaciju limfocita B i ubijanje posredovano citotoksičnim limfocitima T. Ligandi za p150 su fibrinogen i iC3b komponenta komplementa.

Najbolji primjer biološkog značaja  $\beta 2$  integrina kongenitalna je bolest u kojoj je mutiran zajednički  $\beta 2$  lanac, a posljedica je izostanak adhezije leukocita. (LAD-leukocyte adhesion deficiency). Bolesnici imaju ponavljane infekcije, njihovi neutrofilni ne migriraju u smjeru kemotaktične tvari i ne mogu se vezati ni proći kroz endotel na mjestu infekcije.

#### 2.4.1.4. $\beta 3$ integrini

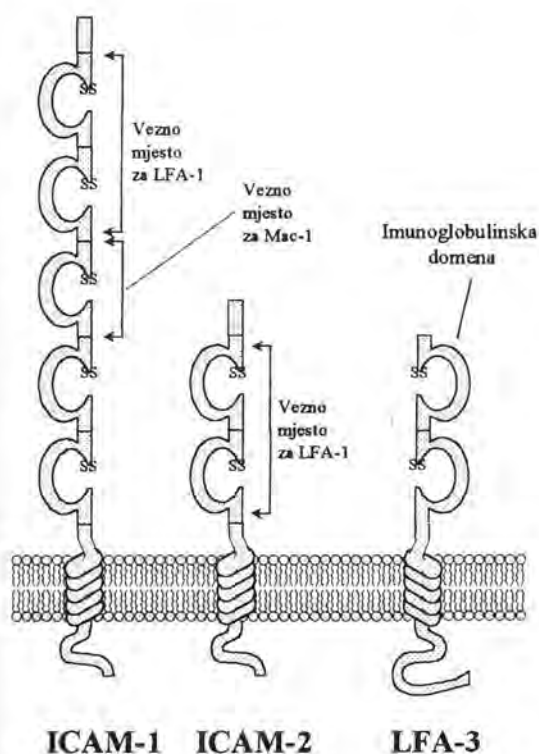
U ovoj skupini nalaze se  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  te  $\alpha \text{v}\beta 3$ .  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  nalazi se samo na trombocitima, a djeluje kao receptor za fibrinogen, iako može s manjim afinitetom vezivati i fibronektin, vonWillebrandov čimbenik i trombospondin. Na tim ligandima prepoznaje RGD sekvencu. Nasuprot drugim integrinima,  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  nije funkcionalan na mirujućim, već samo na aktiviranim trombocitima.

Drugi član  $\beta 3$  skupine je  $\alpha \text{v}\beta 3$ , receptor za vitronektin. Široko je rasprostranjen i nalazi se na gotovo svim mezenhimalnim stanicama *in situ* i u kulturi. On također veže više liganda kao što su vitronektin, fibrinogen, trombospondin i vonWillebrandov čimbenik, na kojima prepoznaje RGD sekvencu. Taj receptor sudjeluje i u međustaničnim interakcijama. Primjerice, protutijelima protiv vitronektinskog receptora može se blokirati sposobnost makrofaga da fagocitiraju neutrofile i limfocite koji su podlegli apoptozi (183).

#### 2.4.2. Imunoglobulinska superfamilija

Imunoglobulinska superfamilija najzastupljenija je obitelj staničnih površinskih molekula i čini 50% leukocitnih površinskih glikoproteina (slika 4). Njihov ekstracelularni dio sačinjen je od domena koje se ponavljaju, slično onim kod imunoglobulina, a sastoje se od 90-100 aminokiselina organiziranih u paralelne beta uzvojnice, koje su obično u središtu stabilizirane

disulfidnim vezama (5,116,194). Imunoglobulinska domena podliježe mutaciji i selekciji što omogućuje obnašanje različitih uloga, kao što su receptori za čimbenike rasta (npr. receptor za čimbenik koji stimulira kolonije-1 te receptor za čimbenik rasta porijeklom iz trombocita), receptore za Fc regiju imunoglobulina te adhezijske molekule. Potonja je, izgleda, funkcija većine članova imunoglobulinske superfamilije.



**Slika 4. Građa adhezijskih molekula iz imunoglobulinske obitelji**

Neki članovi uključeni su u prepoznavanje antigena i adheziju limfocita T. To su receptor za antigen T limfocita (CD3) te koreceptori CD4 i CD8 s kojima zajedno prepoznaje kompleks antigenskog peptida i molekule glavnog sustava tkivne srodnosti na drugoj stanici; zatim same molekule glavnog sustava tkivne srodnosti (MHC) te LFA2 (od engl. lymphocyte function-related antigen) ili CD2, receptor za LFA3 (CD58) koji je također član imunoglobulinske superfamilije.

Tipični predstavnik ove obitelji adhezijskih receptora je i N-CAM (od engl. neural-cell adhesion molecule) (5,69,73). Zajedno sa L1 i TAG pripada adhezijskim molekulama ispoljenim pretežno u živčanom sustavu. One se javljaju rano tijekom embrionalnog razvoja i usmjeravaju neuronalnu histogenezu. N-CAM, za razliku od

ostalih članova ove grupe, posreduje homofilnu adheziju (slično sa sličnim). Vezan za identičnu molekulu na drugoj stanici, N-CAM se može bočno udružiti s receptorom za čimbenik rasta porijeklom iz fibroblasta i stimulirati tirozin-kinaznu aktivnost receptora te tako omogućiti rast neurita. Taj primjer ujedno pokazuje kako adhezijske molekule mogu pobuđivati stanični odgovor suradnjom sa drugim tipovima receptora.

Ostali članovi imunoglobulinske superfamilije jesu: ICAM-1, ICAM-2 i ICAM-3, VCAM, CD31 (PECAM-1) i MAdCAM-1. VCAM-1 (od engl. vascular cell adhesion molecule) posreduje adheziju leukocita za endotel. Ova je molekula ispoljena na površini endotela pod djelovanjem citokina, a služi kao ligand za limfocite i druge stanice koje ispoljavaju  $\alpha 4\beta 1(3,5)$ . PECAM-1 (od engl. platelet endothelial cell adhesion molecule) je

ispoljen pretežno na endotelnim stanicama i trombocitima. Posreduje u prolazu leukocita kroz međustanične spojeve vaskularnih endotelnih stanica (156). MAdCAM-1 (od engl. mucosal addressin cell adhesion molecule-1) je glikoprotein na endotelnim stanicama venula, a uključen je u prijelaz limfocita iz krvi u limfne čvorove te limfna tkiva pridružena sluznicama. Sastavljen je od dvije N-terminalne imunoglobulinske domene, jedna je nalik na mucin, a druga na IgA. Ligandi za MAdCAM-1 su  $\alpha 4\beta 7$  (preko N-terminalne imunoglobulinske domene) te L-selektin na površini leukocita (preko domene nalik na mucin) (97).

#### 2.4.2.1. ICAM-1

ICAM-1 površinski je glikoprotein molekularne mase 90 kDa koji posreduje adheziju u imunološkim i upalnim reakcijama. Sastoji se od ekstracelularnog, transmembranskog i citoplazmatskog dijela. Ekstracelularni dio obuhvaća 453 aminokiseline raspoređene u 5 imunoglobulinskih domena (slika 4). Domenom 1 i 2 veže se za integrinski ligand LFA-1 (CD11a/CD18) na leukocitima, a preko treće domene veže Mac-1 (CD11b/CD18). To je ujedno i jedini primjer veze između članova integrinske i imunoglobulinske obitelji. Gen za ICAM (198) vrlo je sličan genu za N-CAM, drugom članu ove obitelji. ICAM-1 može biti ispoljen na brojnim staničnim linijama, iako je njegova ispoljenost najveća u određenim stadijima diferencijacije te nakon izlaganja upalnim medijatorima *in vitro* ili u upalnim reakcijama *in vivo* (53).

Membranska ispoljenost ICAM-1 regulirana je na svim hematopoetskim linijama (32,217). Subpopulacije progenitorskih stanica u koštanoj srži snažno ispoljavaju ICAM-1, a sve stanične linije u perifernoj krvi pokazuju slabu ispoljenost ili je ona odsutna. To je u skladu s opažanjem da mononukleari u perifernoj krvi ne agregiraju, iako ispoljavaju LFA-1. Naprotiv, ICAM-1 je ispoljen na aktiviranim stanicama, tkivnim makrofagima te limfocitima B u germinativnim centrima. Osim na hematopoetskim stanicama, nalazi se i na endotelnim stanicama, epitelnim stanicama timusa, fibroblastima, epitelu tonzile (53), tubula bubrega (217), bazalnim stanicama bronhiola pluća (217), a također i na epitelnim stanicama tijekom upalnih stanja u štitnjači (18) i koži (54).

Dva su mehanizma kojima se kontrolira adhezija između ICAM-1 i LFA-1 molekule: indukcija ICAM-1 molekule na endotelnim ili akcesornim stanicama i promjene avidnosti LFA-1 nakon aktivacije limfocita (65). Površinska ispoljenost ICAM-1 može se povećati citokinima i interferonima (53). Pored toga, na vezivanje ICAM-1 molekule za LFA-1 na limfocitima



utječe i aktivacija limfocita preko CD3 molekule, tijekom prepoznavanja antigena. Oko 5-10 minuta nakon stimulacije CD3 receptora prolazno se poveća afinitet LFA-1 molekule za ICAM-1. Afinitet je reguliran CD3 receptorom putem unutarstaničnih signalnih puteva koji uključuju protein kinazu C, a praćen je konformacijskim promjenama LFA-1 molekule.

ICAM-1 i LFA-1/MAC-1 adhezijski sustavi značajni su za zbivanja tijekom upale i imunološkog odgovora. Interakcije između LFA-1 na limfocitima i ICAM-1 na endotelnim stanicama važne su za limfocitnu recirkulaciju kroz limfne čvorove i mjesta upale. ICAM-1 je također ispoljen na stanicama koje predstavljaju antigen i stoga sudjeluje u imunološkom odgovoru. ICAM-1 na epitelu timusa značajan je za interakcije s limfocitima T tijekom njihovog sazrijevanja u timusu.

Tumorske stanice također mogu ispoljavati ICAM-1. Među karcinomima, *de novo* ekspresija je uočena na pločastim karcinomima (217), karcinomu dojke (17,213,217), pluća (217), želuca (127), pankreasa (187), mokraćnog mjehura (209), debelog crijeva (157). ICAM-1 nalazi se i na površini Reed-Sternbergovih stanica kod Hodgkinovog limfoma (tipa nodularne skleroze) (217) te na stanicama ne-Hodgkinovih limfoma B fenotipa, naročito velikostaničnih (32), a najčešća i najsnažnija ekspresija opisana je na melanomima (8,33,108,157). ICAM-1 nalazi se u biološki aktivnoj formi i u serumu, vjerojatno kao rezultat proteolitičke razgradnje stanične molekule, a povišen je u bolesnika s različitim upalnim sindromima kao što su septički šok i presađivanje organa te u bolesnika s rakom (8,45,117,181,187).

#### 2.4.2.2. ICAM-2

ICAM-2 (CD102) molekula glikoprotein je molekularne mase 55-65 kDa. Ispoljen je uglavnom na nestimuliranim endotelnim stanicama te na leukocitima, a veže se za isti ligand kao i ICAM-1. Razina njegove ekspresije na endotelu veća je u odnosu na ICAM-1, ali se ne može pojačati aktivacijom citokinima. Sastoji se samo od dvije imunoglobulinske domene te je stoga za vezivanje putem ICAM-2 potreban bliži međustanični kontakt.

#### 2.4.2.3. ICAM-3

ICAM-3 (CD50), glikoprotein molekularne mase 120 kd, ligand je za leukocitne integrine LFA-1 (CD11a/CD18,  $\alpha$ L $\beta$ 2) i  $\alpha$ d $\beta$ 2. Ispoljen je konstitutivno u značajnoj mjeri na

svim nestimuliranim leukocitima te na stanicama koje predstavljaju antigen. Na nestimuliranim limfocitima T, ICAM-3 je najznačajniji ligand za LFA-1. Može igrati značajnu ulogu u poticanju imunološkog odgovora, staničnoj adheziji, prijenosu signala te stimulaciji limfocita T antigenom na površini Langerhansovih stanica, tijekom imunoloških zbivanja u koži (1).

#### **2.4.2.4. LFA-2 i LFA-3**

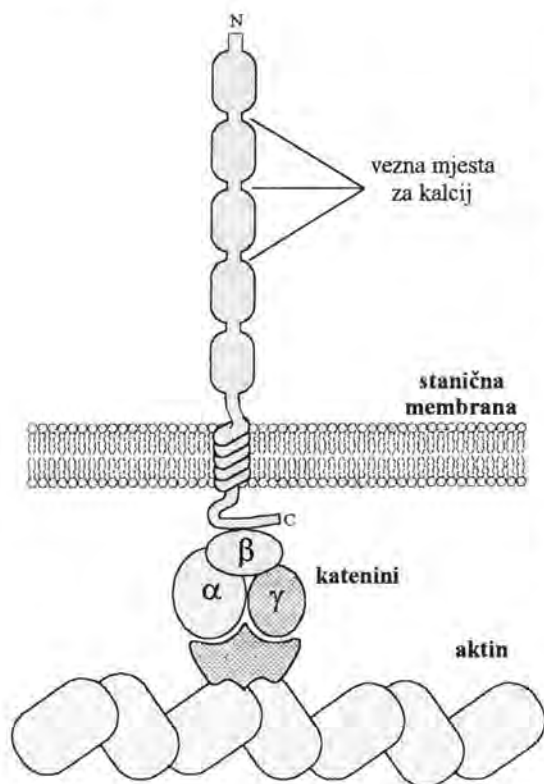
LFA-2 (CD2) stanični je površinski glikoprotein specifičan za limfocite T. Nalazi se samo na timocitima i većini limfocita T (162). Ligand za LFA-2 je LFA-3, čija je rasprostranjenost znatno veća, a nalazi se na eritrocitima, epitelnim stanicama, endotelnim stanicama, fibroblastima i većini hematopoetskih stanica (162). Veza između LFA-2 i LFA-3 omogućuje adheziju LFA-3+ stanica za timocite, stanice prirodne ubice, citotoksične limfocite T i druge zrele limfocite T. Budući da je relativna avidnost receptora za antigen na limfocitima T i antigena niska, ove interakcije osiguravaju čvršću vezu između limfocita T i stanica koje predstavljaju antigen, odnosno ciljnih stanica (162,194). Pored adhezije, utječu i na aktivaciju limfocita T i pojačavaju imunološki odgovor posredovan limfocitima T. Stoga su interakcije između LFA-2 i LFA-3 molekule značajne i za pobuđivanje imunološkog odgovora na tumorske antigene, koji su često slabo imunogenični.

#### **2.4.3. Kadherini**

U većini tkiva kontakt među stanicama ostvaren je najvećim dijelom preko kadherina, adhezijskih molekula ovisnih o kalciju (69,202). To su transmembranski glikoproteini čiji se ekstralcelularni dio sastoji od tri ponavljane domene sa sekvencama koje vežu kalcij, a citoplazmatski je povezan sa kateninima  $\alpha\beta\gamma$ , proteinima koji posreduju vezu s citoskeletom stanice (slika 5). Adhezija je homofilna, što znači da kadherinska molekula na jednoj stanici veže drugu kadherinsku molekulu, istog tipa, na drugoj stanici (3,5,73).

Postoji više tipova kadherina, a najznačajniji su N-kadherin, P-kadherin i E-kadherin. N-kadherin (od engl. neural cadherin) ispoljen je pretežno u živčanom sustavu gdje ima ulogu u migraciji neurona tijekom embrionalnog razvoja. P-kadherin (od engl. placental cadherin) nalazi se pretežno u placenti i epitelnim stanicama rožnice, epidermisa te na mezotelu, ali ih prolazno ispoljavaju i druga tkiva tijekom razvoja. Najbolje je karakteriziran epitelni E-kadherin ili uvomorulin, glikoprotein koji ima značajnu ulogu tijekom embrionalnog razvoja te

u stvaranju i održavanju epitelnih slojeva u odraslim tkivima. U crijevnom epitelu prisutan je na bočnim staničnim površinama, a također i u međustaničnim spojevima, poznatim kao *zonulae adherentes*, koji povezuju stanice u apikolateralnoj regiji. Adhezivni proteini drugih glavnih međustaničnih spojeva, dezmosoma, također su članovi kadherinske obitelji. Vanstanične domene nalikuju onima u kadherina, ali im se citoplazmatske domene razlikuju. Specijalizirane su za stvaranje dezmosomalnih plakova i vezane su za intermedijarni filament keratin, umjesto za aktin.



Slika 5: Građa kadherina.

Osim uloge u embrionalnom razvoju i diferencijaciji tkiva te u održavanju epitelnih struktura u odraslom organizmu, ispoljenost kadherinske molekule značajna je i za ponašanje zloćudnih tumora. Gubitak ove molekule primijećen je na površini stanica brojnih različitih tumora. Invazivne tumorske stanice gube svoju invazivnost nakon transfekcije E-kadherinskog gena (5,69,216), dok inaktivacija gena obnavlja invazivni fenotip. Uz pomoć E-kadherinskih protutijela može se izazvati invazija tumorskih stanica, što također potvrđuje značaj ove molekule u sprečavanju lokalne invazivnosti tumora i stvaranja udaljenih metastaza (5,24).

#### 2.4.4. Selektini

Selektini predstavljaju obitelj adhezijskih molekula koje posreduju početno prianjanje cirkulirajućih leukocita za endotel na početku upale. Za razliku od većine drugih adhezijskih molekula, selektini se vežu za ugljikohidratne ligande, koji su fukozilirani i sialilirani kao npr. sialilirani Lewis<sub>x</sub> antigen (34). Veze selektina s ugljikohidratima su labilne i omogućavaju obrtanje leukocita duž endotela u smjeru krvne struje ("rolling").

Tri su člana selektinske porodice: L (leukocitni), P (od engl. platelet, trombocitni) i E (endotelni)- selektin. Svaki član sadrži lektinsku domenu na N-kraju molekule, koja prepoznaje ugljikohidrat, domenu nalik na epidermalni čimbenik rasta, različiti broj domena koje se ponavljaju, a nalik su komplement-regulatornim proteinima (CRP), transmembransku domenu te kratki citoplazmatski rep (174).

E-selektin (CD62E, ELAM-1) ispoljen je na endotelnim stanicama nakon aktivacije citokinima (25), a posreduje adheziju neutrofila, monocita te nekih subpopulacija limfocita T za endotel. Ligand za E-selektin je sialil-fukozil-laktozamin-oligosaharid na površini neutrofila te monocita (164). Iako je E-selektin značajan prvenstveno za zbivanja na početku akutne upale, izgleda da ima ulogu i u kroničnoj upali. Postoji subpopulacija limfocita T (memory cells, stanice sa pamćenjem) koje ispoljavaju antigen porijeklom iz kože, a vežu se za E-selektin. Vjerojatno E-selektin na endotelu dermisa regulira infiltraciju limfocita T tijekom kronične upale i tako posreduje stvaranje kroničnih upalnih promjena, npr. kontaktnog dermatitisa (192).

L-selektin (CD26L, LECAM-1) je glikoprotein konstitutivno ispoljen na leukocitima, a posreduje vezivanje leukocita za aktivirani endotel tijekom upale te vezivanje limfocita za venule nabreklog endotela (HEV od engl. high endothelial venule) u limfnim čvorovima (131). Rasprostranjena ispoljenost L-selektina određuje njegovu ulogu u prometu svih leukocitnih linija. Ligandi za L-selektin su GlyCAM-1, CD34 i MadCAM-1, molekule nalik na mucin.

P-selektin (CD62P, PADGEM) je glikoprotein konstitutivno ispoljen u Weibel-Paladeovim tjelešcima endotelnih stanica te u  $\alpha$  granulama trombocita (129). U odgovoru na različite upalne čimbenike kao što su trombin, slobodni radikali i citokini, brzo se mobilizira na površinu endotelnih stanica i trombocita. Ligand za P-selektin je PSGL-1 (P-selektin-glikoprotein-ligand-1), a nalazi se na neutrofilima, monocitima i limfocitima. P-selektin posreduje adheziju neutrofila i monocita za aktivirane trombocite i endotelne stanice.

#### **2.4.6. Proteoglikani stanične membrane**

Proteoglikani su, uz fibrilarne proteine kao što su kolagen, elastin, laminin i fibronektin, glavne komponente vanstaničnog matriksa (6). Nastaju kovalentnim vezivanjem polisaharidnih lanaca glukozaminoglikana (GAG; npr. heparan-sulfat, hondroitin-sulfat) za polipeptidne lance koji se nazivaju proteini srži.



Neki proteoglikani ne nalaze se u sastavu vanstaničnog matriksa već unutarstaničnih sekretornih vezikula, gdje pomažu u pakiranju i pohranjivanju sekretornih molekula.

Treća skupina proteoglikana nalazi se u sastavu stanične membrane, a protein srži je ili umetnut u lipidni dvosloj ili prijanja za lipidni dvosloj preko glukozilfosfatidilinozitola.

Najbolje proučeni proteoglikani stanične membrane su sindekani (6). To su transmembranske molekule čija vanstanična domena sadrži različit broj GAG lanaca, dok je intracelularna domena povezana sa staničnim citoskeletom. Sindekani se nalaze na površini mnogih staničnih tipova, uključujući fibroblaste i epitelne stanice, gdje, uz integrine, služe kao receptori za kolagen, fibronektin i druge proteine matriksa. Pored toga, sindekani mogu vezivati čimbenik rasta fibroblasta i izložiti ga receptoru za čimbenik rasta. Slično tome, betaglikan, također proteoglikan stanične membrane, može vezati transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  i izložiti ga njegovom receptoru.

Prema tome, proteoglikani stanične membrane djeluju kao ko-receptori koji surađuju sa glavnim receptorima stanične površine u vezivanju za proteine vanstaničnog matriksa i u poticanju odgovora stanice na neke čimbenike rasta.

#### **2.4.7. Molekula CD44**

Molekula CD44 predstavlja porodicu staničnih površinskih molekula mase od 85 do 260 kDa (134). Nalaze se na većini staničnih tipova uključujući hematopoetske, mijeloične, epitelne, mezotelne, endotelne stanice te limfocite (42,94,134,165). Ova je molekula uključena u brojna adhezivna i migratorna zbivanja, uključujući adheziju limfocita T te aktivaciju i lučenje citokina iz monocita. Isto tako, sudjeluje u regrutiranju leukocita na mjesto upale te kretanju kroz limfatična tkiva, limfocitnoj aktivaciji, hematopoezi i embriogenezi (11,197).

Poznato je barem 20 izoformi molekule CD44, a nastaju izmjeničnim isijecanjem 11 egzona gena CD44. Uz to, različitost molekule CD44 nastaje i zbog različite N i O glikozilacije, dodavanja hondroitin-sulfata i fosforilacije citoplazmatske domene. Najčešće se nalazi standardni oblik molekule CD44 (CD44H, CD44s, Hermes1 i 3) koji je kodiran s 10 egzona, a molekularna masa iznosi 85-90 kDa. Varijantne izoforme veće su molekularne mase, a nastaju kombiniranjem varijabilno ispoljenih egzona i njihovim umetanjem u peptidnu osnovu koju kodiraju standardni egzoni. Na taj način teoretski bi moglo nastati preko 100 različitih molekula CD44. Ipak, kao i kod integrina, postoji znatno manji broj kombinacija, do danas ih je otkriveno oko 30. Standardna forma molekule CD44 sadrži 4 domene: ekstracelularnu



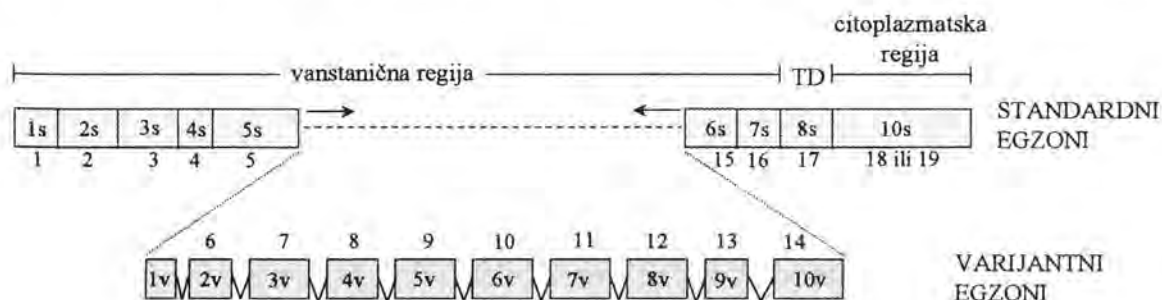
konstantnu domenu na N-kraju, ekstracelularnu varijabilnu domenu, transmembransku domenu te citoplazmatsku domenu.

Molekula CD44 pokazuje i visok stupanj konzerviranja sekvence između pojedinih vrsta. Npr. između humanog te štakorskog i mišjeg proteina postoji sličnost u sekvenci koja je veća od 80%. CD44H pokazuje široku tkivnu rasprostranjenost, dok su varijantne izoforme više ograničene i pretežno se nalaze na tumorskim stanicama, na nekim epitelnim stanicama normalnih tkiva te na aktiviranim limfocitima. Normalna tkiva koja ispoljavaju varijantne CD44 izoforme su tonzila, štitnjača, dojka, prostata, jezik, cerviks, jednjak i koža (68).

Osim kao stanična površinska molekula, CD44 se javlja i u topivoj formi (70-80 kDa). Povišena razina topive molekule CD44 utvrđena je u sinovijalnoj membrani bolesnika s reumatoidnim artritisom te u serumu bolesnika od raka (88).

#### 2.4.7.1. Građa gena CD44

Gen CD44 smješten je na kratkom kraku 11. kromosoma. Obuhvaća 50-60 kb DNA, a unutar te regije nalazi se 20 egzona. Egzoni 1-5 te 15-19 čine standardnu ili hematopoetsku formu molekule CD44. Prvih 16 egzona kodira ekstracelularnu domenu, 17. egzon kodira transmembranski segment, a 18. i 19. egzon kodiraju citoplazmatsku domenu. Prisustvo egzona 18 isključuje ispoljenost egzona 19 i tako skraćuje dužinu citoplazmatskog repa na 3 aminokiseline umjesto 72 aminokiseline (varijanta "kratkog repa"). Varijante CD44 veće molekularne mase nastaju umetanjem egzona 6-14 u standardnu molekulu. Tako nastaje veliki broj izoformi koji omogućuje da jedna osnovna molekula vrši brojne specifične aktivnosti.



Slika 6. Građa CD44 gena. TD - transmembranska domena.

U čovjeka v1 egzon se ne ispoljava zbog stop kodona. Predložena je i nomenklatura za varijantne egzone, pri čemu se oni egzoni koji stvaraju varijantne izoforme što počinju s

egzonom 6 označavaju kao v1, v2 itd. do v10. Varijantni egzoni kodiraju pretežno hidrofilne dijelove molekule koji se nalaze vanstanično, neposredno uz staničnu membranu. Funkcija tih izoformi nije jasna, premda je utvrđena povezanost određene izoforme za određena tkiva (94,134). Isto tako, nije jasan utjecaj ispoljenosti varijantnih egzona na vezivanje molekule CD44 za hijaluronan. Dvije su regije unutar molekule CD44 koje vezuju hijaluronan. Obje sadrže konzervirane sekvence i obje se nalaze distalno od mjesta umetanja varijantnih egzona. Delecijom te domene ne mijenja se sposobnost standardne forme da veže hijaluronan.

Gotovo svo izmjenično isijecanje zbiva se u ekstracelularnoj domeni između egzona 6 i 14, pri čemu određene stanične linije sadrže čak 47 različitih varijanti mRNA za molekule CD44.

#### **2.4.7.2. Ligandi molekule CD44**

Molekula CD44 posjeduje mnoge ligande. Najznačajniji među njima je hijaluronan, disaharid u vanstaničnom prostoru, a ostali su osteopontin, fibronectin, kolagen tipa I i IV te sulfatirani proteoglikani (42,134,197).

Hijaluronska kiselina je značajna komponenta vanstaničnog matriksa i omotača oko stanice, a povezana je s mnogim staničnim zbivanjima kao što su stanična adhezija, agregacija, proliferacija, upala, lokomocija i migracija. Po kemijskom sastavu je polisaharid velike molekularne mase (4-800 kDa), građen od molekula disaharida koje se ponavljaju (glukuronska kiselina i glukozamin)(132). Član je glukosaminoglikanske obitelji koja obuhvaća i hondroitin-sulfat, keratin-sulfat, heparin i heparan-sulfat. Sinteza hijaluronske kiseline zbiva se svugdje u tijelu, a razgradnja cirkulirajuće kiseline odvija se u stanicama jetrenih sinusoida te u limfnim čvorovima. U stanice ulazi procesom endocitoze, pri čemu koristi molekulu CD44 kao receptor (119,132). Hijaluronska kiselina nalazi se u vanstaničnom matriksu svih tkiva, a naročito prevladava u rahlom vezivu te u CNS-u. Prisutna je i u specijaliziranom vanstaničnom matriksu hrskavice gdje stvara velike komplekse sa proteoglikanom agrekanom.

Hijaluronska kiselina ima značajnu ulogu u mnogim normalnim, a također i patološkim staničnim zbivanjima. Uključena je u proliferaciju stanica za vrijeme embriogeneze, a povećana sinteza ove kiseline neophodna je za proliferaciju fibroblasta. Pretpostavlja se da hijaluronska kiselina uzrokuje odvajanje stanice od njenog potpornog matriksa tako da se stanica može lakše dijeliti (132). Visoke koncentracije hijaluronana odložene u vanstaničnom matriksu dovode do hidriranja tkivnih prostora i ekspaniranja zbog povećanog osmotskog tlaka (120)

Pretpostavlja se da takav ekspanđiran mikrookoliš bogat vodom deformira, inače kompaktnu, arhitekturu vanstaničnog prostora i olakšava kretanje stanica. Odlaganje velikih količina hijaluronana prati određena morfogogenetska zbivanja tijekom embrionalnog razvoja, npr. pojavu migracije i proliferacije stanica i prolaznog je karaktera (119). Smanjivanje razine hijaluronana unutar matriksa, naprotiv, označava prestanak staničnog gibanja i početak diferencijacije stanica. Bogatstvo vanstaničnog matriksa u hijaluronanu primijećeno je i u odraslim tkivima, a uvijek je praćeno migracijom i proliferacijom razmjerno nediferenciranih stanica (120). Također, brojni tumori epitelnog i mezenhimalnog porijekla sadrže obilje hijaluronana u usporedbi s tkivima iz kojih su nastali (119,120,218,223). Tumorske stanice mogu same sintetizirati hijaluronan, posebice fibrosarkomi, a pretpostavlja da sintezi doprinose i fibroblasti te glatke mišićne stanice u stromi tumora, potaknuti invazivnim tumorskim stanicama, odnosno njihovim produktima. Osim toga, upalni medijatori kao što su IL-1 i TNF $\alpha$  mogu stimulirati fibroblaste na sintezu hijaluronana. Na taj način imunološki odgovor domaćina može doprinijeti sintezi hijaluronana. Osim zbog pojačane sinteze, povećana količina hijaluronana može nastati i zbog povećane celularnosti tumora, pri čemu stanice luče samo osnovnu, bazalnu količinu ove molekule te zbog blokiranja limfne drenaže, koja je normalni put odstranjivanja hijaluronana iz tkiva.

Pored hidrodinamskog učinka na vanstanični matriks, hijaluronan ima i direktnu ulogu u staničnoj migraciji, posredovanu receptorima za hijaluronan, kao što je molekula CD44 molekula i njene izoforme.

Mnogi procesi adhezije među stanicama te između stanica i vanstaničnog matriksa su posredovani s molekulom CD44 i hijaluronskom kiselinom, npr. adhezija limfocita B za stromalne stanice koštane srži za vrijeme hematopoeze, interakcije leukocita periferne krvi sa bijelom tvari CNS-a. te agregacija makrofaga (134).

## 2.5. INVAZIJA I METASTAZIRANJE TUMORA

Invazija i metastaziranje glavne su značajke zloćudnih tumora, a ujedno i glavni uzrok pobola i umiranja od raka. Terapijske mogućnosti kao što su kirurški zahvat, kemoterapija i radioterapija mogu izliječiti približno 50% bolesnika s rakom. Preostali bolesnici većinom umiru zbog učinka metastaza ili komplikacija koje ih prate. U velikog broja bolesnika metastaze postoje već u vrijeme postavljanja dijagnoze. Rasijanost metastaza i njihova stanična raznolikost onemogućuje kirurško odstranjenje i ograničava djelovanje sistemskih lijekova. Raznolikost se očituje u širokom rasponu genetskih, biokemijskih, imunoloških i bioloških karakteristika kao što su stanični površni receptori, enzimi, kariotipovi, stanična morfologija, osobine rasta, osjetljivost na različite lijekove i sposobnost invazije i metastaziranja.

Glavni zadatak u istraživanjima na polju raka je razviti metode za predviđanje metastatske sposobnosti pojedinog tumora, spriječiti lokalnu invaziju te otkriti i liječiti klinički pritajene mikrometastaze. Do danas je učinjen znatan napredak u razumijevanju prirode invazije i metastaziranja tumora.

Primarni tumor sastoji se od različitih klonova koji imaju različite karakteristike, pa tako i različitu sposobnost metastaziranja. Metastaziranje nije posljedica slučajnog preživljavanja i rasta određenih tumorskih stanica, već je odraz selektivnog rasta jedinstvene populacije stanica s određenim karakteristikama. Drugim riječima, sve stanice primarnog tumora nemaju sposobnost stvaranja sekundarnih tumora već samo stanice s osobinama koje će im omogućiti da prežive put od primarnog tumora do mjesta buduće metastaze (48,61).

Proces metastaziranja sastoji se od brojnih, međusobno povezanih stepenica. Ishod procesa ovisi o osobinama tumorskih stanica i odgovoru domaćina.

Nakon početne, zloćudne prijetvorbe, dolazi do progresivnog, nekontroliranog rasta stanica. Kada tumor dosegne promjer od 2 mm, krvna opskrba domaćina nije dovoljna, već mora doći do neovaskularizacije posredovane čimbenicima angiogeneze. Tijekom rasta dolazi do lokalne invazije, a kao posljedica novih mutacija u genetski nestabilnim stanicama zloćudnog tumora ili različite genske ekspresije u pojedinim stanicama, dolazi i do stvaranja metastaza.

Invazija tumora može se označiti kao aktivno gibanje tumorskih stanica izvan tkiva u kojem su nastale i u susjedna tkiva različitog tipa. Tumorske stanice prilikom invazije, prema tome, završavaju u tkivu kojem ne pripadaju.



Organizam sisavaca sastoji se od brojnih tkivnih odjeljaka koji su međusobno odvojeni s dva tipa vanstaničnog matriksa, bazalnom membranom i intersticijskom stromom. Za vrijeme procesa invazije, prolazeći kroz tkivne granice, tumorske stanice moraju prijeći barijere matriksa. Tijekom prijelaza raka *in situ* u invazivni rak, tumorske stanice probijaju epitelnu bazalnu membranu i ulaze u intersticijsku stromu. Prolazom kroz stromu tumorske stanice dobiju pristup limfnim i krvnim žilama što omogućuje rasijavanje po organizmu. Da bi prošle kroz zid kapilare ili venule (za vrijeme ulaska ili izlaska iz krvne žile) tumorske stanice moraju probiti subendotelnu bazalnu membranu. U ciljnom organu, u koji su metastaze dospjele, moraju izaći iz krvne žile, putovati kroz perivaskularnu intersticijsku stromu, prije nego dođe do rasta tumorske kolonije u parenhimu organa. Prema tome, probijanje kroz vanstanični matriks javlja se u nekoliko stadija metastatske kaskade. Tumor može mijenjati vanstanični matriks na više načina. Najznačajniji su razgradnja komponenti matriksa, povećano stvaranje komponenti matriksa stanicama domaćina te sinteza matriksa pomoću tumorskih stanica. Razgradnja komponenti matriksa zbiva se tijekom invazije. Ona je vjerojatno ograničena na lokalizirana područja gdje se odvija aktivna invazija. Gubitak ili znatna dezorganizacija bazalne membrane česti je nalaz koji prati prijelaz dobroćudnog u zloćudni tumor (19). Stanice domaćina mogu pojačano lučiti komponente matriksa u odgovoru na prisustvo tumora. "Dezmoplazija" je izraz koji se koristi za pretjerano odlaganje veziva uz rak prostate, dojke, crijeva (20). Komponente vanstaničnog matriksa mogu lučiti i tumorske stanice. Obično su istovjetne komponentama koje proizvode stanice tkiva iz kojeg tumor potječe.

Jedan od tri opisana tipa promjene matriksa može prevladavati ili se sva tri mogu istovremeno odvijati u različitim regijama istog tumora.

Interakcije između stanica i matriksa u tumoru mogu se mijenjati, što može utjecati na proliferaciju i invaziju tumora. Stoga je važno poznavanje osnovne strukture i organizacije vanstaničnog matriksa.

### **2.5.1. Vanstanični matriks**

Vanstanični matriks složena je mreža kolagena i elastina, uklopljenih u osnovnu tvar koja se sastoji od proteoglikana i glikoproteina (6). Matriks postoji kao trodimenzionalna potpora koja odvaja tkivne odjeljke, omogućuje prianjanje stanica i određuje arhitekturu tkiva. Pri tome djeluje kao selektivni makromolekularni filter i utječe na staničnu diferencijaciju, mitogenezu i morfogenezu.



Svi tipovi vanstaničnog matriksa kao što su bazalna membrana, intersticijalna stroma, kost i hrskavica, razlikuju se među sobom u količini i tipu komponenti matriksa. Intersticijski matriks sadrži kolagene tipa I i III, elastin, fibronektin, vitronektin i specifične tipove proteoglikana i glikoproteina. Bazalna membrana drugi je tip vanstaničnog matriksa, koji odvaja parenhimske stanice od intersticijske strome. Sastoji se od kolagena tipa IV, laminina, entaktina i heparan-sulfat proteoglikana. Bazalne membrane različitih tkiva razlikuju se po odnosu tih komponenti kao i prisustvu ili odsustvu fibronektina. Epitelne i endotelne stanice sintetiziraju kolagen tipa IV i laminin bazalne membrane, a fibroblasti luče fibronektin i kolagen tipa I u intersticiju.

Za razliku od kolagena i elastina koji čine potporne fibrilarne proteine, fibronektin, vitronektin i laminin spadaju u skupinu adhezivnih proteina. Laminin se nalazi samo u sastavu bazalne membrane, dok se fibronektin i vitronektin nalaze i u topivoj formi u plazmi i tkivnim tekućinama (112). Proteini vanstaničnog matriksa velike su i složene molekule, od kojih svaka ima različite funkcije, a osnovna struktura im je zajednička. Sastoje se od niza domena otpornim na proteinaze, koje imaju sposobnost vezivanja za druge makromolekule, a povezane su regijama osjetljivim na proteinaze. Fibronektin posjeduje vezna mjesta za kolagen (tipovi I-V), fibrin, heparin/heparan sulfat, DNK i aktin. Laminin veže kolagen tipa IV i heparan-sulfat, a vjerojatno i druge proteoglikane, a vitronektin hondroitin-sulfat te heparan-sulfat (112). Pored toga, svi posjeduju vezna mjesta za receptore na površini stanica.

Tijekom prijelaza dobroćudnih u zloćudne tumore javljaju se brojne promjene u raspodjeli i količini epitelne bazalne membrane. Dobroćudne patološke promjene s epitelnom dezorganizacijom i proliferacijom uvijek su praćene kontinuiranom bazalnom membranom. Neki pretjerano naglašeni oblici tih bolesti mogu imitirati izgled invazivnog raka. Ipak, bez obzira koliko bila naglašena arhitekturna dezorganizacija, dobroćudne bolesti uvijek imaju očuvanu bazalnu membranu. Kod invazivnog raka, naprotiv, bazalna membrana uz invazivne tumorske stanice je manjkava ili potpuno nedostaje. U određenim područjima dobro diferenciranog raka često se može uočiti kako tumorske stanice stvaraju bazalnu membranu, ali je ona isprekidana ili udvostručena (44). Pomoću elektronskog mikroskopa utvrđeni su defekti u kontinuitetu lamine dense bazalne membrane kod raka *in situ*. Ti bi defekti mogli biti najraniji stadiji progresije u invazivni rak. Manjkava organizacija i gubitak bazalne membrane može nastati zbog razgradnje proteazama što ih luče stanice tumora ili domaćina (21,137,139).

Nakon odvajanja od primarnog tumora, tumorske stanice dolaze u kontakt s bazalnom membranom još mnogo puta tijekom metastatske kaskade. To se dešava za vrijeme ulaska ili

izlaska iz krvne žile i tijekom prolaska kroz tkivne granice, npr. prilikom invazije živaca, mišića, masnog tkiva, mezotela, ulaskom u plućne alveolarne prostore, tijekom invazije mozga ili nekog žljezdanog organa. Izuzetak je jetra, naime, uz hepatocite i endotelne stanice sinusoida nalazi se kolagen tipa IV, ali ne i formirana bazalna membrana. Tumorske stanice koje dospjevaju portalnim krvotokom stoga ne moraju proći bazalnu membranu prilikom invazije jetrenog parenhima. Isto tako, za razliku od krvnih, limfne kapilare nemaju formirane bazalne membrane. Bazalna membrana nalazi se samo uz velike limfne kanale te uz sinuse u limfnim čvorovima.

### **2.5.2. Trostepena hipoteza tumorske invazije**

Intersticijska stroma većine tkiva normalno ne sadrži formirane prolaze za stanice. Bazalna membrana je netopiva, kontinuirana, ali prilagodljiva opna koja je nepropusna za velike proteine. Ti oblici vanstaničnog matriksa postaju žarišno propusni samo za vrijeme cijeljenja i remodeliranja tkiva, u upali i tijekom rasta zloćudnih tumora. Prožimanje matriksa tumorskim stanicama ovisi o brojnim čimbenicima, kao što su osobine tumorskih stanica i stanica domaćina te osobine samog matriksa.

Liotta je predložio trostepenu hipotezu tumorske invazije koja opisuje slijed biokemijskih događanja za vrijeme invazije vanstaničnog matriksa (137,139). Prva stepenica je prianjanje tumorskih stanica za komponente matriksa, npr. laminin ili fibronektin, preko specifičnih receptora. Tumorske stanice zatim luče hidrolitičke enzime, ili potiču stanice domaćina na lučenje, što lokalno uzrokuje razgradnju matriksa. Razgradnja matriksa se vjerojatno odvija na vrlo ograničenom području uz samu površinu tumorskih stanica, gdje količina ovog enzima premašuje količinu inhibitora proteaza u serumu i matriksu. Treća stepenica je kretanje tumorskih stanica u području promijenjenog matriksa. Kontinuirana invazija matriksa odvija se ponavljanjem ove tri stepenice.

#### **2.5.2.1. Prianjanje tumora za matriks**

Prianjanje tumorskih stanica za makromolekule vanstaničnog matriksa ima ključnu ulogu u regulaciji stanične morfologije, rasta, diferencijaciji i morfogenetskim procesima tijekom razvoja, a također i u patogenezi raka. Ono je većinom posredovano integrinima koji prepoznaju RGD sekvencu na proteinima vanstaničnog matriksa.

Brojni eksperimentalni radovi upućuju na to da interakcije integrina s proteinima vanstaničnog matriksa imaju ulogu u nastanku metastaza. Normalne stanice odlažu fibronektin, laminin, kolagene i druge molekule u svoj mikrookoliš i prijanjaju za njih putem integrinskih receptora. Većina tumorskih stanica, barem u kulturi, ne deponira taj matriks ili to čini u znatno manjoj količini (169). Poznato je da je "klasični" fibronektinski receptor  $\alpha 5\beta 1$  neophodan za deponiranje matriksa, a njegova ispoljenost na tumorskim stanicama često je smanjena. Ukoliko se ispoljenost ovog integrina poveća transfekcijom gena, poveća se i odlaganje fibronektina, a stanice postaju manje pokretne, rastu sporije i ne mogu proizvesti tumore nakon subkutane injekcije u miša (75). Pretpostavlja se da zbog smanjenog odlaganja matriksa stanice postaju "slobodnije", jer njihova pokretljivost nije ograničena za vlastiti matriks. RGD peptidi mogu utjecati i na tumorski rast *in vivo*. Nekoliko laboratorija je objavilo pokuse u kojima je rasijavanje tumorskih stanica, ubrizganih intravenski u miša, spriječeno istovremenim ubrizgavanjem RGD peptida (5,176). Budući da su premostili rane faze u procesu metastaziranja, npr. odvajanje stanica od primarnog tumora, ovi pokusi istražuju samo dio tumorske kaskade. Chan i suradnici su izveli pokus s linijom humanog rhabdomiosarkoma koja normalno ne ispoljava  $\alpha 2\beta 1$  integrin te linijom kojoj je transficiran gen za  $\alpha 2$  podjedinicu. Nakon ubrizgavanja, stanice koje su ispoljavale  $\alpha 2$  podjedinicu proizvele su mnogo više metastatskih kolonija, u odnosu na stanice bez integrina (43).

Izgleda da u vrlo ranim stadijima tumorskog rasta, npr. prilikom odvajanja od glavne tumorske mase, smanjena adhezija za proteina matriksa može olakšati rast i kretanje stanica. Naprotiv, nakon što dosegnu cirkulaciju, pojačana ispoljenost integrina može olakšati usadnju i omogućiti metastaziranje (5).

#### **2.5.2.2. Proteolitička razgradnja**

Razgradnja vanstaničnog matriksa katalizirana je pomoću dva glavna enzimska sustava: metaloproteaza i serin-proteaza. Metaloproteaze, ovisne o vezivanju iona kalcija ili cinka, obuhvaćaju dva tipa intersticijskih kolagenaza, dva tipa IV kolagenaza te nekoliko tipova stromelizina. Značajan predstavnik serin-kinaza je aktivator plazminogena tipa urokinaze. On aktivira plazminogen i pretvara ga u plazmin koji cijepa različite proteine, uključujući fibrin, fibronektin i laminin. Katepsin D također spada u skupinu proteaza koje razgrađuju vanstanični matriks. Brojni radovi potvrđuju ulogu ovih enzima u procesu metastaziranja tumora (35,92).

### 2.5.2.3. Kretanje tumorskih stanica

Kretanje tumorskih stanica posredovano je promjenom u organizaciji citoskeleta. No, dugo se nije znalo ništa o molekularnim signalima koji izazivaju te promjene. Liotta i suradnici su prije desetak godina izolirali i opisali molekulu koja stimulira motilitet stanica i nazvali je autokrini čimbenik motiliteta (AMF, od engl. autocrine motility factor) (92). Ova je molekula izolirana iz linije humanog melanoma, ali je kasnije otkrivena i u kulturi štakorskog karcinoma dojke te u kulturi stanica humanog raka prijelaznog epitela, a pronađena je i u mokraći bolesnika s rakom mokraćnog mjehura. Njezino prisustvo je udruženo s većim invazivnim potencijalom.

Migracija tumorskih stanica može biti potaknuta i fragmentima proteina vanstaničnog matriksa koji imaju kemotaktičko djelovanje (92).

Predloženom modelu invazije i metastaziranja treba dodati i početnu stepenicu otpuštanja, odnosno odvajanja invazivnih tumorskih stanica od glavne tumorske mase. Značajnu ulogu u ovom procesu može imati gubitak kadherinskih molekula koje su glavni posrednici međustaničnog prianjanja (5,24,69,73,216).

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Tkivni uzorci

Analizirali smo uzorke raka dojke koji su pristigli na Zavod za patologiju kao intraoperativna biopsija tijekom 1995., 1996. i 1997. godine. Nakon postavljene dijagnoze raka na smrznutom rezu, učinili smo rezove debljine  $5\mu$  i pohranili ih na  $-20^{\circ}\text{C}$  do imunohistokemijskog bojenja. Pregledali smo i limfne čvorove iz aksile, a za ispitivanje smo koristili one u kojima je histološki nađena metastaza. Istovremeno smo uzeli i komadić primarnog tumora i metastaze za analizu protočnim citometrom. Od ostatka tkiva, koji je fiksiran i uklopljen u parafin, učinili smo trajne histološke preparate obojene hemalaun-eozinom. Preparate smo analizirali pod svjetlosnim mikroskopom i klasificirali prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije.

Bilježili smo i veličinu tumora, prisustvo metastaza u limfnim čvorovima, mitotski indeks, morfometrijski prognostički indeks te histološki gradus tumora.

##### 3.1.1. Indeks mitotske aktivnosti (IMA)

Mitoze smo izbrojili u perifernim dijelovima tumora u područjima najveće celularnosti. Rezultat smo izrazili kao ukupan broj mitozu u 10 susjednih vidnih polja velikog povećanja (objektiv x40, promjer vidnog polja  $450\mu\text{m}$ ).

##### 3.1.2. Morfometrijski prognostički indeks (MPI)

MPI je multivarijantni prognostički indeks koji se temelji na broju mitozu, veličini tumora te statusu limfnih čvorova (14). Računa se prema formuli:

$$\begin{aligned} \text{MPI} = & + 0,3341 \times \text{drugi korijen iz broja mitozu} \\ & + 1,2342 \times \text{veličina tumora u cm} \\ & - 0,7654 \times (\text{status limfnih čvorova; negativan}=2, \text{pozitivan}=1) \end{aligned}$$



### 3.1.3. Histološko stupnjevanje tumora (gradus)

Histološki stupanj tumora odredili smo prema metodi Elstona i Ellisa (57), koja predstavlja modifikaciju Bloom-Richardsonove metode (28). Gradus se određuje analiziranjem tri morfološke osobine tumora, pri čemu se svaka boduje od 1 do 3 na slijedeći način:

Stvaranje tubularnih formacija	Bodovi
izraženo (>75%)	1
umjereno (10-25%)	2
slabo izraženo ili odsutno (<10%)	3
Nuklearni pleomorfizam	
male, pravilne i unimorfne stanice	1
srednje povećanje u veličini i raznolikosti	2
izražena raznolikost	3
Broj mitozâ/na 10 velikih vidnih polja	
0-11	1
12-22	2
>23	3

Gradus tumora određuje se zbrajanjem bodova sva tri morfološka obilježja na slijedeći način: gradus 1 (dobro diferencirani), 3-5 bodova; gradus 2 (umjereno diferencirani), 6-7 bodova; gradus 3 (slabo diferencirani), 8-9 bodova.

### 3.2. Imunohistokemijsko ispitivanje

Za imunohistokemijsko bojenje koristili smo metodu indirektno peroksidaze. Rezove smo sušili na sobnoj temperaturi 30 minuta, zatim fiksirali u acetonu 7 minuta, ponovno kratkotrajno osušili, a zatim tijekom 30 minuta inkubirali u 4% konjskom serumu radi blokiranja nespecifičnog vezivanja protutijela. Po inkubaciji serum smo otrešli sa stakalca, a rezove inkubirali s primarnim protutijelima tijekom 60 minuta. Nakon ove, a također i svake slijedeće stepenice rezove smo ispirali u TRIS-puferu (pH 7,2), 3 puta po 10 minuta. Nakon ispiranja nakapali smo biotinizirana sekundarna protutijela u kojima su rezovi inkubirani tijekom 30 minuta. Slijedeća stepenica je inkubacija s avidin-peroksidazom (Vector, Burlingame, CA) također tijekom 30 minuta. Kompleks antigena, protutijela i enzima

vizualizirali smo inkubacijom u supstratu tijekom 5 minuta. Koristili smo AEC otopinu (3-amino-9-ethylcarbazole, Dako), koja daje crvenosmeđi talog. Nakon toga rezove smo 5 minuta ispirali pod tekućom vodom, kontrastirali u hematoksilinu tijekom 3 minute te ponovo ispirali 5 minuta pod tekućom vodom. Rezove smo prekrili pokrovnim stakalcima pomoću glicerini-želatine te analizirali pod svjetlosnim mikroskopom.

### **3.3. Protutijela**

Sva su primarna protutijela monoklonska, mišjeg porijekla. Koristili smo protutijelo koje prepoznaje  $\beta 1$  lanac integrina (supernatant hibridoma P5C12, dobiven ljubaznošću dr E. Dejana sa Instituta za farmakološka istraživanja Mario Negri, Milano, Italija) te protutijela koja prepoznaju ICAM-1 (Dako) i molekulu CD44 (Boehringer). Supernatant hibridoma P5C12 nismo razrjeđivali, a ostala protutijela smo razrijedili u omjeru 1:40.

Biotinizirana protu-mišja sekundarna protutijela (Dako) koristili smo u omjeru 1:300.

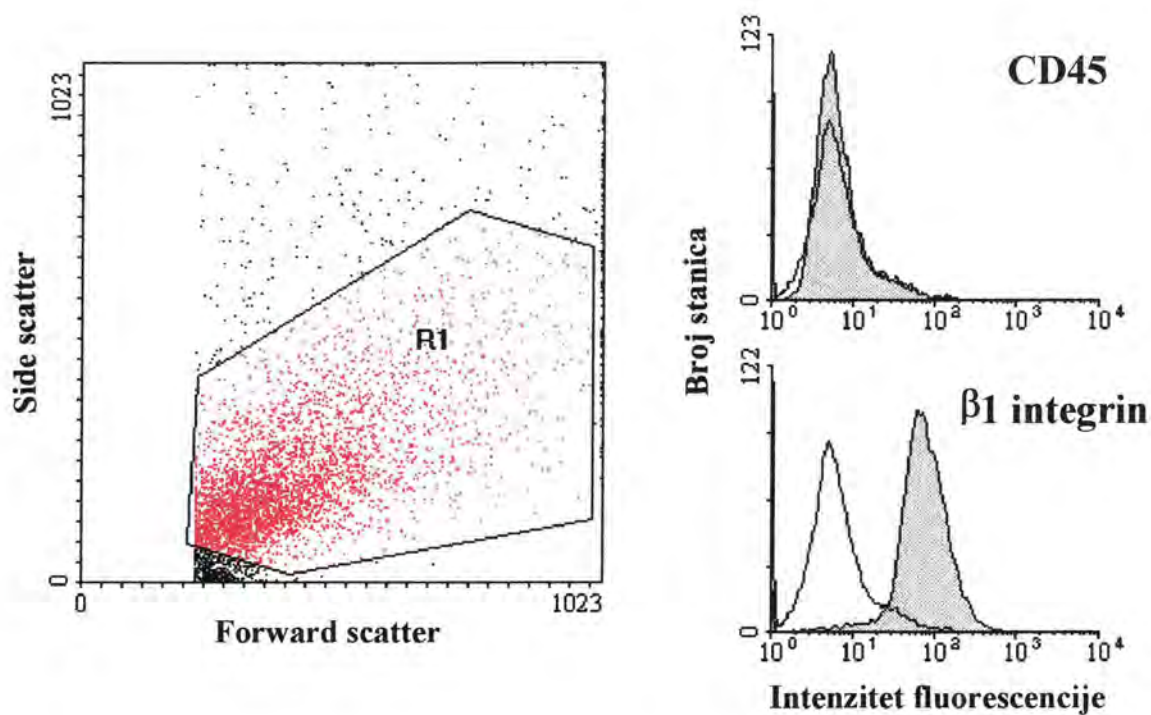
Za protočnu citometriju korištena su ista primarna protutijela uz dodatak  $\alpha$ LFA-3 (Immunotech S.A.) te  $\alpha$ CD45 protutijela (LCA, Dako), koje prepoznaje zajednički leukocitni antigen ispoljen na svim leukocitima, a koristili smo ga za isključivanje limfocitne populacije iz populacije obilježenih stanica. Protutijela smo razrjeđivali u omjeru 1:100, osim supernatanta hibridoma P5C12 koji je razrijeđen u omjeru 1:1.

Sekundarna protumišja protutijela obilježena fluoresceinom (Boehringer) razrijedili smo u omjeru 1:100.

### **3.4. Protočna citometrija**

Komadiće tumora usitnili smo škarama na čeličnoj mrežici te gnječili tučkom uz dodavanja pufera. Dobivenu staničnu suspenziju centrifugirali smo 10 minuta na 1500 okretaja. Nakon toga supernatant smo odlili, stanice resuspendirali u puferu te propustili kroz plastičnu mrežicu radi uklanjanja većih agregata stanica. Prenijeli smo po 100  $\mu$ l stanične suspenzije u epruvete (Falcon) i dodali primarna protutijela. Stanice smo inkubirali u primarnim protutijelima tijekom 60 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga smo ih 2 puta isprali uz dodavanja pufera i centrifugiranje po 3 minute na 1500 okretaja. Nakon ispiranja na talog smo dodali sekundarna protutijela obilježena sa fluoresceinom, stanice smo resuspendirali i inkubirali tijekom 30

minuta na +4°C. Po završetku inkubacije stanice smo 2 puta isprali, na talog dodali 500µl pufera te potom analizirali pomoću protočnog citometra.



**Slika 7. Analiza tumorskih stanica protočnom citometrijom.** Temeljem fizičkih osobina koje se prikazuju na protočnom citometru kao forward i side scatter (slika lijevo) limfocite i ostale manje stanice smo isključili i ispitivali samo stanice koje se nalaze unutar okvira (R1). Tumorske stanice se ne prikazuju s monoklonskim protutijelom na molekulu CD45, čime smo isključili zagađenje leukocitima (slika desno).

### 3.5. Puferi

Za razrjeđivanje protutijela i ispiranje preparata tijekom imunohistokemijskog bojenja koristili smo TRIS-HCl pufer (0,05M, pH 7,2).

Za protočnu citometriju koristili smo pufer kojeg smo pripremili prema slijedećoj uputi: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,7 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O; 10 mM EDTA; 20 mM HEPES pH 7,2; 2% FCS; 0,1% NaN<sub>3</sub>.

### **3.6. Statistička obrada**

Statističku obradu izvršili smo pomoću kompjuterskog programa Statistica, koristili smo  $\chi^2$  test, Studentov t test te ANOVA test. Pri određivanju statističke značajnosti koristili smo razinu  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. EKSPRESIJA $\beta 1$ INTEGRINA

#### 4.1.1. Rezultati imunohistokemije

##### 4.1.1.1. Ekspresija $\beta 1$ integrina u normalnom tkivu dojke

U normalnom tkivu dojke epitelne stanice kanalića i acinusa boje se s  $\alpha\beta 1$  protutijelom. Najintenzivnije se boje mioepitelne stanice i bazolateralna površina stanica bazalnog sloja, dok se luminalne stanice boje znatno slabije (slika 8a). Snažno se boji i endotel kapilara, dok limfociti pokazuju varijabilnu ispoljenost ovog receptora. Bojenje je primijećeno i u području mišićnice većih krvnih žila te unutar živaca (slika 9b).

##### 4.1.1.2. Ekspresija $\beta 1$ integrina na stanicama duktalnih NOS karcinoma

Ispitali smo 135 duktalnih NOS karcinoma. Rezultate imunohistokemijskog ispitivanja izrazili smo semikvantitativno. Tumore koji su najvećim dijelom ili potpuno negativni označili smo s 1 (slika 8b); tumore u kojih je samo dio tumorskih stanica pozitivan ili je većina stanica pozitivna, ali je bojenje slabog intenziteta, označili smo s 2 (slika 8c i d); a tumore u kojih većina ili sve tumorske stanice pokazuju snažno membransko bojenje označili smo s 3 (slika 8e i f).

Ispoljenost  $\beta 1$  integrina usporedili smo s prognostičkim parametrima kao što su veličina tumora, prisustvo metastaze u limfnim čvorovima, broj mitozu, morfometrijski prognostički indeks te gradus. Rezultati su prikazani u tablici 1.

Uočljiva je raznolikost tumora s obzirom na ispoljenost  $\beta 1$  molekule. Tumori sadrže različitu količinu pozitivnih stanica, a razlikuju se i po intenzitetu bojenja pozitivnih stanica. U 35 tumora (25,9%) ispoljenost  $\beta 1$  receptora vrlo je snažna, najčešće u obliku kontinuiranog membranskog bojenja. U 56 tumora (41,5%) izmjenjuju se područja u kojima su tumorske stanice pozitivne s područjima bez bojenja. Ove smo tumore označili s 2, a jednako tako označavali smo česti uzorak bojenja kod kojeg se boji samo periferija tumorskih otočića, dok su stanice u središtu negativne ili vrlo slabo pozitivne (slika 1c). U većih tumorskih otočića koji su pozitivni, gotovo uvijek se intenzivnije boji periferija otočića, dakle membrane onih stanica koje su u neposrednom dodiru sa stromom, dok su pojedinačne stanice, kao i one koje se redaju u uske tračke stvarajući tzv. "indijanske nizove" često negativne. Bojenje je uočljivo i u



stromi tumora što vjerojatno predstavlja  $\beta 1$  receptor na fibroblastima pa ga je ponekad teško razlikovati od bojenja periferije tumorskih otočića.

U 44 tumora (32,6%) ne nalazi se pozitivnih stanica ili su one zastupljene u malom broju. Kao pozitivna kontrola u tumora koji su u cijelosti negativni koristilo je bojenje endotelnih stanica kapilara i krvnih žila.

Stanice karcinoma *in situ* različito ispoljavaju  $\beta 1$  molekulu. Ponekad su pozitivne sve tumorske stanice unutar kanalića, često u vidu citoplazmatskog bojenja, a ponekad je bojenje ograničeno na mioepitelni sloj, a tumorske su stanice negativne (slika 9a).

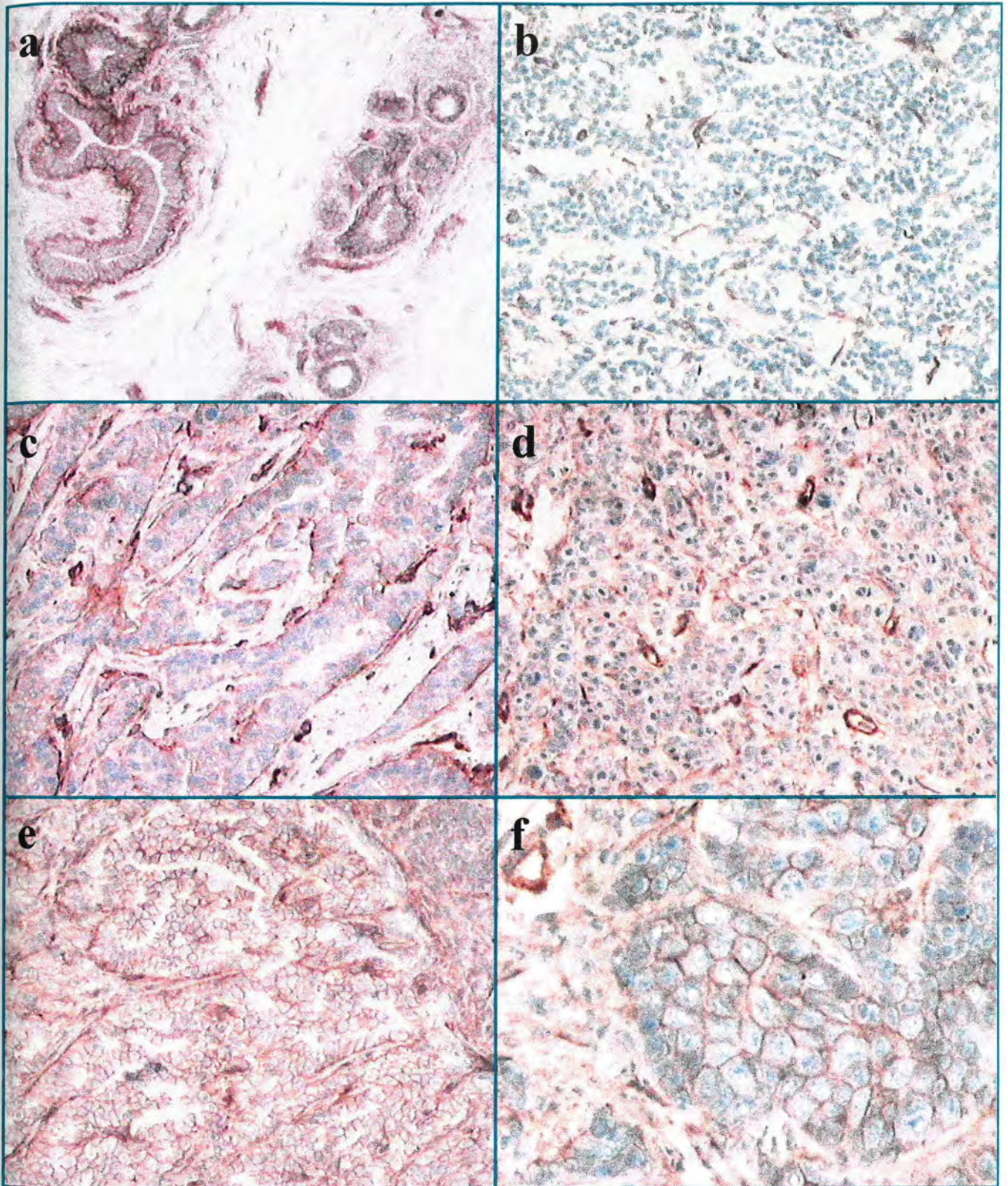
Tablica 1. Ekspresija  $\beta 1$  integrina na stanicama dukalnog NOS raka

	Razina ekspresije $\beta 1$ integrina			Ukupno	p vrijednost
	1	2	3		
Veličina tumora					
<2	17	26	18	61	
>2	27	30	17	74	0,50976
Limfni čvorovi					
negativni	18	33	19	70	
pozitivni	26	23	16	65	0,19046
IMA					
<10	26	36	22	84	
>10	18	20	13	51	0,86460
MPI					
<0,6	23	43	23	89	
>0,6	21	13	12	46	<b>0,03704</b>
Gradus					
1	5	11	7	23	
2	18	21	16	55	
3	4	3	2	9	0,76063

Posebno smo ispitivali duktalne NOS karcinome s namjerom da isključimo moguće razlike u ekspresiji koje mogu postojati u različitim histološkim tipovima. Histološki gradus odredili smo samo u 87 tumora.

Značajnu povezanost razine ispoljenosti  $\beta 1$  integrina s prognostičkim pokazateljima utvrdili smo samo za morfometrijski prognostički indeks ( $p < 0,04$ ). Naime, održana ekspresija





**Slika 8.** Ekspresija  $\beta 1$  integrina u normalnom tkivu dojke (a) i na stanicama invazivnog duktalnog NOS raka (b-f); tumorske stanice su negativne (b); tumorske stanice pokazuju lagano membransko i citoplazmatsko bojenje uz bojenje periferije tumorskih otočića (c i d); sve tumorske stanice pokazuju snažno membransko bojenje (e i f).



$\beta 1$  integrina povezana je s niskim prognostičkim indeksom ( $<0,6$ ), dok je gubitak ispoljenosti ove molekule povezan s visokim prognostičkim indeksom ( $>0,6$ ).

#### **4.1.1.3. Ekspresija $\beta 1$ integrina na stanicama ostalih tipova raka dojke**

Od ostalih karcinoma dojke u studiju smo uključili 10 medularnih karcinoma, 5 lobularnih i 5 mucinoznih. Na stanicama medularnih i mucinoznih karcinoma u pravilu se prikazuju  $\beta 1$  integrini, uz različit intenzitet bojenja. U svih medularnih karcinoma prisutno je citoplazmatsko bojenje uz mjestimično membransko bojenje različitog intenziteta (slika 9c) dok stanice mucinoznih karcinoma pokazuju samo membransko bojenje, često vrlo jakog intenziteta (slika 9e). Lobularni karcinomi su heterogeni s obzirom na ekspresiju  $\beta 1$  molekule. Tumorske stanice su dijelom negativne, a dijelom se nalazi bojenje u citoplazmi u području citoplazmatskih nastavaka, tzv. pseudopodija (slika 9d).

#### **4.1.2. Rezultati protočne citometrije**

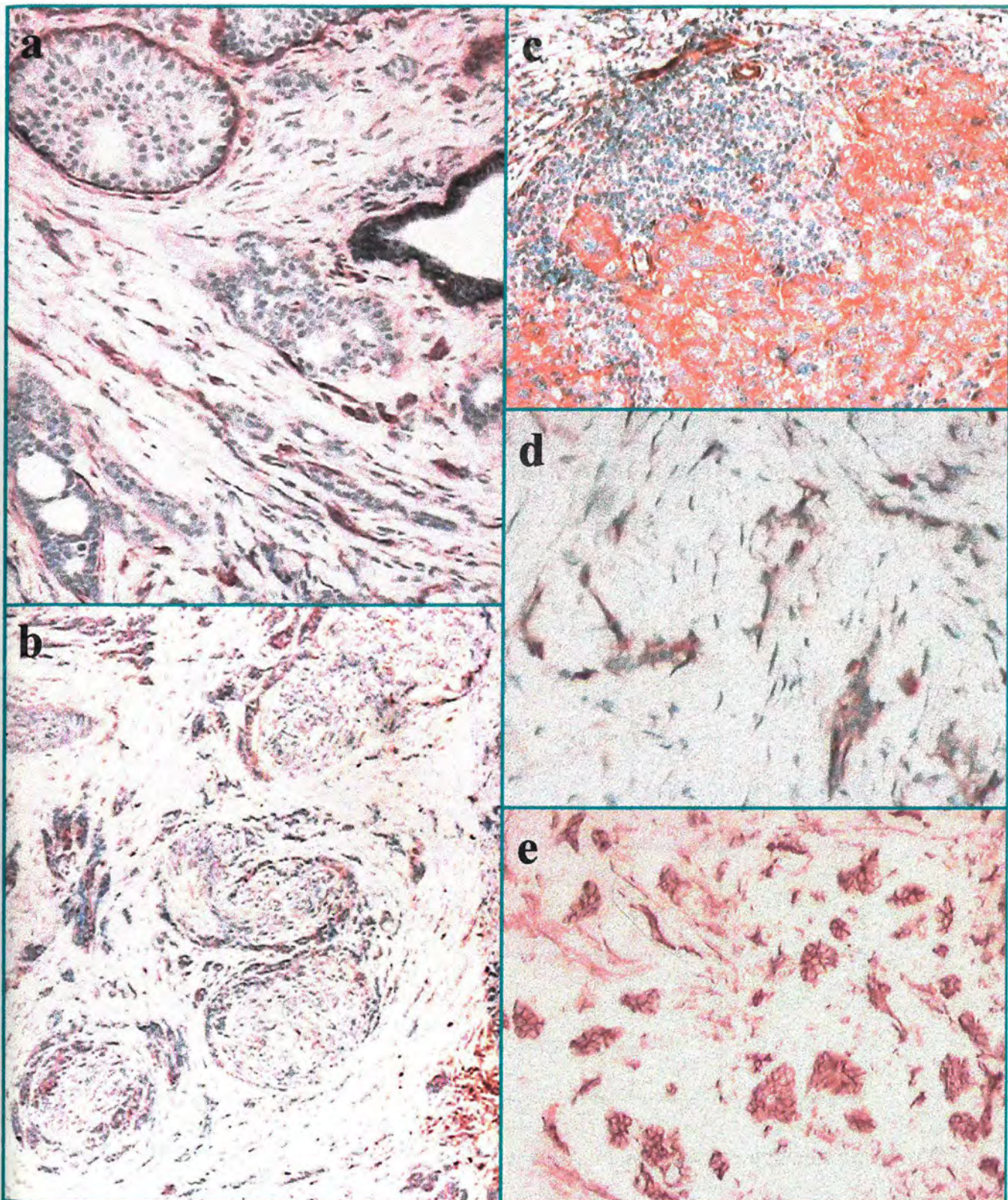
##### **4.1.2.1. Ekspresija $\beta 1$ integrina na stanicama primarnog tumora**

Protočnom citometrijom ispitali smo ukupno 45 tumora, od toga su 34 dukalnog (NOS) tipa, 4 medularna, 5 lobularnih te 2 mucinozna karcinoma. Rezultate smo izrazili kao postotak pozitivnih stanica, srednji intenzitet fluorescencije pozitivnih stanica (MFI od engl. mean fluorescence intensity) te srednji intenzitet fluorescencije ukupne populacije tumorskih stanica. Vrijednosti srednjeg intenziteta fluorescencije pozitivnih stanica i srednjeg intenziteta fluorescencije ukupne populacije dobili smo oduzimanjem srednjeg intenziteta fluorescencije kontrolnih stanica od intenziteta fluorescencije stanica obilježenih s protutijelima. Kao negativnu kontrolu koristili smo tumorske stanice kojima nismo dodali primarna, već samo sekundarna protutijela. Nespecifično vezivanje s primarnim protutijelima provjeravali smo na uzorku stanica koje smo obilježavali s protutijelom protiv molekule CD45, čime smo ujedno isključili zagađenost s leukocitima.

Kod većine tumora (37, 82%) više od 90 % stanica boji se s  $\alpha\beta 1$  protutijelom uz različiti intenzitet fluorescencije - od 5,8 do 98. Od preostalih 8 tumora 6 (13,3%) ih sadrži više od 50% pozitivnih stanica, dok u 2 tumora (4,4%) pozitivne stanice čine svega 13,9, odnosno 32,2% ukupne tumorske mase.

**Ispitivanje  $\chi^2$  testom.** Rezultati protočne citometrije većinom se podudaraju s onima dobivenim pomoću imunohistokemije. Tumori koje smo imunohistološkom analizom označili





**Slika 9.** Ekspresija  $\beta 1$  integrina na stanicama invazivnog raka dojke. Epitel kanalića i mioepitelne stanice oko intraduktalnog raka su pozitivne, a stanice invazivnog raka negativne (a); pozitivne stanice dobro diferenciranog raka koji pokazuje perineuralnu invaziju (b); citoplazmatsko bojenje tumorskih stanica medularnog raka (c); citoplazmatsko bojenje stanica lobularnog raka (d); snažno membransko bojenje stanica mucinoznog raka (e).



kao negativne, većinom imaju MFI manji od 40, a oni koje smo označili kao heterogene ili pozitivne, većinom imaju MFI veći od 40. Stoga smo intenzitet fluorescencije od 40 uzeli kao graničnu vrijednost, temeljem koje smo tumore podijelili u 2 skupine i usporedili s prognostičkim pokazateljima koristeći  $\chi^2$  test. Rezultate pokazuje tablica 2.

Statistički značajnu povezanost utvrdili smo samo sa statusom limfnih čvorova. Naime, tumori s niskom razinom ekspresije  $\beta 1$  integrina češće metastaziraju, a tumori s višom razinom ekspresije češće imaju negativne limfne čvorove.

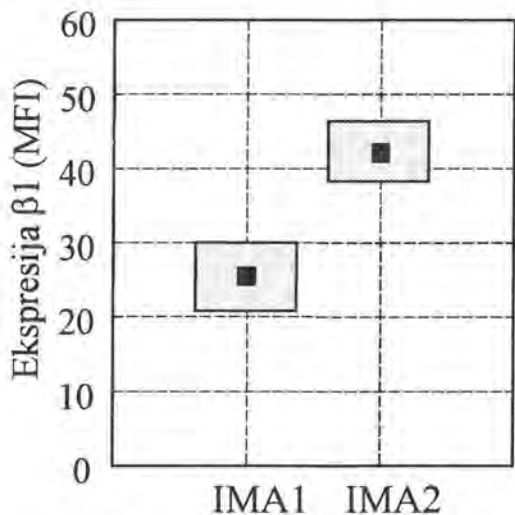
Tablica 2: Usporedba ekspresije  $\beta 1$  integrina s prognostičkim pokazateljima

	Razina ekspresije $\beta 1$ integrina		Ukupno	p vrijednost
	MFI <40	MFI >40		
<b>Veličina tumora</b>				
<2	19	5	24	0.81080
>2	16	5	21	
<b>Limfni čvorovi</b>				
negativni	16	8	24	<b>0.04795</b>
pozitivni	19	2	21	
<b>IMA</b>				
<10	15	4	19	0.87160
>10	20	6	26	
<b>MPI</b>				
<0,6	13	5	18	0.27148
>0,6	14	2	16	
<b>Gradus</b>				
1	6	2	8	0.73079
2	16	3	19	
3	5	2	7	

Ovi rezultati odnose se na sve histološke tipove. Ispitivanjem samo duktalnih NOS karcinoma nismo utvrdili značajnu povezanost smanjene razine  $\beta 1$  integrina i pozitivnih limfnih čvorova. Podaci za morfometrijski prognostički indeks i gradus odnose se samo na duktalne NOS karcinome.

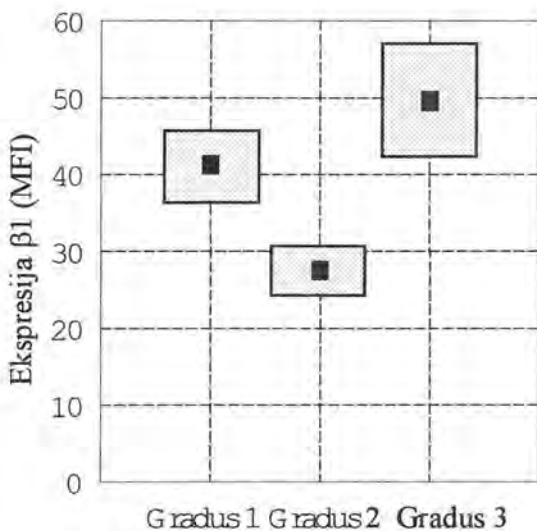
**Ispitivanje Studentovim t testom.** Rezultate protočne citometrije ispitivali smo i pomoću Studentovog t testa, pri čemu smo srednji intenzitet fluorescencije pozitivnih stanica uspoređivali s prognostičkim parametrima.



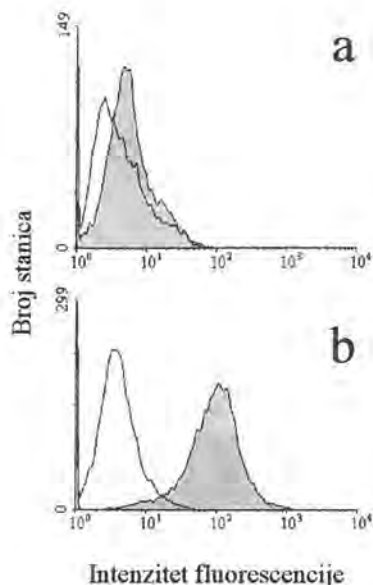


**Slika 10.** Ekspresija  $\beta 1$  integrina na stanicama tumora s niskom (IMA1) i visokom (IMA2) mitotskom aktivnošću. Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).

Rezultati pokazuju da je srednji intenzitet fluorescencije u tumorima s malo mitozu manji nego u tumorima s više od 10 mitozu na 10 vidnih polja velikog povećanja ( $p < 0,02$ ) (slika 10 i



**Slika 12.** Odnos ekspresije  $\beta 1$  integrina i diferenciranosti tumora (gradus). Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).



**Slika 11.** Ekspresija  $\beta 1$  integrina na stanicama tumora s niskom (a) i visokom (b) mitotskom aktivnošću (sivi histogram).

11). Ovi rezultati odnose se samo na duktalne NOS karcinome. Nakon uključivanja ostalih histoloških tipova, razlika među njima i dalje ostaje značajna ( $p < 0,05$ ).

Usporedili smo i srednji intenzitet fluorescencije duktalnih NOS karcinoma s malo mitozu i drugih tipova s malo mitozu. Rezultati pokazuju značajnu razliku u intenzitetu fluorescencije između ove dvije skupine tumora, pri čemu duktalni NOS karcinomi s malo mitozu imaju značajno nižu razinu ekspresije  $\beta 1$  integrina u odnosu na ostale tipove s malo mitozu (lobularne i mucinozne).

Razina ispoljenosti  $\beta 1$  integrina u tumorima s negativnim limfnim čvorovima ne razlikuje se bitno od razine u tumorima koji su metastazirali. Isto tako, nema razlike u ekspresiji  $\beta 1$  integrina u malih tumora, u odnosu na tumore veće od 2 cm.

Dobro diferencirani tumori (gradus I) pokazuju veću ispoljenost  $\beta 1$  integrina nego umjereno diferencirani (gradus II,  $p < 0,05$ ). Isto vrijedi i za slabo diferencirane (gradus III) u odnosu na umjereno diferencirane ( $p < 0,04$ ), dok među tumorima gradusa I i III nema razlike u razini ispoljenosti  $\beta 1$  integrina (slika 12). Kada smo tumore podijelili u dvije skupine prema mitotskoj aktivnosti i ispitali ispoljenost  $\beta 1$  kod različito diferenciranih tumora, utvrdili smo da se u skupini tumora s niskom mitotskom aktivnošću izdvajaju dobro diferencirani tumori čija je razina ekspresije  $\beta 1$  značajno viša u odnosu na umjereno i slabo diferencirane. Naprotiv, kod tumora s visokom mitotskom aktivnošću nema značajne razlike u ekspresiji  $\beta 1$  među tumorima različitog gradusa.

#### **4.1.2.2. Usporedba ekspresije $\beta 1$ integrina na stanicama primarnog tumora i stanicama u metastazi**

Razinu ekspresije  $\beta 1$  integrina na stanicama primarnog tumora i na stanicama metastaze ispitivali smo u 13 tumora koji su metastazirali u limfne čvorove. Uspoređivali smo srednji intenzitet fluorescencije pozitivnih stanica te srednji intenzitet fluorescencije cjelokupne populacije stanica u primarnih tumora u odnosu na metastazu. Među njima nema značajne razlike.

## **4.2. EKSPRESIJA MOLEKULE ICAM-1**

### **4.2.1. Rezultati imunohistokemije**

#### **4.2.1.1. Ekspresija molekule ICAM-1 u normalnom tkivu dojke**

Kanalići i acinusi tkiva dojke ne ispoljavaju molekule ICAM-1. Ona je ispoljena samo na endotelnim stanicama, stromalnim fibroblastima i limfocitima. Ponekad se bojenje nalazi uz luminalni pol stanica u acinusima dojke (slika 13a i b).

#### **4.2.1.2. Ekspresija molekule ICAM-1 na stanicama duktalnih NOS karcinoma**

Ekspresiju ICAM-1 molekule ispitivali smo na stanicama 67 duktalnih NOS karcinoma. Rezultate, koje smo izrazili semikvantitativno, pokazuje tablica 3. Tumore koji su u cijelosti

negativni ili sadrže samo sitna žarišta pozitivnih stanica označili smo s 1. Tumore koji sadrže veća područja pozitivnih stanica (10-30%), označili smo s 2, a tumore u kojih približno 50% stanica pokazuje membransko bojenje različitog intenziteta označili smo s 3.

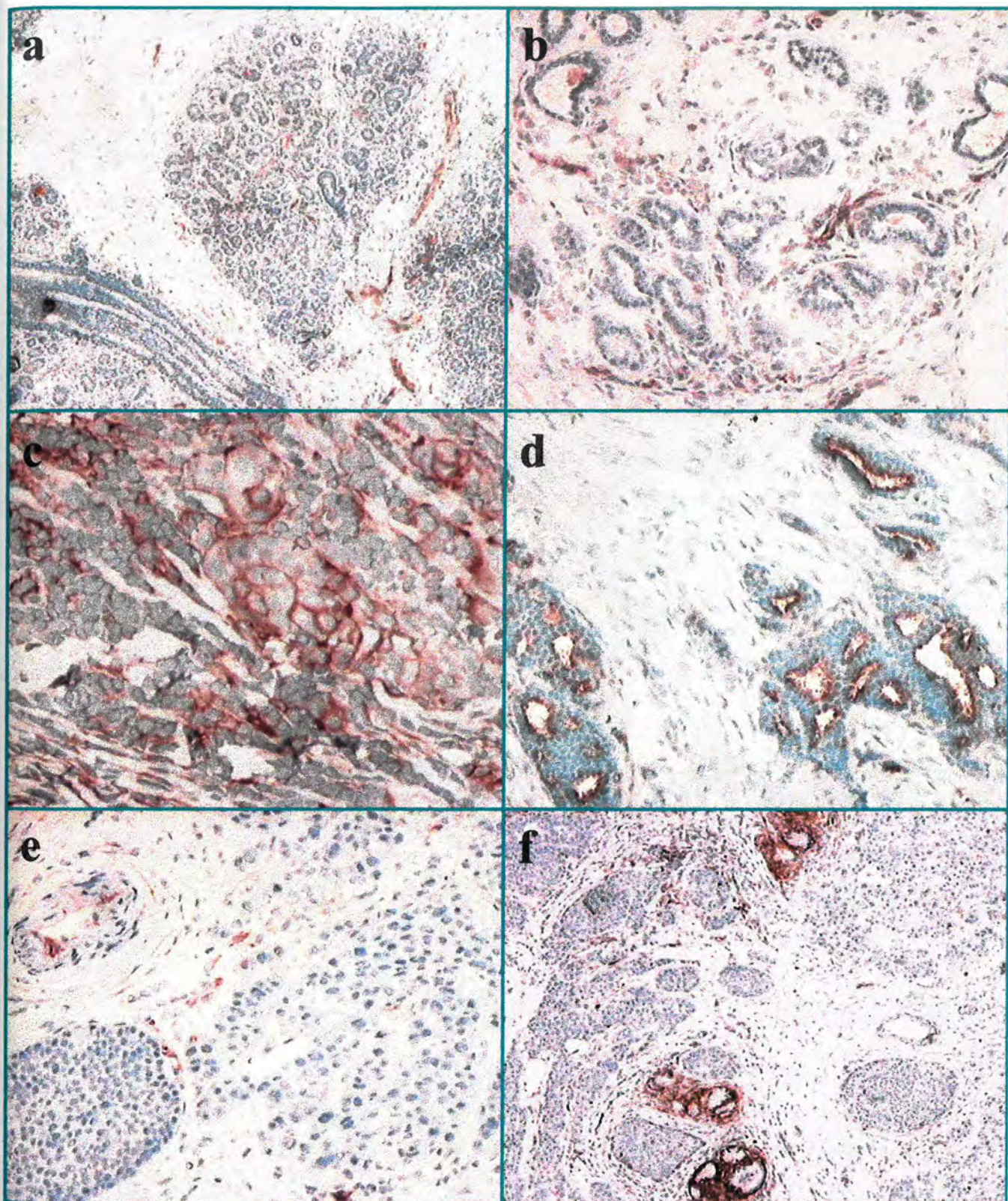
U 24 tumora (35,8%) stanice su negativne (slika 13e) ili se nalaze samo sitna žarišta pozitivnih stanica (slika 13f). Pozitivne stanice često se nalaze u bliskom kontaktu s limfocitima u stromi (slika 13c).

U 24 karcinoma (35,8%) molekula ICAM-1 nalazi se na površini nešto većeg broja tumorskih stanica, takav uzorak je označen sa 2 (slika 14a). Tumorske stanice koje pokazuju membransko bojenje često zauzimaju periferne dijelove otočića u kontaktu sa stromom. Budući da i fibroblasti u stromi mogu biti pozitivni, ponekad ih je teško razlučiti od periferije tumorskih otočića. U tumorima koji prave tubularne formacije, često se nalazi intenzivno bojenje u području luminalnog pola stanica (slika 13d).

Tablica 3. Ekspresija molekule ICAM-1 na stanicama duktalnog NOS raka

	Razina ekspresije ICAM-1			Ukupno	p vrijednost
	1	2	3		
<b>Veličina tumora</b>					
<2	15	10	6	31	0.11099
>2	9	14	13	36	
<b>Limfni čvorovi</b>					
negativni	14	13	7	34	0.34394
pozitivni	10	11	12	33	
<b>IMA</b>					
<10	14	8	8	30	0.21125
>10	10	16	11	37	
<b>MPI</b>					
<0,6	14	14	12	40	0.93627
>0,6	10	10	7	27	
<b>Gradus</b>					
1	8	3	3	14	0.23918
2	14	19	12	45	
3	2	2	4	8	
<b>Infiltracija limfocita</b>					
1	17	8	1	26	0,00008
2	6	13	10	29	
3	1	3	8	12	





**Slika 3.** Ekspresija ICAM-1 u normalnom tkivu dojke (a i b) i na stanicama invazivnog duktalnog NOS raka (c-f): pozitivne tumorske stanice u bliskom kontaktu s limfocitnim infiltratima (c); bojenje u području luminalnog pola tumorskih stanica (d); tumorske stanice su negativne (e); sitna žarišta pozitivnih stanica uz limfocitne infiltrate (f).



U 19 tumora (28,4%) primijećena je značajna ekspresija ICAM-1 molekule. Ovaj uzorak označili smo s 3 (slika 14b i c).

Ekspresiju molekule ICAM-1 na tumorskim stanicama usporedili smo s prognostičkim parametrima te s limfocitnim infiltratima u tumoru pomoću  $\chi^2$  testa. Veličinu limfocitnih infiltrata izrazili smo semikvantitativno. Tumore koji sadrže malo limfocita, uglavnom u obliku manjih žarišta na periferiji tumora ili kao razbacane rijetki infiltrate u stromi, označili smo s 1. Tumore s obilnijim infiltratima, pretežno na periferiji tumora, označili smo s 2, a tumore koji uz infiltrate na periferiji sadrže i obilne infiltrate u unutrašnjosti tumora, označili smo s 3.

Statističkom analizom nismo utvrdili povezanost molekule ICAM-1 s prognostičkim pokazateljima. Usporedbom limfocitne infiltracije s ispoljenošću molekule ICAM-1 utvrdili smo značajnu povezanost na razini od 0,01%, pri čemu tumori s više limfocita pokazuju veću ispoljenost molekule ICAM-1.

#### **4.2.1.3. Ekspresija molekule ICAM-1 na stanicama ostalih tipova raka dojke**

Ispitali smo 5 medularnih karcinoma, 5 lobularnih te 4 mucinozna karcinoma. Svi medularni karcinomi pokazivali su snažnu ispoljenost molekule ICAM-1 (slika 14d). Približno polovina stanica pokazuje membransko bojenje koje je različitog intenziteta. Lobularni karcinomi pokazuju različitu ekspresiju ICAM-1. U tri tumora uočili smo snažnu ispoljenost molekule ICAM-1, a od preostala dva jedan je potpuno negativan (slika 14e), a u drugom se boji mali broj stanica. Od 4 ispitivana mucinozna karcinoma, u tri tumora stanice su većinom pozitivne u području luminalnog pola (slika 14f), dok je jedan tumor u cijelosti negativan.

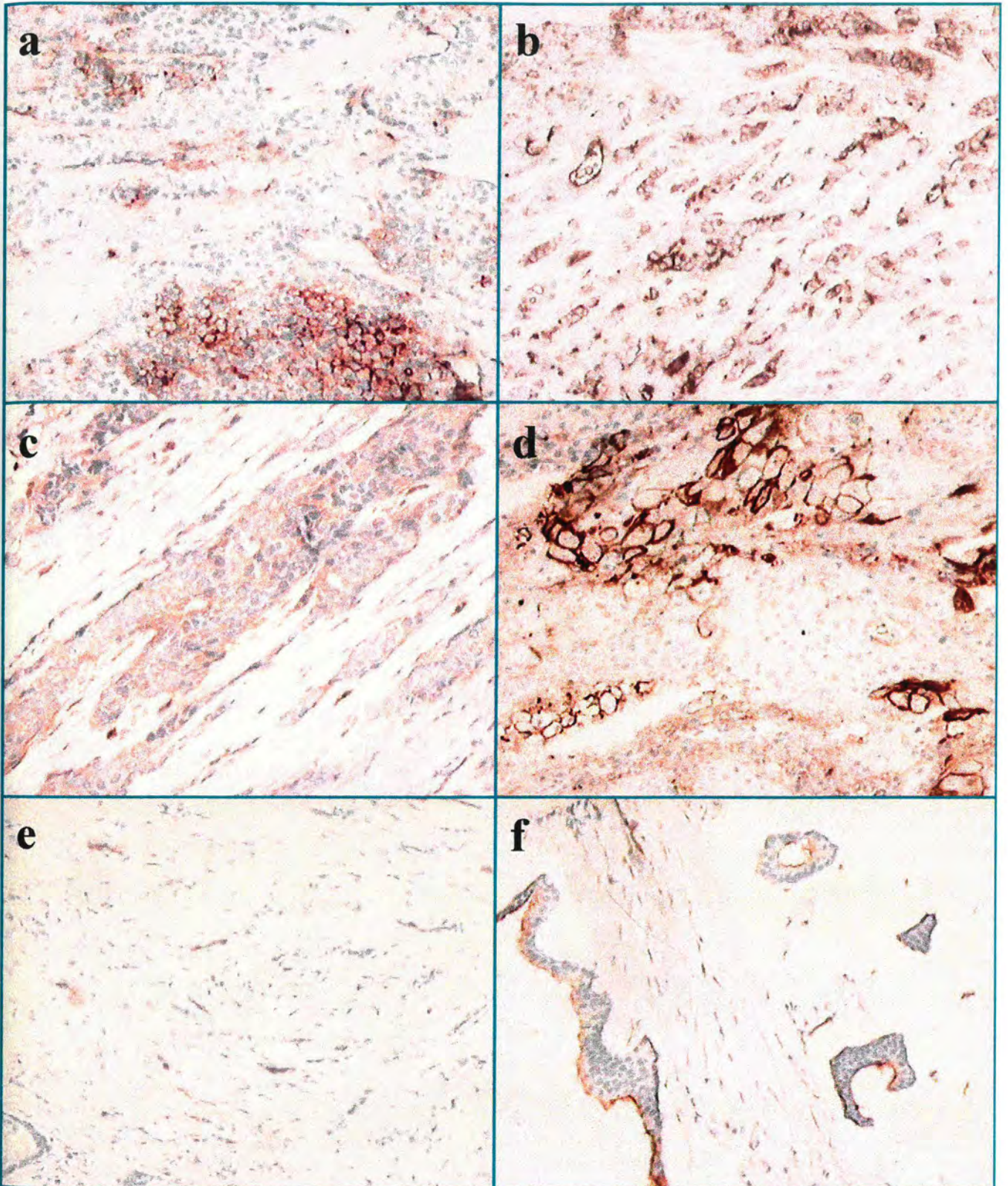
#### **4.2.2. Rezultati protočne citometrije**

##### **4.2.2.1. Ekspresija ICAM-1 na stanicama primarnog tumora**

Protočnom citometrijom ispitali smo 45 tumora od kojih su 34 duktalnog NOS tipa, 4 medularna, 5 lobularnih te 2 mucinozna karcinoma.

Za razliku od molekule  $\beta 1$  koja je većinom bila održana na više od 90% tumorskih stanica, molekula ICAM-1 pokazuje raznoliku zastupljenost. U 19 tumora (42,2%) gotovo sve (>90%) tumorske stanice ispoljavaju ICAM-1, mada je razina ispoljenosti različita (MFI je u rasponu od 2,53-26,41, a pretežno manji od 10). U 10 tumora (22,2%) ICAM-1 se nalazi na površini 50-90 % stanica (MFI od 5,53-49,96). U 10 tumora (22,2%) 10-50% tumorskih





**Slika 14.** Ekspresija ICAM-1 na stanicama invazivnog raka dojke: veća žarišta pozitivnih stanica (a); tumorske stanice su većinom pozitivne (b i c); snažno membransko bojenje stanica medularnog raka (d); negativne stanice lobularnog raka (e); bojenje u području apikalnog pola na stanicama mucinoznog raka (f).

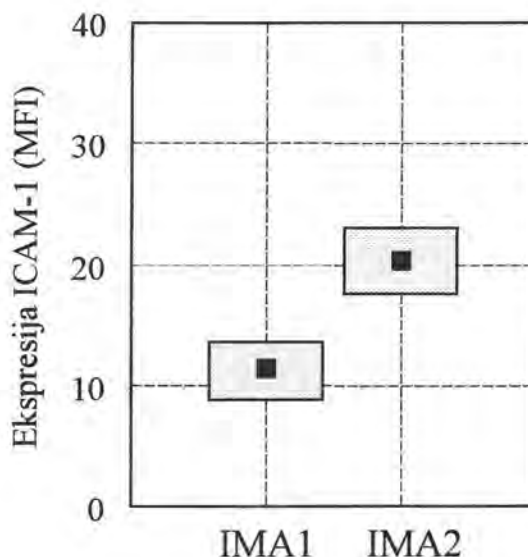
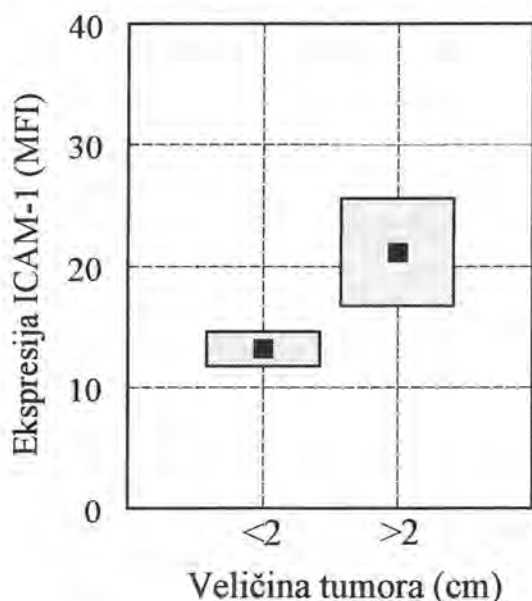


stanica ispoljava ICAM, a MFI je u rasponu od 9,14 do 38,46, a gotovo uvijek iznad 20. U 6 tumora (13,3%) ICAM-1 nalazi se na manje od 10% stanica uz MFI od 0,5-29,28.

Studentovim t testom ispitivali smo povezanost ispoljenosti ICAM-1 s prognostičkim pokazateljima. Rezultati se odnose na sve histološke tipove. Ispitivanjem smo utvrdili povezanost ispoljenosti ICAM-1 s veličinom tumora, indeksom mitotske aktivnosti, gradusom te histološkim tipom.

**Odnos površinske ispoljenosti molekule ICAM-1 i veličine tumora.** Tumori čiji je promjer veći od 2 cm imaju značajno veću razinu ekspresije molekule ICAM-1 nego manji tumori. Razlika je utvrđena na razini od 4% (slika 15).

Jednosmjernim ispitivanjem varijance utvrdili smo da je razlika u ekspresiji ICAM-1 između velikih i malih tumora dobivena na račun skupine tumora koji nisu metastazirali ( $p < 0,0004$ ). Naprotiv, u tumora koji su metastazirali, nema razlike u ekspresiji ICAM-1 između malih i velikih tumora.

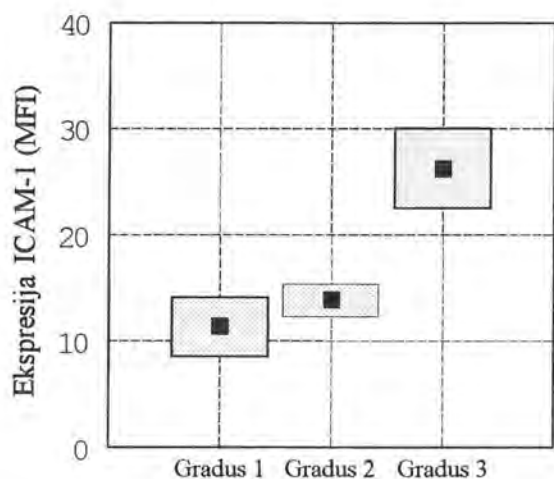


**Slika 15 .** Odnos ekspresije ICAM-1 i veličine tumora. Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).

**Slika 16 .** Ekspresija ICAM-1 na stanicama tumora s niskom (IMA1) i visokom (IMA2) mitotskom aktivnošću. Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).

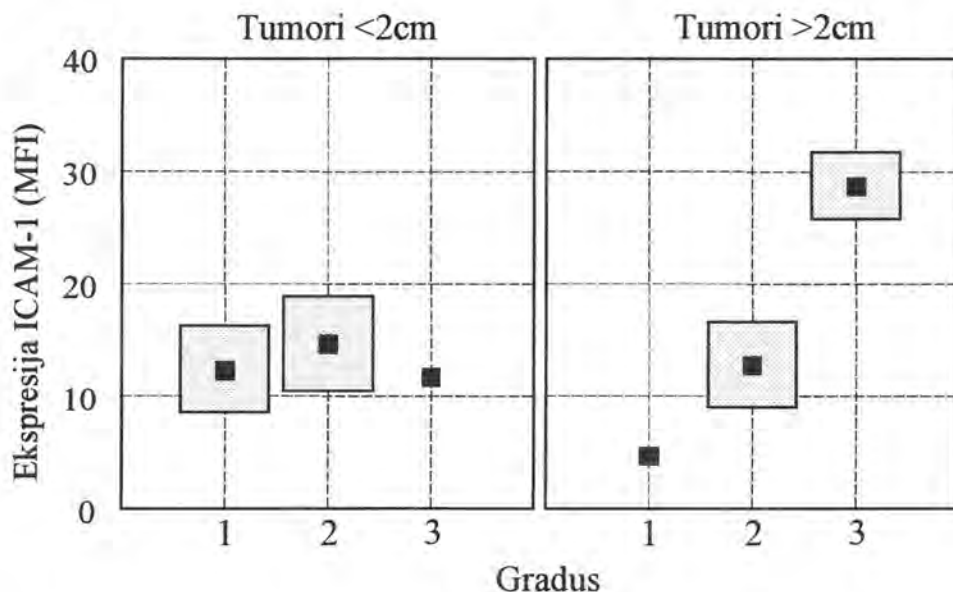
**Odnos površinske ispoljenosti molekule ICAM-1 i indeksa mitotske aktivnosti.** Povezanost ispoljenosti ICAM-1 i broja mitozu utvrdili smo na razini od 2%. Tumori s velikim brojem mitozu imaju višu razinu ekspresije ICAM-1 molekule. Na slici nalaze se srednje vrijednosti fluorescencije uz standardnu pogrešku (slika 16).

**Odnos površinske ispoljenosti molekule ICAM-1 i gradusa.** Slabo diferencirani tumori imaju značajno višu razinu ekspresije ICAM-1 u odnosu na dobro diferencirane ( $p < 0,01$ ) i umjereno diferencirane tumore ( $p < 0,02$ ), dok između dobro i umjereno diferenciranih tumora nema razlike (slika 17).



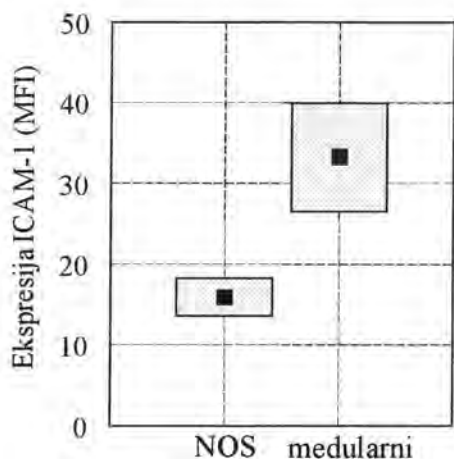
Slika 17. Odnos ekspresije ICAM-1 i diferenciranosti tumora (gradus). Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).

Jednosmjernim ispitivanjem varijance (ANOVA metoda) potvrdili smo značajnu povezanost ICAM-1 i gradusa i pokazali povezanost ovih parametara s veličinom tumora. Naime, u malih tumora nema razlike u ekspresiji ICAM-1 bez obzira na gradus. Naprotiv, u tumorima čiji je promjer veći od 2 cm, postoji značajna razlika u ekspresiji ICAM-1 na slabo diferenciranim tumorima u odnosu na umjereno i dobro diferencirane tumore (slika 18).



Slika 18. Odnos ekspresije ICAM-1 i diferenciranosti tumora (gradus). Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).





**Slika 19.** Ekspresije ICAM-1 na stanicama duktalnog NOS i medularnog raka. Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).

**Odnos površinske ispoljenosti molekule ICAM-1 i histološkog tipa.** Razinu ekspresije molekule ICAM-1 na duktalnim NOS karcinomima usporedili smo s onom u medularnih karcinoma uporabom Studentovog t testa. Medularni karcinomi imaju značajno višu razinu ekspresije molekule ICAM-1 u odnosu na duktalne NOS karcinome ( $p < 0,01$ ). Isti rezultat dobili smo usporedbom srednjeg intenziteta fluorescencije pozitivnih stanica, kao i srednjeg intenziteta fluorescencije svih stanica (slika 19).

#### **4.2.2.2. Usporedba ekspresije molekule ICAM-1 na stanicama primarnih tumora i stanicama u metastazi**

Ispitali smo 13 karcinoma koji su metastazirali u pazušne limfne čvorove i utvrdili da nema značajne razlike u razini ekspresije ICAM-1 molekule na stanicama primarnih tumora u odnosu na metastazu.

### **4.3. EKSPRESIJA MOLEKULE CD44**

#### **4.3.1. Rezultati imunohistokemije**

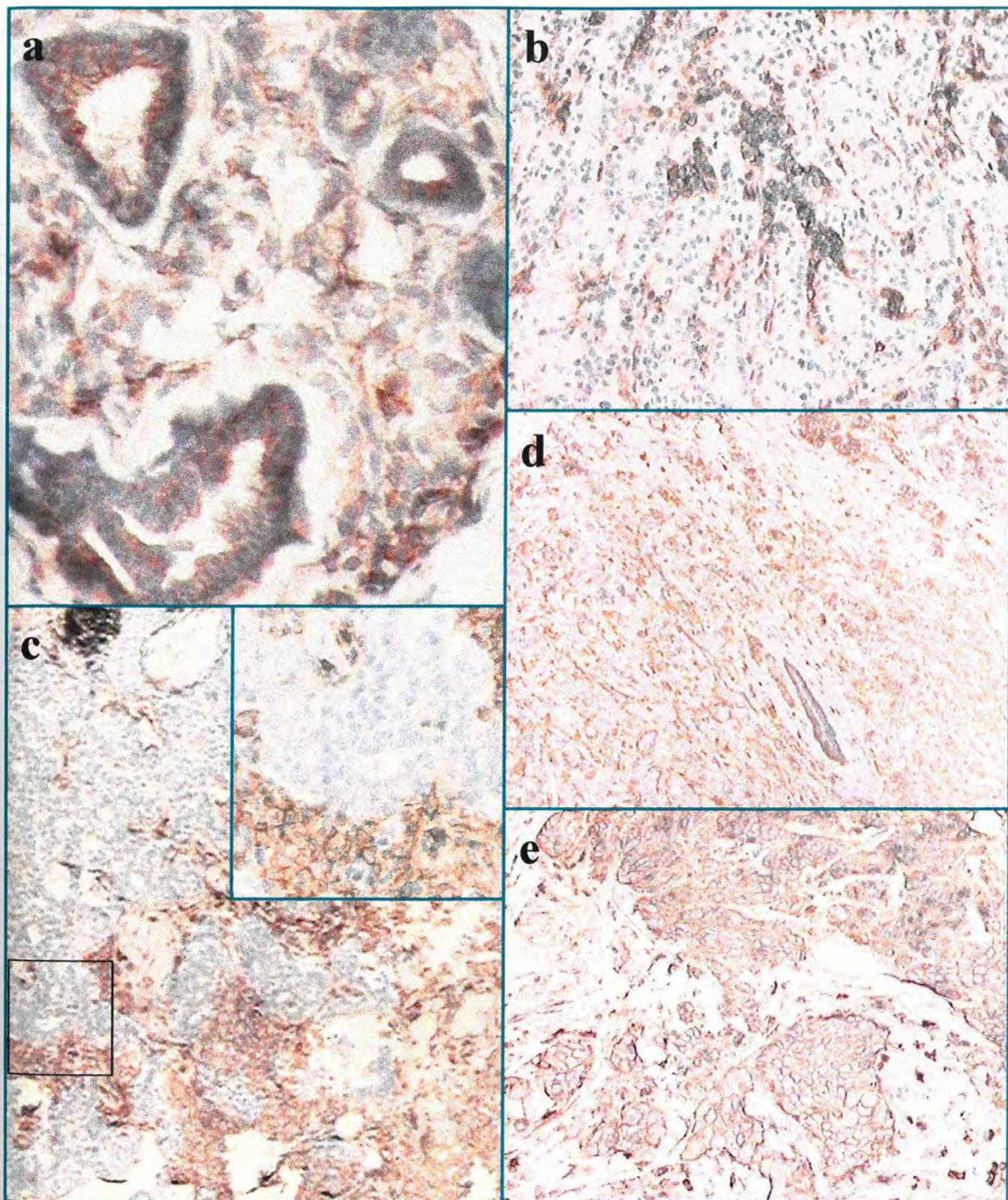
##### **4.3.1.1. Ekspresija molekule CD44 u normalnom tkivu dojke**

U normalnom tkivu dojke molekula CD44 molekula nalazi se na stanicama kanalića i acinusa, na endotelnim stanicama kapilara i krvnih žila, a najsnažnije je ispoljena na limfocitima i histiocitima. Epitelne stanice kanalića i acinusa ponekad se boje duž cijele stanične membrane (slika 20a), a ponekad samo na bazolateralnom dijelu membrane.

##### **4.3.1.2. Ekspresija molekule CD44 na stanicama duktalnih NOS karcinoma**

Ispitali smo 63 duktalna NOS karcinoma. Ispoljenost ove molekule odredili smo semikvantitativno. Tumore koji su većim dijelom ili u cijelosti negativni označili smo s 1.





**Slika 20** Ekspresija CD44 u normalnom tkivu dojke (a) i na stanicama invazivnog dukalnog NOS raka (b-e): tumorske stanice su negativne (b); tumorske stanice koje zatvaraju kribriformne formacije su negativne, a disocirane, pojedinačne stanice su snažno pozitivne (c); tumorske stanice su dijelom pozitivne, a dijelom negativne uz mjestimično bojenje periferije tumorskih otočića (d); snažno membransko bojenje tumorskih stanica (e).



Tumore u kojih su stanice heterogene s obzirom na ekspresiju CD44 molekule i u kojima se izmjenjuju područja pozitivnih stanica s negativnim područjima označili smo s 2. Tumore koji su većim dijelom ili u cijelosti pozitivni označili smo s 3.

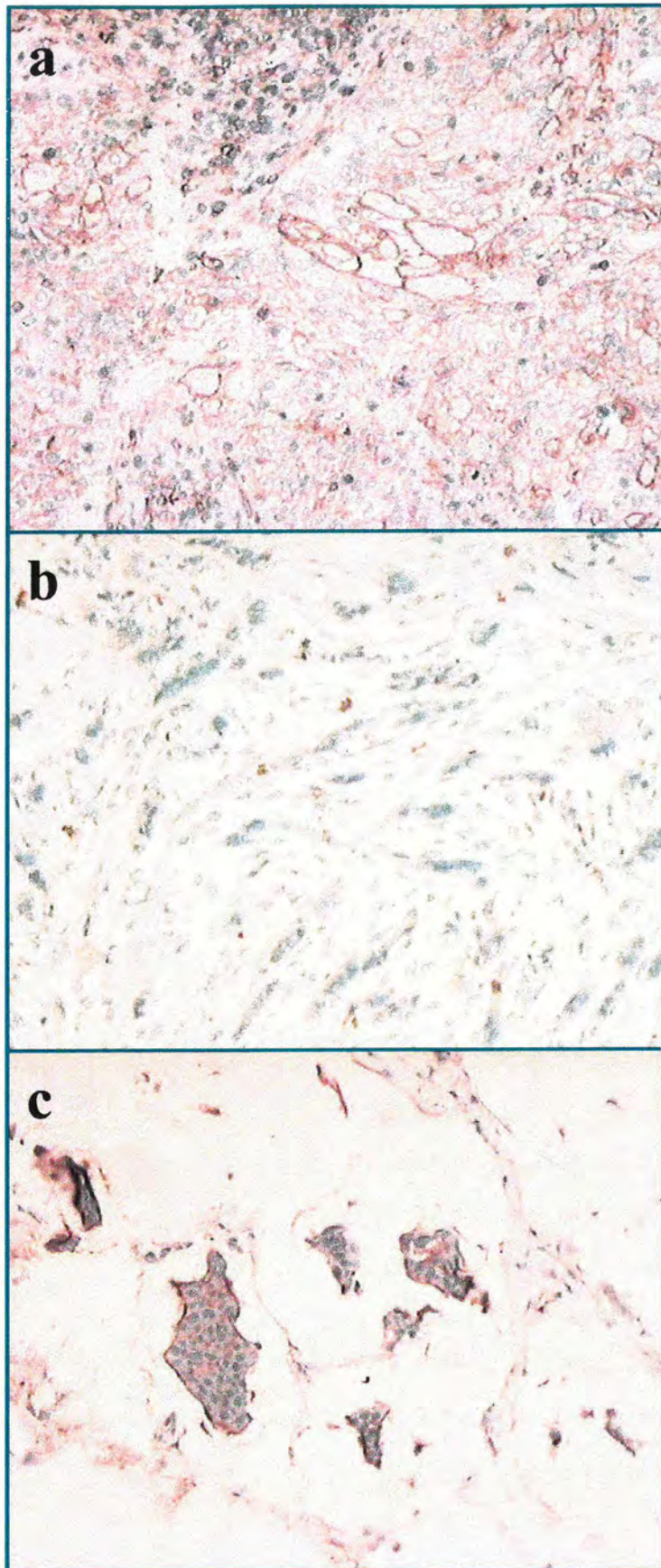
U 27 tumora (42,9%) stanice su većinom negativne (slika 20b). Ponekad se nalazi samo bojenje periferije tumorskih otočića dok su stanice u središtu otočića negativne. U 22 tumora (34,9%) izmjenjuju se područja negativnih i pozitivnih stanica (slika 20d). U nekih tumora negativne stanice stvaraju solidne, dobro diferencirane nakupine, a pojedinačne, disocirane tumorske stanice postaju pozitivne (slika 20c). U 14 tumora (22,2%) tumorske stanice su većinom, ili u cijelosti pozitivne (slika 20e).

Ispoljenost molekule CD44 usporedili smo s prognostičkim pokazateljima pomoću  $\chi^2$  testa. Rezultate pokazuje tablica 4.

Tablica 4. Ekspresija molekule CD44 na stanicama dukalnog NOS raka

	Razina ekspresije CD44 molekule			Ukupno	p vrijednost
	1	2	3		
Veličina tumora					
<2	14	9	9	32	0.38835
>2	13	13	5	31	
Limfni čvorovi					
negativni	11	11	8	30	0.58532
pozitivni	16	11	6	30	
IMA					
<10	14	11	7	32	0.98947
>10	13	11	7	31	
MPI					
<0,6	15	15	9	39	0.64962
>0,6	12	7	5	24	
Gradus					
1	3	5	5	13	0.29020
2	20	16	7	43	
3	4	1	2	7	

Rezultati pokazuju da nema značajne povezanosti između ispoljenosti molekule CD44 i prognostičkih parametara.



**Slika 21.** Ekspresija CD44 na stanicama medularnog raka (a), lobularnog raka (b) i mucinoznog raka (c).

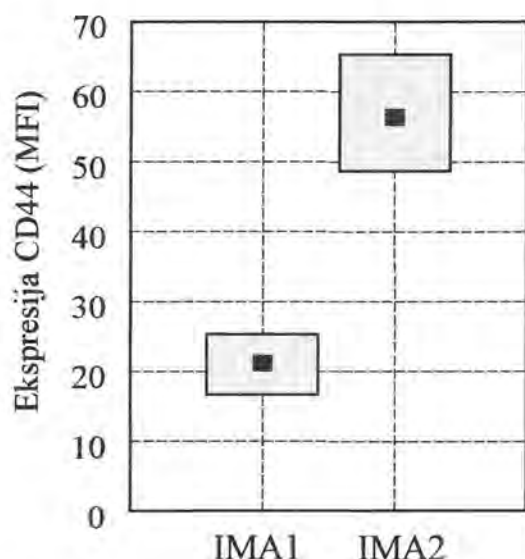
### 4.3.1.3. Ekspresija molekule CD44 na stanicama ostalih tipova raka dojke

Ispitali smo i 4 medularna karcinoma, 5 lobularnih te 4 mucinozna karcinoma. U jednom medularnom karcinomu većina stanica je bila negativna, u jednom su stanice većinom pozitivne, a u 2 su negativne i pozitivne stanice zastupljene u približno jednakom omjeru (slika 21a). U tri lobularna karcinoma stanice su negativne (slika 21b), a u 2 se izmjenjuju područja negativnih i pozitivnih stanica. U svih mucinoznih karcinoma tumorske stanice su dijelom pozitivne, a dijelom negativne (slika 21c).

### 4.3.2. Rezultati protočne citometrije

#### 4.3.2.1. Ekspresija molekule CD44 na stanicama primarnog tumora

Ispitali smo 45 tumora, od toga 34 duktalna NOS karcinoma, 4 medularna, 2 mucinozna i 5 lobularnih karcinoma.



Slika 22. Ekspresija molekule CD44 na stanicama tumora s niskom (IMA1) i visokom (IMA2) mitotskom aktivnošću. Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).

Tumori se razlikuju s obzirom na ispoljenost CD44 molekule. Postoje razlike u postotku stanica koje su pozitivne te razlike u intenzitetu fluorescencije pozitivnih stanica.

U 12 tumora (26,7%) molekula CD44 ispoljena je na svim ili gotovo svim (>90%) tumorskim stanicama uz MFI od 3,9-157,8. U 16 tumora (35,5%) ona se nalazi na većini tumorskih stanica (50-90%), a intenzitet fluorescencije je od 4,9-120,8. U 12 tumora (26,7%) molekulu CD44 ispoljava 10-50 % tumorskih stanica uz intenzitet fluorescencije od 29,2 do 86,43.

U svega 4 tumora (8,9%) potpuno se gubi molekula CD44 te se nalazi na površini manje od 10% stanica, a intenzitet fluorescencije je od 0,2 do 147,2. Ovaj veliki raspon intenziteta fluorescencije ukazuje na to da se u ukupnoj populaciji stanica vjerojatno nalazi i pokoja stanica koja nije tumorska, a koja normalno ispoljava molekulu CD44.



Rezultate smo usporedili s prognostičkim pokazateljima pomoću Studentovog t testa.

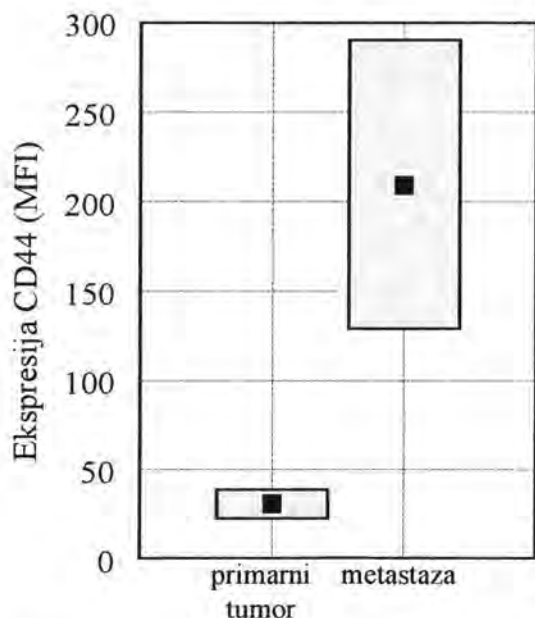
Značajnu povezanost utvrdili smo između mitotske aktivnosti tumora i srednjeg intenziteta fluorescencije pozitivnih stanica ( $p < 0,001$ ) (slika 22), a također i srednjeg intenziteta fluorescencije ukupne populacije ( $p < 0,03$ ). Pri tome tumori s većim mitotskim indeksom imaju višu razinu molekule CD44 na površini stanica.

Ispitivanjem samo duktalnih NOS karcinoma potvrdili smo povezanost mitotske aktivnosti i srednjeg intenziteta fluorescencije pozitivnih stanica ( $p < 0,05$ ).

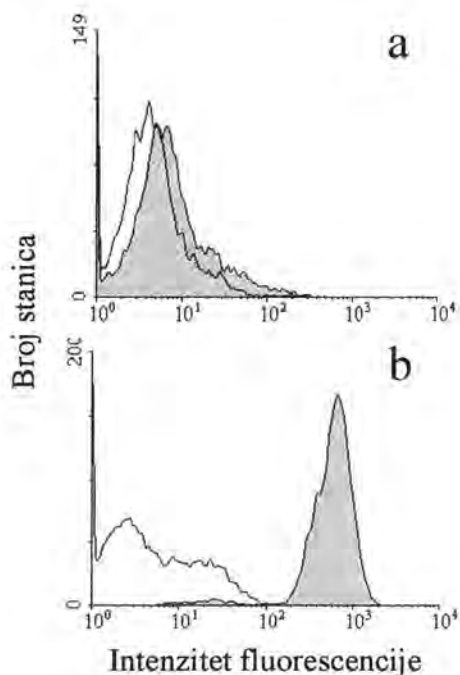
Usporedili smo i intenzitet fluorescencije na duktalnim NOS karcinomima i ostalim histološkim tipovima i utvrdili da duktalni NOS karcinomi imaju višu razinu ispoljenosti molekule CD44 u odnosu na ostale histološke tipove ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2.2. Usporedba ispoljenosti molekule CD44 na stanicama primarnih tumora i metastaze

U 13 karcinoma (10 duktalnih NOS, 2 lobularna i 1 medularni karcinom) ispitivali smo ekspresiju molekule CD44 i na stanicama sekundarnog tumora, odnosno na tumorima koji su



**Slika 23.** Ekspresija molekule CD44 na stanicama primarnog tumora i na stanicama metastaze. Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).



**Slika 24.** Ekspresija molekule CD44 na stanicama primarnog tumora (a) i na stanicama metastaze (b) (sivi histogram). Neobojeni histogram predstavlja negativnu kontrolu.

metastazirali u pazušne limfne čvorove.

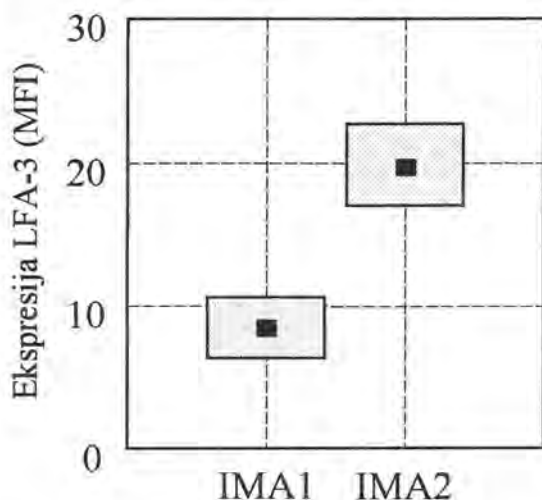
Pomoću Studentovog t testa usporedili smo srednji intenzitet fluorescencije pozitivnih stanica te srednji intenzitet fluorescencije svih stanica primarnog tumora i metastaze.

Na stanicama primarnih tumora ekspresija molekule CD44 je niža nego na stanicama metastaze (slika 23 i 24). Do sličnog zaključka došli smo uspoređivanjem postotka pozitivnih stanica i utvrdili da je u primarnim tumorima manji nego u metastazi ( $p < 0,03$ ).

#### 4.4. EKSPRESIJA MOLEKULE LFA-3

##### 4.4.1. Ekspresija molekule LFA-3 na stanicama primarnog tumora

Metodom protočne citometrije analizirali smo 31 tumor, od toga je 26 duktalnih NOS karcinoma, 2 medularna, 2 lobularna i jedan mucinozni karcinom.



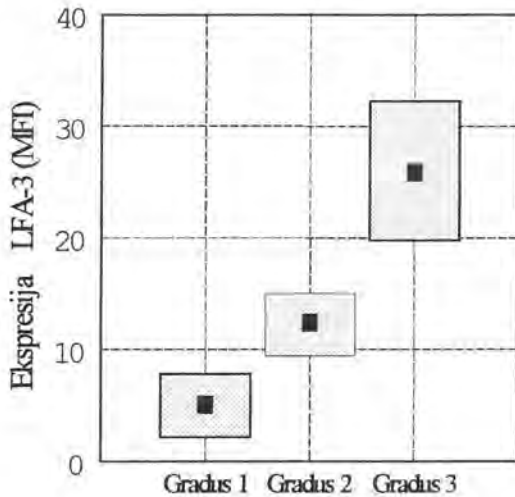
Slika 25. Ekspresija molekule LFA-3 na stanicama tumora s niskom (IMA1) i visokom (IMA2) mitotskom aktivnošću. Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).

Rezultati pokazuju raznolikost tumora s obzirom na ispoljenost molekule LFA-3. U 11 tumora (35,5%) gotovo sve tumorske stanice ispoljavaju molekulu LFA-3 uz intenzitet fluorescencije od 1,3-21,6. U 9 tumora (29%) pozitivna je većina stanica (50-90%), a intenzitet fluorescencije je od 3,7-14,53. U 4 tumora (12,9%) pozitivno je manje od 50% stanica uz intenzitet fluorescencije od 20,9-43,3. U 7 tumora (15,5%) tumorske stanice su većinom negativne, a pozitivno je manje od 10% stanica uz intenzitet fluorescencije od 1-68,8. Ovako

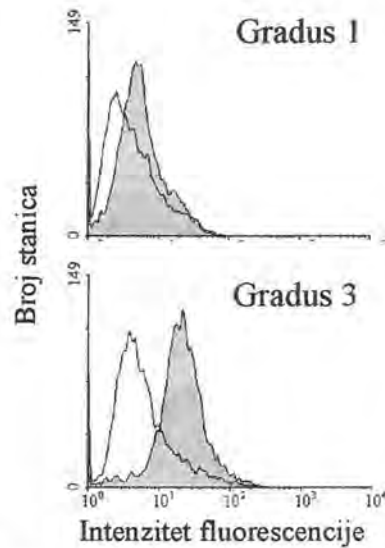
veliki raspon, odnosno visoka vrijednost najvećeg intenziteta fluorescencije u ovoj skupini, što se inače ne javlja u ostalim skupinama, ukazuje na moguće uključivanje stanica koje nisu tumorske, a koje ispoljavaju molekulu LFA-3.



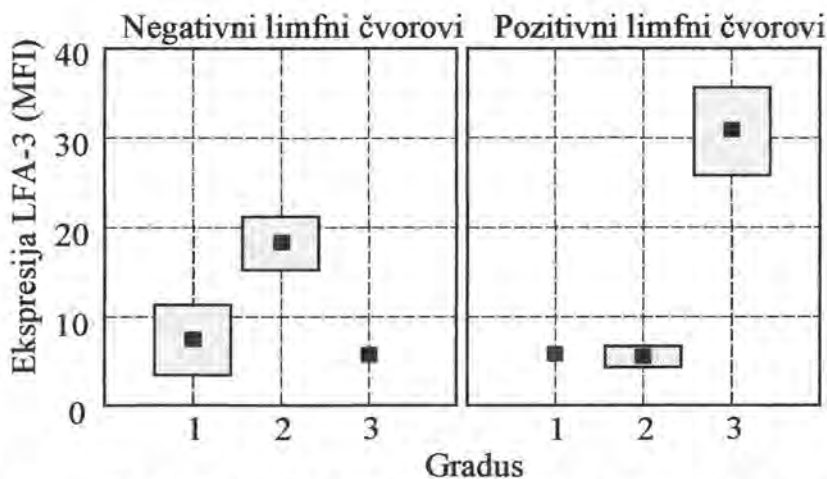
Rezultate smo usporedili s prognostičkim pokazateljima pomoću Studentovog t testa. Ispitivanjem svih histoloških tipova utvrdili smo povezanost samo s mitotskom aktivnošću, pri čemu su tumori s većom mitotskom aktivnošću imali višu razinu ispoljenosti molekule LFA-3 ( $p < 0,05$ ) (slika 25). Ispitivanjem samo duktalnih NOS karcinoma utvrdili smo povezanost s više prognostičkih pokazatelja.



Slika 26. Odnos ekspresije LFA-3 i diferenciranosti tumora (gradus). Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).



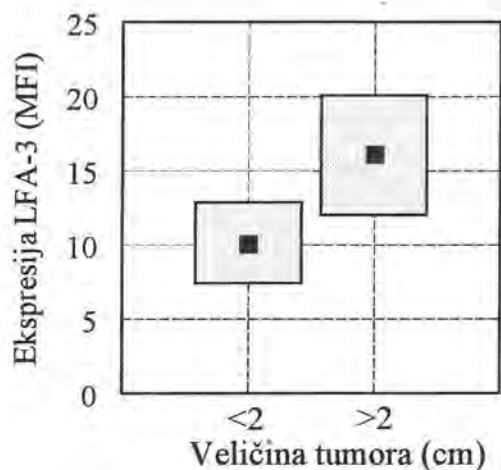
Slika 27. Ekspresija LFA-3 na stanicama dobro (gradus 1) i slabo (gradus 2) diferenciranih tumora (sivi histogram). Nebojeni histogram predstavlja negativnu kontrolu.



Slika 28. Usporedba ekspresije LFA-3 i diferenciranosti (gradus) na stanicama tumora s negativnim, odnosno pozitivnim limfnim čvorovima. Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).

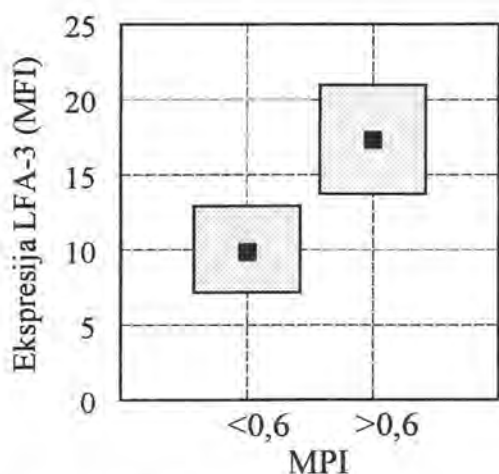
**Povezanost s gradusom.** Intenzitet fluorescencije pozitivnih stanica raste s porastom gradusa. Značajna razlika postoji između gradusa 1 i 3 ( $p < 0,02$ ), gradusa 2 i 3 ( $p < 0,04$ ), a

također i gradusa 1 i 2 ( $p < 0,03$ ) (slika 26 i 27). Zanimljivo je opažanje da svi dobro diferencirani tumori imaju više od 80% pozitivnih stanica. Ako se skupina slabo diferenciranih tumora grupira po statusu limfnih čvorova, onda razlika između gradusa 3 i ostalih postaje još



**Slika 29.** Odnos ekspresije LFA-3 i veličine tumora. Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□)

opažanje proizlazi iz prethodnih, budući da su veliki tumori i slabo diferencirani tumori ujedno i pokazatelji loše prognoze (slika 30).



**Slika 30.** Ekspresija LFA-3 u tumorima s niskim (<0,6) i visokim (>0,6) morfolometrijskim prognostičkim indeksom (MPI). Prikazani su srednja vrijednost (■) i standardna pogreška (□).

značajnija. Naime, svi tumori gradusa 3 imaju metastaze u limfnim čvorovima, osim jednoga, a njegov se intenzitet fluorescencije ne razlikuje od tumora gradusa 1 i 2 (slika 28).

**Povezanost s veličinom tumora.** Stanice tumora promjera većeg od 2 cm ispoljavaju višu razinu molekule LFA-3 nego stanice manjih tumora ( $p < 0,04$ ) (slika 29).

**Povezanost s prognostičkim indeksom.** Tumori koji imaju prognostički indeks iznad 0,6 imaju veći intenzitet fluorescencije pozitivnih stanica u odnosu na tumore s manjim prognostičkim indeksom ( $p < 0,03$ ). Ovo

#### 4.4. 2. Usporedba ispoljenosti molekule LFA-3 na stanicama primarnih tumora i stanicama u metastazi

Ispitali smo 8 tumora, 7 duktalnih NOS karcinoma i jedan lobularni karcinom. Usporedili smo srednji intenzitet fluorescencije pozitivnih stanica te ukupni intenzitet fluorescencije u primarnom tumoru te u metastazi. Među njima nema značajne razlike.

## 5. RASPRAVA

Rak dojke najčešći je zloćudni tumor u žena, a incidencija je u stalnom porastu. Tijekom zadnje decenije postignut je velik napredak u terapijskim modalitetima te u saznanjima o etiologiji raka, ali se smrtnost od raka dojke nije značajno promijenila. Glavni problem u liječenju raka dojke je raznoliko biološko ponašanje tumora, odnosno raznolik tijek bolesti koji se ne može uvijek predvidjeti na temelju morfoloških osobina tumora, posebice duktalnog NOS karcinoma, koji je najčešći tip raka dojke. Stoga su napori brojnih istraživača usmjereni na otkrivanje prognostičkih pokazatelja koji mogu predvidjeti tijek bolesti, a to je preduvjet za primjenu odgovarajuće terapije.

Glavni uzrok smrti u bolesnica koje boluju od raka su metastaze, a one se u velikog broja bolesnica razvijaju prije postavljanja dijagnoze. U procesu invazije i metastaziranja tumora značajnu ulogu imaju adhezivna zbivanja među samim tumorskim stanicama te između tumorskih stanica i vanstaničnog matriksa. Tijekom invazije stanice se šire u tkiva u okolini primarnog tumora, ulaze u limfne i krvne žile i raznose se po organizmu. Neke stanice se mogu zaustaviti u određenim tkivima, napustiti krvožilni prostor i proizvesti sekundarni tumor. To je složen proces koji podrazumijeva promjene staničnih osobina kao što su nekontrolirani rast, promjene u staničnoj pokretljivosti, lučenje proteolitičkih enzima te promjene adhezije, a one mogu imati utjecaja na brojne stepenice u metastatskoj kaskadi. Brojne studije *in vitro* i *in vivo* pokazale su da u mnogim tumorima dolazi do promjena u ispoljavanju adhezijskih molekula, što se odražava na biološko ponašanje tumora (5,35,42,108,157,176,176).

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati prisustvo adhezijskih molekula, kao što su  $\beta 1$  integrini, molekula CD44, ICAM-1 i LFA-3, na stanicama invazivnog raka dojke i istražiti njihovu povezanost s prognostičkim pokazateljima kao što su veličina tumora, prisustvo metastaza u limfnim čvorovima, mitotska aktivnost te histološko stupnjevanje tumora. Osim ovih, dobro utvrđenih i prihvaćenih prognostičkih pokazatelja, koristili smo i morfometrijski prognostički indeks, koji može uspješnije predvidjeti tijek bolesti u odnosu na druge pojedinačne ili kombinirane parametre (14). Cilj je stoga bio utvrditi da li adhezijske molekule na stanicama raka dojke mogu imati prognostički značaj, odnosno, da li njihovo prisustvo može predvidjeti tijek bolesti.

Analizirali smo ispoljenost adhezijskih molekula u normalnom tkivu dojke te na stanicama karcinoma dojke. Koristili smo metodu imunohistokemije koja daje uvid u



anatomsku rasprostranjenost ovih molekula, odnosno prisustvo molekule na određenim tkivnim strukturama, prisutnim u normalnom tkivu dojke te na stanicama tumora. S obzirom na intenzitet bojenja, mogu se uočiti i kvantitativne razlike u ispoljenosti. Istodobno je moguće razlikovati membransko od citoplazmatskog bojenja, što je odraz različite lokalizacije ovih molekula u stanici. Rezultate imunohistokemije kombinirali smo s metodom protočne citometrije, koja je puno osjetljivija. Ova metoda omogućila je otkrivanje malih količina adhezijskih receptora na staničnoj površini, koje nije moguće prikazati imunohistokemijskim bojenjem i stoga daje potpuniji uvid u ispoljenost adhezijskih molekula, omogućuje lakše određivanje proporcije pozitivnih stanica te preciznije uočavanje kvantitativnih razlika u ekspresiji. Međutim, ona uključuje sve tumorske stanice i ne može prikazati razlike između stanica *in situ* i invazivnog raka. Pored toga moguće je, premda je ono vjerojatno zanemarivo, uključivanje i stanica koje nisu tumorske, već pripadaju normalnim tkivnim strukturama, npr. endotelnih stanica, histiocita, koje se veličinom približavaju tumorskim stanicama. Također, ne daje uvid u prisustvo molekule unutar stanice, jer se protutijela vežu samo za membranske antigene.

U normalnom tkivu dojke  $\beta 1$  molekula nalazi se na stanicama kanalića i acinusa, najintenzivnije se prikazuju mioepitelne stanice, dok se bazolateralna površina luminalnih stanica prikazuje nešto slabijim intenzitetom, a luminalni pol većinom je negativan. Endotelne stanice kapilara i krvnih žila pokazuju intenzivno bojenje, ono je ponekad prisutno i na površini fibroblasta te limfocita, a također i u području mišićnice arterija te unutar živca.

Podaci iz literature opisuju jednak uzorak ekspresije  $\beta 1$  integrina u normalnom tkivu dojke (77,79,126). Autori većinom ne koriste protutijela koja prepoznaju zajednički  $\beta 1$  lanac, već određene  $\alpha$  lance i pomoću njih istražuju ispoljenost receptora za različite ligande u normalnom tkivu dojke te na stanicama raka. Mioepitelne stanice koje su u neposrednom kontaktu s vanstaničnim matriksom snažno ispoljavaju  $\beta 1$  molekulu, a također i  $\alpha 1$  (receptor za laminin i kolagen),  $\alpha 2$  (receptor za kolagen i laminin),  $\alpha 3$  (receptor za kolagen, laminin i fibronektin) te  $\alpha 6$  molekulu (receptor za laminin) (77,79,126,152). Na bazolateralnoj površini luminalnih stanica nalazi se samo  $\alpha 2\beta 1$  te  $\alpha 3\beta 1$  molekula, ali ne i receptori za laminin  $\alpha 1\beta 1$  i  $\alpha 6\beta 1$ . U kanalićima izdužene mioepitelne stanice stvaraju više-manje kontinuirani omotač koji je u neposrednom kontaktu sa bazalnom membranom i razdvaja luminalne stanice od strome. U acinusima su mioepitelne stanice zvjezdolikog oblika pa je dio luminalnih stanica u dodiru s bazalnom membranom. To je vjerojatno razlog zašto se  $\alpha 6\beta 1$  molekula nalazi i na

luminalnim stanicama acinusa, ali ne i kanalića (77). Molekule  $\alpha 2\beta 1$  i  $\alpha 3\beta 1$  na bazolateralnoj površini luminalnih stanica vjerojatno posreduju i međustaničnu adheziju između luminalnih te luminalnih i mioepitelnih stanica, a ne samo adheziju stanica za vanstanični matriks. Zutter i Santoro istražili su ispoljenost  $\alpha 2\beta 1$  molekule na brojnim uzorcima normalnog tkiva i pokazali da je ovaj receptor snažnije ispoljen na mjestima proliferacije epitela (226). Do istog opažanja došli su i Jones i suradnici (109), a u istim područjima epitelne proliferacije bila je jače ispoljena i  $\beta 1$  molekula. Autori pretpostavljaju da je  $\alpha 2\beta 1$  receptor udružen s pravilnom, reguliranom staničnom proliferacijom, a prisustvo duž čitave stanične membrane upućuje na ulogu u ostvarivanju međustaničnih kontakata.

$\alpha 4\beta 1$  (receptor za fibronektin i VCAM-1) te  $\alpha 5\beta 1$  (receptor za fibronektin) nisu ispoljeni na epitelnim stanicama normalnog tkiva dojke. Samo ponekad se  $\alpha 5\beta 1$  može uočiti na stromalnim fibroblastima (126).

U benignih tumora dojke te fibrocistične bolesti ne dolazi do promjene u ispoljenosti  $\beta 1$  integrina (79,126,152), dok u karcinoma često dolazi do djelomičnog ili potpunog gubitka ekspresije ove molekule (79,114,126). Naši rezultati, dobiveni imunohistokemijskim bojenjem, također pokazuju raznolikost karcinoma dojke s obzirom na ekspresiju  $\beta 1$  integrina. U 26% duktalnih NOS karcinoma  $\beta 1$  molekula je održana na tumorskim stanicama, u potpunosti ili većim dijelom. U gotovo 2/3 tumora (74,1%) došlo je do gubitka  $\beta 1$  molekule, a u 33% on je potpun, tj sve ili gotovo sve tumorske stanice su negativne. Rezultati protočne citometrije pokazuju da je potpuni gubitak samo prividan, naime, u preko 80% karcinoma dojke pozitivno je više od 90% tumorskih stanica, premda je bojenje ponekad vrlo slabog intenziteta. Usporedba s prognostičkim parametrima pokazala je povezanost smanjene ispoljenosti ove molekule s manjom mitotskom aktivnošću, pozitivnim limfnim čvorovima te morfometrijskim indeksom većim od 0,6. Literaturni podaci su različiti i često oprečni. Autori se većinom slažu da u značajnom broju karcinoma dolazi do gubitka ispoljenosti  $\beta 1$  molekule (79,114), osim Mechtersheimera i suradnika (152) koji su pokazali gubitak  $\alpha$  lanaca, dok je molekula  $\beta 1$  većinom očuvana na tumorskim stanicama. Ove razlike mogu se objasniti primjenom različite vrste  $\alpha\beta 1$  protutijela (109). Uz to, postavlja se pitanje da li se uopće može govoriti o gubitku ovih molekula. Naime, receptori za proteine vanstaničnog matriksa u najvećoj su mjeri zastupljeni na mioepitelnim stanicama, a manjim dijelom na luminalnim stanicama. Budući da se karcinom dojke uglavnom diferencira u smjeru duktalnog/lobularnog fenotipa i uglavnom ne pokazuje mioepitelnu diferencijaciju, pitanje je da li se uopće može

govoriti o razlikama u ispoljenosti na normalnim stanicama u odnosu na stanice karcinoma. Ipak, oba stanična tipa vjerojatno potječu od istog prekursora, a luminalne stanice zadržavaju sposobnost sinteze proteina matriksa i u odsustvu mioepitelnih stanica.

U literaturi se često opisuje gubitak  $\alpha 2$  molekule (77,126,152) koji je udružen sa smanjenom ekspresijom estrogenih receptora (152,225) i niskim stupnjem diferencijacije (152,225). Povezanost  $\alpha 2$  molekule s prognostičkim pokazateljima opisana je i u kolorektalnom karcinomu, gdje je gubitak ove molekule udružen s Dukes'ovim stadijem C/D (123). Suprotno tome, u melanomu i karcinomu pluća tumorska progresija udružena je s povećanom ispoljenošću ove molekule (118,227). Ovi rezultati upućuju na zaključak da promijenjena razina ispoljenosti  $\alpha 2\beta 1$  integrina na različitim tipovima tumorskih stanica može različito utjecati na ponašanje tumora. U svezi s tim treba spomenuti da  $\alpha 2$  molekula na nekim tipovima stanica služi kao receptor za kolagen, a na drugim za laminin (101). Slično tome, Zutter i suradnici opisali su smanjenu ekspresiju  $\alpha v\beta 3$  receptora za vitronektin u invazivnom raku dojke (225), dok Albelda i suradnici (4) opisuju povećanu ekspresiju istog receptora u melanomu u vertikalnoj fazi rasta u odnosu na radijalnu fazu i na nevuse, što upućuje na moguću ulogu ovog receptora u procesu metastaziranja. Ovi rezultati govore da isti receptor može pokazivati različiti uzorak ispoljenosti u tumorima koji imaju metastatski potencijal.

U značajnog broja karcinoma dojke dolazi i do gubitka  $\alpha 3\beta 1$  molekule (22,49,114,126,152), a opisana je i povezanost ove molekule sa smanjenom ekspresijom estrogenih receptora (152). Ograničenost ove molekule na mjesta međustaničnog kontakta na tkivnim rezovima te u staničnoj kulturi (114) govori u prilog njezinog značaja u ostvarivanju međustanične adhezije. To potvrđuju i rezultati Cartera i suradnika (227) koji su pokazali da  $\alpha 3$  ima značajnu ulogu u posredovanju međustanične adhezije humanih epidermalnih stanica te adhezije za vanstanični matriks. Prema tome, niska ispoljenost ove molekule u karcinomu dojke mogla bi doprinijeti disocijaciji tumorskih stanica i tako im povećati migratorni potencijal.

Rezultati D'Ardennea i suradnika (49) negiraju spomenute promjene u ekspresiji  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  lanca. Oni su ispitivali ispoljenost svih šest  $\alpha$  lanaca na normalnom tkivu dojke te na stanicama invazivnog raka i pokazali da u invazivnom raku dolazi do značajnog gubitka samo  $\alpha 6$  molekule te, u manjoj mjeri,  $\alpha 2$  molekule. Smanjena ekspresija  $\alpha 6$  podjedinice bila je u recipročnom odnosu sa gradusom, tj. u višem histološkom stupnja primijećena je manja



ispoljenost lamininskog receptora. Uočena je i značajna povezanost između ispoljenosti receptora za laminin i laminina u vanstaničnom prostoru. Dok je u normalnom tkivu dojke receptor za laminin snažno ispoljen i lokaliziran u području bazalnog pola stanice, u invazivnom raku ekspresija  $\alpha 6$  receptora je smanjena te pokazuje gubitak polarizacije uz difuzno membransko ili citoplazmatsko bojenje, a ono je povezano sa smanjenim odlaganjem laminina u matriks oko tumorskih otočića. Smanjenu ispoljenost  $\alpha 6$  receptora na stanicama invazivnog raka opisuju i drugi autori (49,77,79,84,126,152), a Friedrich i suradnici smatraju da je ona dobar prognostički pokazatelj koji može predvidjeti duže preživljavanje (70).

Dobro je poznata uloga integrina u procesu diferencijacije tkiva (86,111,199). Sposobnost epitelnih stanica dojke da sintetiziraju proteine mlijeka u odgovoru na hormonalne stimuluse ovisi o prisustvu odgovarajućeg vanstaničnog matriksa (199). Istraživanja povezanosti ekspresije  $\beta 1$  integrina i stupnja diferencijacije tumorskih stanica često daju oprečne rezultate. Neki autori opisuju smanjenu ekspresiju  $\alpha 2\beta 1$  integrina na slabo diferenciranim karcinomima dojke u odnosu na dobro diferencirane (152,166,225), dok drugi to negiraju (30,84). Zutter i suradnici opisuju smanjenu ekspresiju  $\alpha 2$  molekule u slabo diferenciranim karcinomima dojke u odnosu na normalno tkivo dojke i dobro diferencirane tumore. Isto je ustvrdio i za  $\alpha 5\beta 1$  te  $\alpha v\beta 1$  molekulu, mada je gubitak ovih molekula u odnosu na  $\alpha 2\beta 1$  slabije izražen (225). No, gubitak ispoljenosti  $\alpha 2$  molekule nije pratio usporedni gubitak  $\beta 1$  molekule, što upućuje na postojanje nekog drugog  $\alpha\beta$  dimera, odnosno, moguće je da je  $\beta 1$  podjedinica izložena na staničnoj površini bez pridružene  $\alpha$  podjedinice. Metodom *in situ* hibridizacije isti autori pokazali su da smanjenu ekspresiju  $\alpha 2\beta 1$  i  $\alpha 5\beta 1$  integrina u slabo diferenciranom karcinomu dojke prati smanjena razina mRNA za  $\alpha 2$  i  $\alpha 5$  podjedinicu (224). Promjene u nivou mRNA bile su ipak slabije izražene, mRNA se u nekim slučajevima mogla detektirati, a imunohistokemijom nije bilo moguće prikazati ekspresiju proteina na staničnoj membrani. To vjerojatno odraz različite osjetljivosti ove dvije tehnike, a moguće je i da dodatni mehanizmi, nakon prepisivanja mRNA ili tijekom prevođenja u protein, utječu na razinu  $\alpha$  podjedinica. Promjene u razini mRNA za  $\alpha$  podjedinice nisu bile praćene promjenom razine  $\beta 1$  mRNA, što je u skladu s prethodnim nalazom istog autora da  $\beta 1$  protein ostaje ispoljen na površini membrane i u odsustvu  $\alpha$  podjedinice (225). Moguće je da razne  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice podliježu različitim mehanizmima regulacije, odnosno da je ekspresija  $\beta 1$  integrina regulirana kontrolom ekspresije gena za  $\alpha$  podjedinicu.

Ardenne i suradnici opisali su recipročan odnos između ispoljenosti  $\alpha_6$  receptora na stanicama karcinoma dojke i gradusa. To je ujedno bila i jedina  $\alpha$  podjedinica koja je bila značajno manje ispoljena na stanicama karcinoma u odnosu na normalno tkivo dojke (49). Veza između integrina i stupnja diferencijacije istraživana je i na karcinomu bubrežnih stanica, a rezultati su različiti. Dok jedni autori opisuju odsustvo  $\alpha_3$  i  $\alpha_5$  molekula na stanicama dobro diferenciranog raka, a snažnu ispoljenost na stanicama umjereno i slabo diferenciranog raka (9), drugi opisuju snažnu ispoljenost  $\alpha_3$  i  $\beta_1$  molekule neovisno o gradusu (125). Isti autori pokazali su da u umjereno i slabo diferenciranim tumorima opada razina ekspresije  $\alpha_6$  receptora, ali se javlja  $\alpha_v$ , kojeg nema na stanicama dobro diferenciranog raka bubrežnih stanica (125). Obrnuti odnos ekspresije  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$  te  $\beta_1$  molekule i gradusa opisan je u kolorektalnom karcinomu (167) te karcinomu endometrija (136). Dakle, literaturni podaci različito povezuju ispoljenost  $\beta_1$  integrina sa stupnjem diferencijacije. Viši stupanj ponekad je udružen s gubitkom različitih  $\alpha$  podjedinica, a ponekad, naprotiv, s većom ispoljenošću  $\alpha$  podjedinica u odnosu na dobro diferencirane tumore. Opisane promjene ne moraju se odraziti i na ispoljenost  $\beta$  podjedinice. Naši rezultati imunohistokemijskog bojenja nisu pokazali značajnu povezanost  $\beta_1$  integrina i gradusa, premda su dobro diferencirani tumori češće snažno ekspimirali  $\beta_1$  molekulu, a slabo diferencirani češće pokazivali gubitak  $\beta_1$  molekule. Usporedba intenziteta fluorescencije s gradusom pokazala je da dobro diferencirani tumori imaju višu razinu ekspresije  $\beta_1$  molekule u odnosu na umjereno diferencirane, a također i slabo diferencirani u odnosu na umjerene, dok između gradusa I i III nije bilo značajne razlike. Međutim, ako se analizira samo skupina tumora s niskim mitotskim indeksom, onda se izdvaja skupina dobro diferenciranih tumora s visokom razinom  $\beta_1$  ekspresije u odnosu na umjereno i slabo diferencirane tumore sa značajno nižom razinom ekspresije  $\beta_1$  integrina. Tumačenje i uspoređivanje ovih rezultata s rezultatima drugih autora otežava činjenica da smo koristili protutijelo koje prepoznaje samo  $\beta_1$  podjedinicu. Ista razina ove molekule na stanicama tumora koji pokazuju različiti stupanj diferencijacije ne mora nužno značiti da nije došlo do promjene statusa integrinskih receptora, jer  $\beta_1$  podjedinica može biti udružena s drugom  $\alpha$  podjedinicom ili biti ispoljena u odsustvu  $\alpha$  podjedinice kao što je opisao Zutter (224).

Rezultati protočne citometrije pokazali su povezanost  $\beta_1$  integrina sa statusom limfnih čvorova. Naime, tumori u kojima je intenzitet fluorescencije pozitivnih stanica bio visok rjeđe su metastazirali, a u onim s niskim intenzitetom fluorescencije limfni čvorovi češće su bili

pozitivni. Ovaj rezultat dobiven je pomoću  $x^2$  testa, dok Studentov t test nije dao isti rezultat. U studiji Jonesa i suradnika ekspresija  $\beta 1$  integrina na stanicama karcinoma dojke nije korelirala sa statusom limfnih čvorova (109), dok Gui i suradnici opisuju povezanost smanjene ekspresije  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 6$  i  $\alpha v$  podjedinice s pozitivnim limfnim čvorovima (84). Koretz je opisao udruženost smanjene ekspresije  $\alpha 2$  molekule u kolorektalnom karcinomu s uznapređovalim Dukes'-ovim stadijem, a pri tom su stanice metastatskog tumora ispoljavale nižu razinu  $\alpha 2$  molekule u odnosu na primarni tumor (123). Pignatelli i suradnici također su ispitali razinu  $\alpha 2$  molekule, a uz to i  $\alpha 3$  i  $\beta 1$  molekule na stanicama kolorektalnog karcinoma, no niti jedna od navedenih molekula nije korelirala s Dukes' ovim stadijem (167). Naprotiv, smanjena ispoljenost  $\alpha 2 \beta 1$  integrina na stanicama karcinoma endometrija udružena je s pozitivnim limfnim čvorovima (136), ista molekula odsutna je na stanicama primarnog karcinoma bubrežnih stanica, a ispoljena na stanicama metastatskog tumora. Slično tome, Bonkhoff i suradnici opisuju povećanu  $\alpha 2$  i  $\alpha 6$  ekspresiju na stanicama metastatskog karcinoma prostate u odnosu na primarni tumor (29). Prema tome, u različitim tumorima ista molekula dovodi se u vezu s različitim statusom limfnih čvorova.

Značajka invazije je probijanje bazalne mebrane, proces koji označava prijelaz *in situ* raka u invazivni tumor. Ta stepenica podrazumijeva adheziju za proteine vanstaničnog matriksa u sastavu bazalne membrane, kao što su kolagen tipa IV i laminin te njihovu razgradnju. Utvrđeno je da stanice invazivnog tumora imaju povišenu razinu receptora za laminin i kolagen tipa IV te povišenu razinu kolagenaze tipa IV (50,138). Slične promjene proteolitičkih i adhezivnih osobina pomažu kretanju tumorskih stanica kroz vanstanični prostor i bazalnu membranu krvnih žila u procesu metastaziranja. Različiti eksperimenti pokazali su da RGD sekvenca aminokiselina koju integrinski receptori prepoznaju na proteinima vanstaničnog matriksa služi kao vodilja za kretanje tumorskih stanica. Npr. sintetski RGD peptidi mogu spriječiti prolazak tumorskih stanica kroz bazalnu membranu *in vitro* (74), a isto se može postići i primjenom monoklonskih protutijela koja prepoznaju  $\beta 1$  podjedinicu integrinskog receptora (222). U modelu *in vivo*, usporedno ubrizgavanje B16 stanica melanoma i RGD peptida spriječilo je stvaranje metastaze u plućima (99). Značajnu ulogu integrinskih receptora za vanstanični matriksu u procesu metastaziranja pokazuju i pokusi s transfekcijom DNK za  $\alpha 2 \beta 1$  molekulu u stanice rabdiosarkoma koje inače ne ispoljavaju tu molekulu. Stanice koje su ispoljavale  $\alpha 2 \beta 1$  receptor snažnije su prijanjale za kolagen i laminin *in vitro* i proizvele znatno više metastatskih kolonija u odnosu na stanice



bez tog receptora (43). Stanice karcinoma dojke koje nisu ispoljavale  $\alpha 6\beta 1$  integrin izgubile su sposobnost prianjanja za lamininski matriks i invazije kroz matriks (189). Slično tome, metastatske stanice karcinoma dojke ispoljavaju veću razinu  $\alpha 3\beta 1$  molekule, a ona je posredovala čvršće prianjanje za fibronektin u limfnom čvoru u odnosu na nemetastatske stanice (203). Na istim stanicama bio je ispoljen i  $\alpha 5\beta 1$ , također fibronektinski receptor, ali on nije posredovao adheziju metastatskih stanica za fibronektin. Naprotiv, stanice humanog melanoma koristile su  $\alpha v\beta 3$  za adheziju za vitronektin u limfnom čvoru (203). Dakle, metastatske stanice koje potječu iz različitih tkiva koriste različite kombinacije integrina i liganda u procesu limfogenog metastaziranja. Iz navedenih opažanja može se zaključiti da je prisustvo integrinskih receptora neophodno za proces migracije tumorskih stanica i metastaziranja. Međutim, neki rezultati upućuju na drugačiji zaključak i povezuju smanjenu ekspresiju integrina sa sposobnošću invazije i metastaziranja. Normalne stanice odlažu proteine vanstaničnog matriksa i prianjaju za njih putem integrinskih receptora. Većina tumorskih stanica, barem u kulturi, ne odlaže matriks ili to čini u znatno manjoj količini (169). Poznato je da je "klasični" fibronektinski receptor  $\alpha 5\beta 1$  neophodan za odlaganje matriksa, a njegova ispoljenost na tumorskim stanicama često je smanjena. Ukoliko se ispoljenost ovog integrina poveća transfekcijom gena, poveća se i odlaganje fibronektina, a stanice postanu manje pokretne, rastu sporije i ne mogu proizvesti tumore nakon injiciranja u potkožje miša (75). Slično tome, transfekcija humane DNK za  $\alpha 5$  i  $\beta 1$  lanac u transformirane stanice ovarija kineskog hrčka smanjuje sposobnost stvaranja tumora i dovodi do smanjene migracije *in vitro* (75), a transformaciju štakorskih stanica onkogenim virusima pratilo je smanjenje razine integrinskih receptora (169). Ovi rezultati upućuju na zaključak da prianjanje tumora za proteine vanstaničnog matriksa ne pridonosi procesu invazije i metastaziranja već ima suprotni učinak. Moguće je da zbog smanjenog odlaganja i prianjanja za matriks stanice postaju "slobodnije" te se mogu nesmetano množiti i kretati.

Dok je  $\alpha 4\beta 1$  molekula na stanicama melanoma (184), K562 eritroleukemije (148) i transformiranim stanicama ovarija hrčka (148) posredovala u stvaranju metastaza, ista molekula spriječila je stvaranje metastaza u T-staničnog limfoma (78).

Iz navedenog proizlazi da, uprkos obilju literaturnih podataka, još uvijek nije moguće povezati određeni uzorak integrinske ekspresije, tj. odnos integrina na tumorskim stanicama i njihovog mikrookliša, s biološkim ponašanjem tumora. Rezultati dobiveni *in vitro* ne moraju uvijek odražavati zbivanja *in vivo*. Metastatska kaskada vrlo je složen proces koji se sastoji od

brojnih stepenica, a u spomenutim istraživanjima često se preskaču pojedine stepenice, što također otežava tumačenje rezultata. Sama činjenica da je neka molekula prisutna na površini tumorske stanice ne mora značiti i da je ona funkcionalno aktivna. Imunohistokemijska metoda, na kojoj se temelji velik broj rezultata, "statična" je metoda, a integrinske molekule podložne su aktivaciji i regulaciji. Sve to otežava razjašnjavanje precizne uloge integrina u biološkom ponašanju tumora.

Usporedbom mitotske aktivnosti tumora i intenziteta florescencije pozitivnih stanica pokazali smo da veću razinu ekspresije  $\beta 1$  integrina prati i veća mitotska aktivnost tumora. Poznato je da je zauzeće integrinskog receptora povezano s odašiljanjem signala koji kontroliraju lokalne citoplazmatske procese, ali mogu utjecati i na rast regulacijom staničnog ciklusa (86,101,111). Brojne činjenice upućuju na povezanost signala koji nastaju zauzećem integrinskog receptora s putevima koji reguliraju staničnu proliferaciju (12,46,86). Adhezija fibroblasta za fibronektin dovodi do aktivacije ras/MAP kinaze, koja se inače aktivira čimbenicima rasta. Kinaza FAK, koja je udružena sa žarišnim adhezijskim proteinima, povezana je preko posrednika s ras porodicom proteina, što predstavlja vezu između stanične adhezije i dobro poznatih puteva mitogeneze. Brojni eksperimentalni podaci podupiru ova saznanja. Utvrđeno je da citoplazmatska domena  $\beta 1$  integrina sudjeluje u kontroli stanične proliferacije. Selektivna ekspresija  $\beta 1$  pojačava proliferaciju transficiranih CHO tumorskih stanica, ovisnu o fibronektinu, za razliku od kimerne forme koja sadrži i  $\beta 5$  citoplazmatsku domenu (163). Citoplazmatska domena  $\beta 6$  utječe na pojačanu sintezu DNK i proliferaciju stanica karcinoma kolona (2). Suprotno tome,  $\beta 1c$ , forma integrina koja nastaje metodom izmjeničnog isijecanja, inhibira sintezu DNK i proliferaciju stanice (153). Izgleda da se kontrolom ekspresije citoplazmatskih domena različitih integrinskih varijanti može utjecati na staničnu proliferaciju. Utvrđeno je da stanice humanog karcinoma želuca prijanjaju za kolagen i nakon toga izlaze iz G0/1 faze staničnog ciklusa i ulaze u S fazu, što je posredovano  $\alpha 2\beta 1$  molekulom (212). U odsustvu adhezije za fibronektin  $\alpha 5\beta 1$  molekula odašilje signale koji smanjuju proliferaciju, a zauzeće receptora s fibronektinom obnavlja signal i doprinosi diobi stanice (214). Povezanost adhezije s rastom stanice oslikava i uloga čimbenika rasta nalik na inzulin (IGF) u migraciji stanica karcinoma dojke (52). Čimbenik rasta potiče kretanje stanica preko svog receptora, a za to je neophodna adhezija stanica za vitronektin i kolagen preko  $\alpha v\beta 5$  i  $\alpha 2\beta 1$  integrina.

U radu smo analizirali i 10 medularnih karcinoma, 10 lobularnih te 5 mucinoznih.

Medularni karcinomi u pravilu pokazuju citoplazmatsko bojenje, dok je membransko bojenje rjeđe prisutno i tada samo u obliku bojenja slabog intenziteta na maloj proporciji stanica. Rezultati protočne citometrije, koji su obuhvatili samo 4 medularna karcinoma, pokazuju ispoljenost  $\beta 1$  integrina, ali je intenzitet florescencije većinom nizak, što je u skladu s rezultatima dobivenim pomoću imunohistokemije. U literaturi nema podataka o ekspresiji  $\beta 1$  integrina na stanicama medularnog karcinoma. S obzirom na prisustvo  $\beta 1$  integrina u citoplazmi tumorskih stanica, a slabu ispoljenost ili odsustvo na površini stanične membrane, bilo bi zanimljivo istražiti koji je mehanizam izostanka pridruživanja  $\beta 1$  molekule staničnoj membrani te da li se ono može dovesti u vezu s biološkim ponašanjem tumora.

Analizirali smo i 5 mucinoznih karcinoma koji su u pravilu pokazivali membransko bojenje, često vrlo snažnog intenziteta, što je potvrđeno i metodom protočne citometrije. Snažnu ispoljenost  $\beta 1$  integrina na stanicama mucinoznog karcinoma opisuju i drugi autori (79,126,152). Koukoulis i suradnici (126) opisali su povećanu ispoljenost  $\beta 1$  integrina u mucinoznih karcinoma u odnosu na normalno tkivo dojke. Osim  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  podjedinice koje su bile snažno ispoljene u području međustaničnih spojeva, opisali su i prisustvo  $\alpha 5\beta 1$  receptora za fibronektin na periferiji tumorskih otočića. Inače, postoje neslaganja glede ispoljenosti ovog receptora na epitelnim stanicama normalnog parenhima dojke. Dok neki autori opisuju ekspresiju  $\alpha 5\beta 1$  receptora na epitelnim stanicama, iako ponekad slabog intenziteta i u vidu citoplazmatskog bojenja (49,225), drugi to negiraju i opisuju ispoljenost ove molekule isključivo na stromalnim i endotelnim stanicama (126,152). Pored prethodno spomenutih, na stanicama mucinoznog karcinoma opisana je i snažna ekspresija  $\alpha v\beta 1$  integrina, receptora za vitronektin. Izostalo je jedino bojenje sa protutijelima koja prepoznaju lamininske receptore ( $\alpha 1$  i  $\alpha 6$ ), što je u skladu s potpunim odsustvom laminina u stromi mucinoznog karcinoma (79). Stanice koloidnog karcinoma plivaju u jezerima sluzi koja vjerojatno ne sadrže ligande za receptore ispoljene na tumorskim stanicama. Stoga se može pretpostaviti da integrini ne služe kao receptori za vanstanični matriks, već posreduju međustaničnu adheziju, kao što se pretpostavlja i za stanice epidermisa (40). Ovu pretpostavku podupire snažno bojenje duž cijele membrane u području staničnih kontakata, što vjerojatno odražava selekciju subpopulacije tumorskih stanica koje imaju snažne adhezivne osobine posredovane ovim integrinskim receptorima.

Ekspresija  $\beta 1$  integrina u lobularnim karcinomima je varijabilna. Opisana je ekspresija  $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$  te  $\alpha v$  molekule u dijelu tumorskih stanica u području razgranatih citoplazmatskih



nastavaka te nešto izraženija ispoljenost  $\beta 1$  molekule iste lokalizacije, dok mali broj stanica ispoljava i  $\alpha 3$  molekulu, ali ne u području citoplazmatskih nastavaka već oko jezgre (79,126). Autori pretpostavljaju da lokalizacija integrina u citoplazmatskim izdancima, tj. pseudopodijama, odražava pojačanu sintezu integrinskih receptora koji mogu povećati sposobnost vezivanja i invazije tumorskih stanica kroz stromu. Rezultati nekih istraživanja pokazuju da su citoplazmatski izdanci, nazvani pseudopodije, značajna osobina stanica koje se aktivno kreću *in vitro* i tumorskih stanica u procesu invazije *in vivo* (85). U stanicama linije MDA 435 humanog karcinoma dojke, razvoj pseudopodija izazvan je tzv. autokrinim čimbenikom motiliteta i autori su pretpostavili da ti citoplazmatske nastavci mogu služiti kao "osjetilni organi" za stanično gibanje (85).

Prema tome, pored razlika u ispoljenosti integrinskog receptora među tumorima unutar skupine duktalnih NOS karcinoma, postoje i razlike između pojedinih histoloških tipova. Da li te razlike mogu pridonijeti različitom biološkom ponašanju koje karakterizira neke histološke tipove, tek treba biti utvrđeno.

Molekula ICAM-1 član je imunoglobulinske obitelji, a njezino prijanjanje uz integrinski ligand LFA-1 jedinstveno je po tome što predstavlja vezu između ove dvije obitelji adhezijskih molekula. Vezivanje ICAM-1 za LFA-1 od ključnog je značaja u mnogim imunološkim zbivanjima, uključujući antigen-specifično prepoznavanje limfocitima T i lizu određenih ciljnih stanica (142). Prepoznavanje antigena slijed je usklađenih zbivanja u kojima adhezijske molekule imaju nekoliko uloga. One posreduju prijanjanje između stanica, koje je samo po sebi složeno i mora biti regulirano te doprinose prijenosu signala u limfocitima i stanicama koje limfociti T prepoznaju. Prijanjanje između LFA-1 i ICAM-1 potrebno je za ostvarivanje kontakta, neovisnog o antigenu, između limfocita T i potencijalne ciljne ili stimulatorne stanice. Prijanjanje neovisno o antigenu važno je za prevladavanje odbojnih sila među stanicama te za tijesno približavanje staničnih membrana. Time se omogućuje ostvarivanje veze limfocitnog receptora s molekulom MHC razreda I i antigenom, koji je često prisutan u niskoj koncentraciji na staničnoj membrani. Snaga i priroda početne adhezije ovise o brojnim čimbenicima kao što su stanje aktivacije limfocita T i površinske molekule na stanici s kojom limfocit T dolazi u kontakt. Odašiljanje signala moguće je samo ako je dovoljan broj receptora na limfocitima T zauzet s antigenom. Veza između specifičnog antigena i receptora na limfocitima T neophodna je, ali ne i dovoljna za aktivaciju limfocita.

Za poticanje proliferacije limfocita i efektorskih funkcija potrebni su dodatni podražaji, posebice u slučaju niske koncentracije antigena. Dodatne podražaje stvaraju iste molekule koje posreduju i adheziju među stanicama, kao što su molekule CD2 i LFA-3 te LFA-1 i ICAM-1. Ti podražaji djeluju sinergistički s onim koje stvara molekula CD3. Nakon početnog prijanjanja koje rezultira prepoznavanjem antigena i aktivacijom limfocita, slijede zbivanja koja zahtijevaju snažnu adheziju među stanicama, a nju posreduju iste molekule. Razlika je samo u aktivnoj regulaciji adhezije. Prepoznavanje antigena prolazno pojačava adheziju posredovanu s LFA-1, a nakon toga adhezija je regulirana povećanom razinom receptora na limfocitima T i njihovih liganda. Molekula ICAM-1 naročito je podložna regulaciji, njezina razina mijenja se tijekom aktivacije, diferencijacije, transformacije stanice te pod djelovanjem citokina. Primjerice, nakon prijanjanja za fibrinektin, povećava se ekspresija ICAM-1 na monocitima, što poboljšava predstavljanje antigena limfocitima T. S tim u svezi značajna su istraživanja *in vivo* koja pokazuju da se ispoljenost ICAM-1 može potaknuti ili pojačati u različitim tkivima tijekom upale. Opisana je i povezanost limfocitnih infiltrata i pojačane ispoljenosti ICAM-1 u biopsijama bolesnika s psorijazom, atopičnim dermatitisom, kožnim limfomima, autoimunim tireoiditisom, rakom te reumatoidnim i upalnim osteoartritisom (17,18,54,90,102,217,220).

Adhezija neovisna o antigenu, kao početno zbivanje u prepoznavanju limfocitima T ima značajnu ulogu u imunološkom nadzoru nad stanicama zaraženim virusom ili tumorskim stanicama. Primjerice, opisana je adhezija između limfocita T i tumorskih stanica u obliku "rozetiranja" limfocita T oko Reed-Sternbergovih stanica Hodgkinovog limfoma, a posredovana je uglavnom interakcijama između molekule CD2 i LFA3 te LFA-1 i ICAM-1 (26). Prema tome, smanjena ekspresija adhezijskih molekula na tumorskim stanicama može pridonijeti izbjegavanju imunološkog nadzora. Stanice Burkittovog limfoma često ispoljavaju vrlo nisku razinu LFA-1, LFA-3 i ICAM-1, ali stječu visoku razinu nakon brojnih pasaža u kulturi (81). Stanice prije pasaže često su otporne na ubijanje posredovano citotoksičnim limfocitima T specifičnim za Epstein-Barrov virus, ali nakon povećanja razine adhezijskih molekula, posebice LFA-3, osjetljivost im se povećava.

S obzirom na pretpostavljeni značaj ovih adhezijskih molekula u imunološkom nadzoru nad tumorskim stanicama, željeli smo istražiti njihovo prisustvo u tkivu invazivnog raka dojke. Naši rezultati pokazuju da je molekula ICAM-1 često ispoljena na tumorskim

stanicama, ali ne i na epitelnim stanicama kanalića i acinusa u normalnom tkivu dojke. Samo ponekad može se uočiti bojenje uz luminalni pol stanica u acinusima dojke, a nalazi se i na endotelnim stanicama, stromalnim fibroblastima te ponekad na limfocitima. U 24 duktalnih NOS karcinoma, od ukupno 67 ispitivanih metodom imunohistokemije, tumorske stanice nisu ispoljavale ICAM-1, a u preostalim tumorima ona je ispoljena u različitoj mjeri. Metodom protočne citometrije utvrdili smo da se ICAM-1 nalazi na stanicama većeg broja tumora, ali razina ekspresije većinom je niska. U 42% tumora pozitivno je više od 90% stanica. Ekspresija ICAM-1 opisana je u različitim tumorima mezenhimalnog i epitelnog porijekla: limfomima (102,217), melanomima (8,33,108,157), angisarkomu (217), pločastim karcinomima (217), karcinomima želuca (127,150,217), pankreasa (187), dojke (17,213,217), crijeva (128,213), mokraćnog mjehura (103,209), pluća (213), ovarija (213,217) i bubrega (213). Istodobno, molekulu ICAM-1 nije bilo moguće prikazati na normalnim stanicama tkiva iz kojih ti tumori potječu, osim na bazalnim stanicama u tkivu fibroadenoma dojke te u bazalnom sloju bronhiola u bolesnika s tuberkulozom pluća (217). Na nekim staničnim tumorskim linijama ICAM-1 bio je konstitutivno ispoljen, a na drugima tek nakon indukcije s citokinima (8,127,128,187). Većina autora opisuje povećanje ekspresije ICAM-1 nakon izlaganja citokinima kao što su  $\gamma$ IFN, TNF- $\alpha$  ili IL-1 $\beta$  (8,157,187,209,213), premda je osjetljivost pojedinih tumorskih linija različita. Logično je očekivati da limfociti, pokušavajući odbaciti tumorske stanice, bivaju aktivirani i luče velike količine citokina. Navedene citokine koji podižu razinu ICAM-1 luče limfociti T (pomoćnički i citotoksički) i stanice NK (stanice prirodne ubice).

Naši rezultati pokazali su značajno veću ispoljenost molekule ICAM-1 u tumorima s većom limfocitnom infiltracijom. U literaturi se često navodi udruženost ekspresije ICAM-1 i limfocitnih infiltrata (17,209). U radu Vogetsedera i suradnika (217) ICAM-1 bio je ispoljen na rijetkim tumorskim stanicama, ali su fibroblasti u stromi oko tumorskih stanica snažno ispoljavali ovu molekulu, za razliku od strome u normalnom tkivu. Snažno bojenje stromalnih stanica koreliralo je s limfocitnom infiltracijom. Autori su pretpostavili da su uzrok tome citokini što ih luče pomoćnički limfociti T i na taj način potiču ekspresiju ICAM-1.

Rezultati protočne citometrije pokazali su da je na stanicama velikih tumora (>2cm) razina molekule ICAM-1 veća nego na stanicama malih tumora. Koyama i suradnici (127) opisali su ekspresiju ICAM-1 na stanicama primarnih tumora želuca, ali ne u svim, već samo



u velikim tumorima. Istodobno, veliki tumori sadržavali su i više limfocitnih infiltrata pa su autori zaključili da se povezanost ICAM-1 i veličine tumora može objasniti prisustvom limfocita, odnosno citokina. Isti autori opisali su vezu ispoljenosti ICAM-1 s metastaziranjem. Naime, dok je samo mali broj primarnih tumora želuca ispoljavao nisku razinu ICAM-1, svi metastatski tumori dobiveni iz ascitesa bolesnika pokazivali su visoku razinu ekspresije ICAM-1 (127). Mayer i suradnici ispitivali su ekspresiju ICAM-1 na karcinomima želuca i uočili je na 38% primarnih tumora, no isto su našli i na metastatskim tumorima (150). Naši rezultati nisu pokazali udruženost ICAM-1 molekule na stanicama primarnog raka dojke sa pozitivnim limfnim čvorovima, niti razliku u razini ekspresije ICAM-1 na stanicama primarnog tumora u odnosu na stanice tumora u metastazi limfnog čvora. Veća ispoljenost ICAM-1 na stanicama metastatskog tumora može odražavati selekciju subpopulacije tumorskih stanica koje konstitutivno ispoljavaju ICAM-1 ili indukciju citokinima koje luče limfociti i makrofagi koji su prisutni u znatnoj količini u peritonealnom ispirku bolesnika s metastatskim rakom želuca. Povezanost ICAM-1 s metastaziranjem opisali su i Natali i suradnici (157). ICAM-1 ispoljen je na dermalnim nevusima, ali znatno više na melanomima, posebice na stanicama metastatskog tumora. Osim toga, ekspresija ICAM-1 povezana je s debljinom tumora i kliničkim tijekom bolesti. Veći tumori pokazivali su značajno veću ekspresiju ICAM-1, a razdoblje bez bolesti je bilo značajno duže u bolesnika s ICAM-1 negativnim tumorima. Do sličnog rezultata došao je Johnson uspoređujući razinu ekspresije ICAM-1 na stanicama nevusa i različito uznapredovalih melanoma (108). Nevusi i melanomi čija je dubina invazije manja od 0,75 mm pokazivali su sličnu razinu ekspresije ICAM-1, dok su tumori veći od 0,76 mm ispoljavali značajno višu razinu ICAM-1. S obzirom da je dubina invazije melanoma mjera progresije i direktno povezana sa sposobnošću metastaziranja, ovi rezultati upućuju na povezanost ICAM-1 s metastaziranjem. Suprotno tome, opisana je važnost ICAM-1 molekule na stanicama melanoma za interakciju s limfocitima (8,33). Tumorske stanice bez molekule ICAM-1 na površini, bile su razmjerno otporne na ubijanje posredovano citotoksičkim limfocitima T. Nakon dodavanja TNF-a stanice su ispoljavale ICAM-1 i postale osjetljive na ubijanje (8). Slične rezultate dobili su i drugi autori (8,213). Pomoću monoklonskog protutijela protiv ICAM-1 djelomično se može inhibirati liza melanomskih stanica koja je posredovana stanicama NK, stanicama LAK te autolognim limfocitima izoliranim iz tumora (8). Povećanjem ekspresije ICAM-1 stanice melanoma

postaju osjetljivije i na lizu posredovanu monocitima (219), a citokini tome doprinose na dvojak način: povećanjem ekspresije ICAM-1 na tumorskim stanicama i aktivacijom monocita čime se pospješuje njihova citolitička aktivnost. Vanky i suradnici pokazali su da dolaze tumorskih stanica samo ako one istodobno ispoljavaju i ICAM-1 i molekulu MHC razreda I (213). S obzirom na to očekivalo bi se da molekula ICAM-1 ima zaštitnu ulogu, odnosno pridonosi obrambenoj reakciji stanica imunološkog sustava, što proturiječi rezultatima koji pokazuju povezanost ove molekule s procesom metastaziranja. Moguće je da molekula ICAM-1 na tumorskim stanicama prijanjanjem uz LFA-1 na limfocitima pridonosi gubitku homotipične adhezije među samim tumorskim stanicama te, vezivanjem uz migratorne limfocite omogućuje odvajanje tumorskih stanica od glavne tumorske mase i kretanje u smjeru kretanja limfocita, što može pridonijeti stvaranju metastaze. Dakle, nije jasno da li povećana ekspresija ICAM-1 više "koristi" domaćinu ili tumoru, a s obzirom na to da primjena citokina danas zauzima značajno mjesto u imunoterapiji tumora, razjašnjavanje biološke uloge molekule ICAM-1 od velikog je praktičnog značaja.

Molekula ICAM-1 ne nalazi se samo na površini tumorskih stanica, već se može naći i u otopljenom obliku u serumu. U bolesnika koji boluju od tumora, razina topivog ICAM-1 često je povišena u odnosu na kontrolnu skupinu (117,191) a isto tako i u bolesnika u aktivnoj fazi bolesti u odnosu na one u kojih je bolest u stanju mirovanja (117,181). Bolesnici s hepatocelularnim rakom u kojih je razina serumskog ICAM-1 bila visoka živjeli su kraće nego bolesnici s niskom razinom (191). Brojni autori ukazuju na loš prognostički značaj serumskog ICAM-1 (45,117,181,187). Topivi ICAM-1, pročišćen iz seruma bolesnika s melanomom inhibirao je lizu tumorskih stanica posredovanu stanicama NK (8). Vezivanje topivog ICAM-1 za molekulu LFA-1 na limfocitima i monocitima vjerojatno onemogućuje njihovo vezivanje za tumorske stanice pa tako topivi ICAM-1 može sudjelovati u izbjegavanju imunološkog nadzora nad tumorskim stanicama.

Protočnom citometrijom utvrdili smo povezanost ispoljenosti molekule ICAM-1 sa stupnjem diferencijacije tumorskih stanica i mitotskom aktivnošću. Tumori s većom mitotskom aktivnošću ispoljavaju višu razinu molekule ICAM-1. U literaturi je malo podataka o vezi između ispoljenosti molekule ICAM-1 i proliferacijske aktivnosti tumorskih stanica. Iako je ICAM-1 općenito snažnije ispoljen na aktiviranim stanicama, rezultati nekih autora ne ukazuju na njegovu povezanost s proliferacijom (186,217). S tim u svezi zanimljivo je

zapažanje da karcinom bubrežnih stanica ispoljava receptore za IL-4 visokog afiniteta i molekulu ICAM-1. Dodavanjem interleukina 4 značajno se povećava razina ICAM-1 na tumorskim stanicama, ali to ne utječe na lizu posredovanu stanicama LAK (160).

Stanice slabo diferenciranih tumora dojke u našem istraživanju imale su značajno višu razinu molekule ICAM-1 nego stanice umjereno i dobro diferenciranih tumora. Ova razlika uočena je samo u velikim tumorima, ali ne i u tumorima promjera manjeg od 2 cm. Literaturni podaci glede povezanosti ekspresije ICAM-1 i diferenciranosti tumora su oskudni. Dobro diferencirani karcinomi želuca ispoljavali su molekulu ICAM-1 za razliku od slabo diferenciranih (150). Suprotno tome, u karcinomu mokraćnog mjehura ekspresija ICAM-1 bila je ograničena na umjereno i slabo diferencirane tumore (103).

U našim ispitivanjima utvrdili smo i razliku u ekspresiji ICAM-1 između dukalnog NOS karcinoma i medularnog karcinoma. Stanice medularnih karcinoma ispoljavaju značajno višu razinu molekule ICAM-1. U radu Bacusa i suradnika svi medularni karcinomi ispoljavali su ICAM-1, a također i molekulu LFA-1 (17). Autori raspravljaju moguću zaštitnu ulogu povećane ekspresije ICAM-1 i obilnih limfocitnih infiltrata i povezuju ih s razmjerno dobrom prognozom kod ovog histološkog tipa raka dojke. No, isti autori pokazali su da su limfociti infiltrati u tkivu medularnog karcinoma pomoćničkog, a ne citotoksičkog fenotipa, što može objasniti ispoljenost ICAM-1 na površini tumorskih stanica, ali ne i povezanost s dobrom prognozom. S tim u svezi zanimljiv je nalaz ekspresije ICAM-1 na stanicama seminoma, tumora u kojeg se gusta limfocitna infiltracija također dovodi u vezu s relativnom dobrom prognozom ovog tipa raka testisa. ICAM-1 bio je ispoljen na tumorskim stanicama u različitoj mjeri, ali ispoljenost nije korelirala s limfocitnim infiltratima (208).

Dakle, dosadašnja saznanja ne omogućuju precizno razjašnjavanje uloge molekule ICAM-1 u biološkom ponašanju tumora. Naši rezultati pokazali su povezanost ekspresije ICAM-1 s limfocitnim infiltratima te snažniju ekspresiju na medularnim karcinomima u odnosu na druge histološke tipove, što bi moglo upućivati na značaj ove molekule u obrambenoj reakciji protiv tumora posredovanoj limfocitima i makrofagima. Istodobno, ekspresija ICAM-1 bila je značajno veća na stanicama velikih tumora, tumora s visokom mitotskom aktivnošću te slabo diferenciranih tumora, dakle, udružena s pokazateljima loše prognoze. Literaturni podaci također većinom povezuju ispoljenost ICAM-1 s lošom



prognozom, mada su mehanizmi koji određuju ispoljenost i ulogu ove molekule u biološkom ponašanju tumora još uvijek nejasni.

Molekula LFA-3 membranski je glikoprotein koji se nalazi na brojnim tkivima epitelnog i mezenhimalnog porijekla (124,142). Vezujući se za molekulu CD2, omogućuje prijanjanje stanica uz limfocite T i osigurava signal za aktivaciju limfocita (142,162,194). Gubitak molekule LFA-3, primijećen na stanicama nekih tumora, mogao bi pridonijeti izbjegavanju imunološkog nadzora, odnosno onemogućiti djelotvorne interakcije između tumorskih stanica i citotoksičkih limfocita T. Stoga smo željeli istražiti prisustvo molekule LFA-3 na stanicama invazivnog raka dojke i njegovu povezanost s pognostičkim pokazateljima.

Metodom protočne citometrije analizirali smo 31 karcinom dojke, od kojih je 26 duktalnih NOS karcinoma, 2 medularna, jedan lobularni i jedan mucinozni. Rezultati su pokazali raznolikost tumora s obzirom na ispoljenost molekule LFA-3. U 11 tumora (35,5%) molekula LFA-3 očuvana je na površini tumorskih stanica, u 29% tumora ekspresija je smanjena, ali ipak očuvana na većini tumorskih stanica (50-90% stanica). U 13% tumora pozitivno je manje od 50% stanica, a u 15,5% tumorske stanice većinom su negativne. Ispitivanjem razine ispoljenosti LFA-3 na stanicama duktalnih NOS karcinoma utvrdili smo povezanost između intenziteta fluorescencije pozitivnih stanica i pokazatelja loše prognoze. Intenzitet fluorescencije bio je veći na stanicama velikih tumora, slabije diferenciranih tumora i tumora s prognostičkim indeksom iznad 0,6. Uključivanjem i ostalih histoloških tipova utvrdili smo povezanost s mitotskim indeksom, pri čemu su tumori s velikim mitotskim indeksom pokazivali veću razinu ispoljenosti molekule LFA-3 u odnosu na tumore s malo mitozama. Usporedbom primarnog i metastatskog tumora nismo utvrdili razliku u ekspresiji molekule LFA-3. U dostupnoj literaturi nalazi se malo podataka o ekspresiji LFA-3 molekule na tumorskim stanicama. Opisana je na melanomima (8,185), karcinomima želuca i debelog crijeva (124,150), neuroblastomima (82), glioblastomima (76) i karcinomu bubrežnih stanica (58). Za razliku od molekule ICAM-1 ekspresija LFA-3 nije pod utjecajem citokina (8,185), i ne nalazi se u otopljenom obliku u serumu. Protutijelima koja prepoznaju molekulu LFA-3 može se djelomice spriječiti ubijanje tumorskih stanica posredovano stanicama NK, stanicama LAK i limfocitima iz tumorskog tkiva, čime se potvrđuje uloga ove molekule u imunološkom nadzoru nad tumorskim stanicama (8). Za razliku od adenoma debelog crijeva, u kojih je očuvana ekspresija LFA-3 na tumorskim stanicama, u dijela karcinoma dolazi do gubitka

ekspresije, ali nije utvrđena povezanost s prognostičkim pokazateljima kao što su Dukes'ov stadij ili histološki gradus, a također niti s preživljavanjem (124). Naprotiv, u karcinoma želuca postoji udruženost između ekspresije LFA-3 i pokazatelja loše prognoze. Tumori koji su imali više od 50% pozitivnih stanica većinom su slabo diferencirani, pokazuju invaziju vaskularnih prostora i udruženi su sa smanjenim preživljavanjem. Ekspresija molekule LFA-3 bila je veća na udaljenim metastazama nego na stanicama primarnih tumora i stanicama metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (150). Suprotno tome, ekspresija LFA-3 na stanicama neuroblastoma korelirala je s dobro diferenciranim tumorima u ranom stadiju progresije (82).

Našim ispitivanjem obuhvatili smo razmjerno mali broj uzoraka, a literaturni podaci su oskudni i oprečni. Stoga je očito da je za pravilnu procjenu uloge molekule LFA-3 u biološkom ponašanju tumora potrebno analizirati veći broj tumora različitog porijekla i kliničkog stadija.

Prvi radovi koji opisuju molekulu CD44 datiraju s početka prošlog desetljeća. Ona je prvo otkrivena i opisana na stanicama hematopoetskog sustava i fibroblastima, a različiti autori davali su joj različita imena, ovisno o pretpostavljenoj ulozi. Hughes i suradnici opisali su je na makrofagima i granulocitima i nazvali Pgp-1 (od engl. phagocytic glycoprotein-1) (98). Carter je pronašao molekulu na čovječjim fibroblastima koja prepoznaje fibronektin i kolagene tipa I i IV te je nazvao ECM-III (od engl. extracellular matrix receptor type III) (41). Jalkanen i suradnici opisali su tzv. Hermes protutijela, od kojih jedino (Hermes-3) može spriječiti vezivanje limfocita za venule visokog endotela u sluznicama (106). Uz spomenute molekule, otkrivene su i brojne druge, različitog imena i različite pretpostavljene funkcije, a kad su uspoređena monoklonska protutijela koja se vežu za te molekule, utvrđeno je da se radi o istoj molekuli, koja je potom označena kao CD44.

Kasnije je utvrđeno da ne postoji samo jedan oblik molekule CD44, već obitelj CD44 membranskih glikoproteina, čija se molekularna masa kreće u rasponu od 85-260 kDa. Proteini CD44 postoje u obliku više izoformi koje nastaju izmjeničnim isijecanjem 10 od ukupno 20 egzona unutar gena za molekulu CD44. Najčešća izoforma je standardna ili hematopoetska forma molekule CD44 (CD44s, CD44H) molekularne mase 85-90 kDa. 10 egzona CD44 gena koji se uvijek prepisuju kodiraju standardnu formu molekule CD44, prisutnu na svim tipovima stanica. Preostalih 10 egzona, koji kodiraju vanstanični dio molekule, raznoliko se umeće između egzona 5. i 15. što stvara brojne varijantne oblike

molekule CD44. Raznolikost oblika molekule CD44 nastaje također i različitom N i O glikozilacijom, dodavanjem hondroitin-sulfata i fosforilacijom citoplazmatske domene. Tako nastaje velik broj izoformi, a jedna osnovna molekula dobiva sposobnost obnašanja različitih funkcija. Standardna forma nalazi se na površini većine hematopoetskih stanica (limfociti B i T, monociti, eritrociti i neutrofilii), na fibroblastima i glija stanicama u CNS-u (197). CD44 ispoljen je na svim limfocitima T tijekom ontogeneze, a gustoća molekula na površini stanica ovisi o stadiju diferencijacije. Naročito visoka razina molekule CD44 nalazi se na površini stanica s pamćenjem. Molekula CD44 može regulirati interakcije između molekula CD2 i LFA-3. Vezivanjem za ligand, molekula CD44 na limfocitima i monocitima može regulirati brojna zbivanja koja dovode do aktivacije limfocita T (93). Pored toga, poznata je uloga molekule CD44 u tzv "homingu" limfocita, tj određivanju specifičnosti za određena tkiva tijekom limfocitne recirkulacije. Limfociti i monociti na svom proputovanju iz krvi u periferna tkiva prolaze kroz venule visokog endotela i pri tom koriste molekulu CD44. Jalkanen je pokazao da od 3 Hermes protutijela koja prepoznaju molekulu CD44, samo Hermes 3 sprečava vezivanje limfocita za venule visokog endotela u sluznicama, ali ne i za endotel venula u sonoviji i limfnim čvorovima (104). Dakle, molekula CD44 određuje tkivnu specifičnost vezivanja limfocita za endotel i tako utječe na karakteristike lokalnog imunološkog odgovora. Mogući mehanizmi su različita glikozilacija CD44 molekule na limfocitima koji su određeni za infiltraciju sluznica, odnosno limfnih čvorova ili ispoljavanje strukturno sličnih varijanti molekule CD44 na različitim populacijama limfocita (93).

Epitelne stanice ispoljavaju standardnu formu molekule CD44 te varijantne izoforme koje sadrže produkte egzona 8,9 i 10. Molekule CD44 koje sadrže produkte egzona 3 do 10 nalaze se pretežno na stanicama pločastog epitela, npr. u koži i jednjaku (68,206). Iako je uvriježeno mišljenje da se na tkivima mezenhimalnog porijekla nalazi samo standardni oblik molekule CD44, na aktiviranim limfocitima nakon antigenske stimulacije opisana je prolazna ekspresija i varijantnih, odnosno tzv. epitelnih izoformi (10).

Iako su CD44v izoforme prisutne na brojnim vrstama epitela, ekspresija ovih molekula na tumorskim stanicama često je prekomjerna i neodgovarajuća, budući da se ispoljene izoforme ne mogu naći na normalnim epitelnim stanicama od kojih tumori potječu. Rezultati brojnih eksperimenata pokazuju da transficirane tumorske stanice koje prekomjerno ispoljavaju određene CD44 izoforme imaju veću sposobnost metastaziranja, a kliničkopatološke studije potvrđuju poveznost ekspresije CD44 s progresijom bolesti (107,120,149,155).



Stoga smo željeli ispitati prisustvo molekule CD44 u normalnom tkivu dojke te na stanicama raka dojke i utvrditi da li postoji povezanost ove molekule s prognostičkim pokazateljima. Koristili smo protutijelo koje prepoznaje standardni oblik CD44 molekule (CD44H).

Molekula CD44 ispoljena je na kanalićima i acinusima dojke, ponekad samo u perifernom dijelu kanalića koji odgovara mioepitelnom sloju, a ponekad i na luminalnim stanicama u vidu kontinuiranog membranskog bojenja. Endotelne stanice većinom su pozitivne, a najsnažnija ispoljenost nalazi se na membranama limfocita i histiocita u stromi tumora, što smo koristili za pozitivnu kontrolu u tumorima koji su bili negativni.

Od 63 duktalna NOS karcinoma ispitivanih metodom imunohistokemije, molekula CD44 bila je ispoljena u 36 tumora (57%), dok je 27 tumora (43%) bilo negativno. U tumorima koje smo označili kao negativne, ponekad smo zapazili samo manja žarišta pozitivnih stanica ili bojenje periferije tumorskih otočića, što je bilo teško razlučiti od bojenja fibroblasta u stromi oko tumorskih otočića. Među tumorima koji su ispoljavali molekulu CD44, razlikuju se oni u kojih su u približno jednakoj mjeri zastupljene i negativne stanice (22 tumora, 35%) od tumora u kojih je većina tumorskih stanica pozitivna (14 tumora, 22%). Rezultatima protočne citometrije potvrdili smo raznolikost tumora s obzirom na ekspresiju molekule CD44. U 26,7% tumora od 45 ispitivanih, molekula CD44 nalazi se na preko 90% tumorskih stanica uz veliku raznolikost u intenzitetu fluorescencije pozitivnih stanica. U 9% tumora stanice su negativne, odnosno nalazi se manje od 10% pozitivnih stanica, a u preostalih 65% tumora molekula CD44 prisutna je na različitoj proporciji tumorskih stanica i uz različiti intenzitet fluorescencije. Rezultati imunohistokemije nisu pokazali udruženost molekule CD44 s prognostičkim pokazateljima. Temeljem rezultata protočne citometrije utvrdili smo udruženost intenziteta fluorescencije pozitivnih stanica i mitotske aktivnosti. Tumori s većim mitotskim indeksom imali su višu razinu molekule CD44 molekule na površini tumorskih stanica nego tumori s niskom mitotskom aktivnošću. Pored toga stanice metastatskih tumora, dobivenih iz pazušnih limfnih čvorova, ispoljavale su višu razinu molekule CD44 nego stanice primarnih tumora. Budući da je epitop koji prepoznaje CD44H protutijelo prisutan i na varijantnim izoformama, bojenje pozitivnih stanica označava nam prisustvo neke od brojnih CD44 formi, ali ne možemo znati da li su one iste na normalnim strukturama i tumorskim stanicama, odnosno da li su tumori koji pokazuju određeno biološko ponašanje udruženi s određenim izoformama molekule CD44.

Rezultati Joensuu i suradnika podudaraju se s našima glede ispoljenosti CD44H molekule na stanicama invazivnog raka dojke (107). Proporcije pozitivnih tumora te negativnih i onih s heterogenim uzorkom ekspresije CD44 podudaraju se s našim rezultatima. Oni također opisuju udruženost ekspresije CD44 s mitotskom aktivnošću. Naime, tumori koji su sadržavali više od 50% pozitivnih stanica imali su veću mitotsku aktivnost, a uz to češće su bili slabo diferencirani i negativnog statusa estrogenih receptora. Ekspresija molekule CD44 nije pokazivala vezu s preživljavanjem, ali tumori u kojih su limfni čvorovi bili pozitivni i koji su sadržavali više od 50% pozitivnih stanica imali su lošu prognozu, odnosno u ove skupine bolesnica preživljavanje je bilo kraće. Kaufmann i suradnici ispitivali su ekspresiju CD44 na primarnim karcinomima dojke i metastatskim tumorima pomoću protutijela koja prepoznaju epitope kodirane varijantnim egzonima v3, v5 i v6 (120). Za razliku od epitela normalnog tkiva dojke, epitopi v3, v5 i v6 ispoljeni su na većini tumora, v6 bio je prisutan na 84% primarnih tumora i 100% metastaza u pazušnim limfnim čvorovima. Ekspresija epitopa v6 korelirala je s preživljavanjem. Bolesnice s višom ekspresijom epitopa v6 molekule CD44 i pozitivnim limfnim čvorovima živjele su kraće u odnosu na one s nižom razinom v6 i pozitivnim limfnim čvorovima, dok su bolesnice s negativnim limfnim čvorovima bile većinom žive bez obzira na ekspresiju v6, što znači da je za ovu skupinu žena potreban duži period praćenja. Rezultati Friedrichsa i suradnika, koji su također ispitivali ekspresiju izoformi CD44 u raku dojke, donekle se razlikuju od prethodnih (218). Ovi autori, a također i drugi, opisuju ispoljenost izoforme v6 i na mioepitelnim stanicama te luminalnim stanicama kanalića dojke (218), što znači da ekspresija varijantnih izoformi nije ograničena samo na zloćudne tumore. Njihovo istraživanje, koje se temelji na većoj grupi ispitanica i s dužim razdobljem praćenja, nije potvrdilo udruženost ekspresije v6 i preživljavanja. U istraživanju Matsumure i suradnika svi uzorci karcinoma dojke prekomjerno su ispoljavali brojne produkte CD44 gena u odnosu na normalno tkivo dojke. Isto tako pokazali su razlike u ekspresiji CD44 između lokalno invazivnih tumora bez metastaze i metastatskih tumora (147). Slične rezultate autori su dobili i na karcinomima kolona, a oni se podudaraju s rezultatima Heidera i suradnika (94). Dok je ispoljenost varijantnih epitopa u tankom i debelom crijevu ograničena na bazu kripte i vrlo slabog intenziteta, u karcinoma je primijećena difuzna ekspresija srednjeg do snažnog intenziteta (94). U adenomima ispoljenost CD44v je žarišna i ograničena na područja s displazijom epitela. Mulder je opisao raznoliku rasprostranjenost epitopa v6 na stanicama kolorektalnog raka i udruženost ekspresije v6 s lošom prognozom (155). On smatra da je v6 nezavisan prognostički pokazatelj koji može

pomoći pri odabiru bolesnika za adjuvantnu kemoterapiju, u kojih postoji velika vjerojatnost nastanka metastaza. Neki autori negiraju značaj ekspresije CD44v6 kao nezavisnog prognostičkog pokazatelja i smatraju da on ovisi o stadiju (87,122).

Približno polovica primarnih karcinoma želuca ispoljava molekulu CD44, a ekspresija je udružena s prisustvom metastaza u vrijeme dijagnoze. Naime, u bolesnika u uznapredovalom kliničkom stadiju tumori su češće CD44 pozitivni, a preživljenje kraće (149).

U bolesnika s non-Hodgkin limfomom povećana ekspresija molekule CD44 pokazuje snažnu povezanost s lošom prognozom (105,161).

Ekspresija molekule CD44 istraživana je i na karcinomima bubrežnih stanica (205). U tkivu normalnog bubrega molekula CD44s prisutna je na endotelu glomerula, dok epitelne stanice kanalića ne ispoljavaju standardnu formu molekule CD44 niti varijantne izoforme. Karcinomi bubrežnih stanica raznoliko ispoljavaju molekulu CD44, ovisno o stupnju diferencijacije tumorskih stanica. U dobro diferenciranih karcinoma svijetlih stanica nema razlike u ekspresiji molekule CD44 u odnosu na normalno tkivo bubrega, a slabo diferencirani karcinomi snažno ispoljavaju CD44s i razne varijantne forme ove molekule. S obzirom da dobro diferencirani tumori rijetko metastaziraju (u 2% slučajeva), za razliku od slabo diferenciranih, autori raspravljaju moguću povezanost ekspresije molekule CD44 sa sposobnošću invazije bubrežne vene i hematogenog metastaziranja. Kromofobni karcinomi, porijeklom iz epitela distalnih kanalića ispoljavali su molekulu CD44 neovisno o gradusu, a onkocitomi, benigni tumori porijeklom iz istih stanica, bili su potpuno negativni. Isti autori pokazali su da tijekom embriogeneze epitel Wolffovih ili paramezonefričkih kanalića iz kojih će se razviti sabirni kanalići bubrega, ispoljava CD44s i varijantne izoforme, a tijekom diferencijacije u specijalizirani epitel sabirnih kanalića, dolazi do gubitka ove molekule. Ponovno ispoljavanje ovih molekula nakon zloćudne transformacije epitela može odražavati embrionalni, dediferencirani fenotip. Tijekom embriogeneze stanice su pokretne, imaju sposobnost invazije i ispoljavaju mnoge osobine metastatskih stanica, kao što je, primjerice, visoka razina proteaza i adhezijskih molekula (175). Dobročudni onkocitomi, koji također nastaju iz epitela sabirnih kanalića, ne ispoljavaju molekulu CD44, što može odražavati njihovu nesposobnost invazije i metastaziranja.

Većina spomenutih rezultata, temeljena na kliničkopatološkim istraživanjima, povezuje povećanu ekspresiju molekule CD44 s pokazateljima loše prognoze i procesom metastaziranja. Ulogu varijantnih izoformi u procesu metastaziranja potvrđuju i brojni rezultati dobiveni na eksperimentalnim životinjama. Prvi su je navijestili Gunthert i suradnici,



a upravo njihov rezultat pobudio je interes istraživača za molekulu CD44 i potaknuo slijedeća istraživanja. Autori su pokazali da se metastatske stanice adenokarcinoma pankreasa i dojke u štakora razlikuju od stanica koje nemaju sposobnost metastaziranja u ekspresiji izoforme v6 molekule CD44 (87). Stanice koje nemaju sposobnost metastaziranja, nakon transfekcije gena za izoformu v6, stječu sposobnost metastaziranja, a protutijela koja prepoznaju molekulu v6 mogu spriječiti proces metastaziranja. Slično tome, protutijelo koje prepoznaje molekulu CD44 spriječilo je rast i metastaziranje stanica melanoma u imunodeficientnih miševa (89). U odsustvu molekule CD44 stanice melanoma su rasle, ali nisu metastazirale. S tim u svezi treba spomenuti ulogu hijaluronske kiseline koja predstavlja glavni ligand za molekulu CD44. Hijaluronska kiselina značajna je sastavnica vanstaničnog prostora koja ima važnu ulogu u brojnim normalnim i patološkim staničnim zbivanjima. Povezana je s procesima adhezije, agregacije, upale, utječe na proliferaciju i migraciju stanica tijekom embriogeneze (42,120). Visoke koncentracije hijaluronana povećavajući osmotski tlak dovode do hidriranja vanstaničnog prostora. Pretpostavlja se da tako ekspaniran i deformiran vanstanični prostor bogat vodom olakšava kretanje stanica. Uz to, hijaluronska kiselina može uzrokovati odvajanje stanice od matriksa, što olakšava proliferaciju stanica. Dakle, hijaluronska kiselina mogla bi utjecati na procese proliferacije i invazije tumora, a preko staničnih receptora za hijaluronan direktno posredovati u procesu migracije tumorskih stanica. Poznato je da brojni tumori epitelnog i mezenhimalnog porijekla sadrže obilje hijaluronana u odnosu na tkiva iz kojih su potekli (42,119,120,218,223). Invazivni V2 karcinomi sadrže 3-4 puta više hijaluronana nego neinvazivni (210). Metastatski melanomi luče veće količine hijaluronana nego oni bez sposobnosti metastaziranja (211). Zanimljivo je opažanje da pojačani rast stanica melanoma ovisi o sposobnosti vezivanja molekule CD44 za hijaluronan. Pretpostavlja se da se time pobuđuje intracelularni signal koji potiče stvaranje citokina i utječe na rast tumora autokrinim putem (23). Stanice karcinoma ovarija koje prijanjaju uz mezotel peritoneuma i plastičnu podlogu obloženu hijaluronanom *in vitro* ispoljavaju visoku razinu molekule CD44. To vezivanje može se djelomice spriječiti primjenom topivog hijaluronana (37) ili protutijelima protiv CD44 (110).

Ipak, postoje i suprotna opažanja glede uloge CD44 i hijaluronana u metastatskom procesu. Smanjena ekspresija molekule CD44 na stanicama karcinoma endometrija udružena je s otpuštanjem stanica iz tumora u limfne kapilare (71). Stanice primarnog karcinoma ovarija u ascitesu ispoljavale su nižu razinu molekule CD44 nego normalne stanice (37). U oba slučaja odvajanje stanica od primarnog tumora koreliralo je sa smanjenom ekspresijom

molekule CD44. Slično tome, odsustvo molekule CD44 u neuroblastoma upućuje na agresivnost tumora. Tumori u ranijim stadijima progresije snažno su ispoljavali molekulu CD44, a s napredovanjem kliničkog stadija došlo je do gubitka ekspresije CD44 (60). Slabo diferencirani neuroblastomi udruženi su s gubitkom molekule CD44 i amplifikacijom onkogeno MYCN (204).

Ekspresija CD44 istraživana je na tkivnim rezovima i odljuštenim stanicama karcinoma mokraćnog mjehura. U stanicama dobro diferenciranog papilarnog karcinoma i *flat* karcinoma *in situ*, dobivenih iz urina bolesnika, otkriveni su abnormalni oblici mRNK i proteinske izoforme molekule CD44 (v6). Odljuštene stanice prijelaznog epitela iz urina kontrolne skupine nisu sadržavale taj genski produkt (146,201). Autori smatraju da se ova saznanja mogu koristiti kao neinvazivna metoda za rano otkrivanje raka mokraćnog mjehura. Isti autori istražili su prisustvo molekule CD44 na stanicama karcinoma mokraćnog mjehura u različitim kliničkim stadijima. Za razliku od normalnog prijelaznog epitela u kojem samo bazalne stanice ispoljavaju molekule CD44s i CD44v6, ali ne i viši slojevi, u papilarnom neinvazivnom raku svi su epitelni slojevi pozitivni. Na mjestima početne invazije tumorske stanice slabije se boje, a u gnijezdima dublje u stromi stanice su negativne (200). Što su više uznapredovali, karcinomi mokraćnog mjehura pokazuju slabiju ispoljenost genskih produkta CD44 sve do potpunog odsustva CD44 mRNK i proteina u dubljim slojevima stijenke mokraćnog mjehura.

Odnos između ekspresije CD44 i stadija tumora promjenjiv je ovisno o ispitivanom organu. U karcinomima kolona i ne-Hodgkinskim limfomima, prekomjerna ekspresija izoformi CD44 upućivala je na agresivnije ponašanje tumora, dok je u neuroblastomima, karcinomima mokraćnog mjehura i endometrija gubitak molekule CD44 udružen s povećanom invazivnošću. Rezultati na karcinomima dojke su dvojaki. Rezultati dobiveni na karcinomima mokraćnog mjehura pokazuju da ove razlike mogu biti posljedica različitog stadija ispitivanih tumora. Razlike u ekspresiji CD44 mRNK i proteina u tumorima različitih organa i kliničkih stadija ukazuje na to da ne postoji jasan jednosmjerni odnos između poremećaja ekspresije CD44 ekspresije i zloćudnog ponašanja, ali da je neodgovarajuća aktivnost tog gena karakteristika tumora brojnih organa i tkiva. Povezanost molekule CD44 sa zloćudnim tumorskim rastom ne treba tumačiti u smislu da je bilo koji od egzona ispoljen samo u zloćudnim tumorima ili tijekom procesa metastaziranja. Matsumura smatra da je abnormalni uzorak genske aktivnosti (prekomjerna ekspresija i neodgovarajuće izmjenično isijecanje) kakav obilježava CD44 lokus, samo jedan od brojnih primjera poremećaja genske

aktivnosti u zloćudnim tumorima, a kao takav može biti koristan pokazatelj maligniteta (147).

Da li ekspresija određenih varijantnih izoformi molekule CD44 aktivno doprinosi procesu metastaziranja ili slučajno koincidira s njime, tek treba biti istraženo. Bez obzira na to, velika osjetljivost metode lančane reakcije polimeraza (PCR), kojom se može prikazati RNK za varijantnu molekulu CD44 u jednoj tumorskoj stanici između  $10^7$  leukocita u perifernoj krvi, a također i u tjelesnim izlučevinama, mogla bi koristiti kao metoda za prevenciju i otkrivanje raka. Današnji napori usmjereni su na rano otkrivanje raka, odnosno na pronalaženje pouzdanih pokazatelja koji će omogućiti dijagnozu malih tumora, koji su u toj fazi još izlječivi. Dosadašnja saznanja o abnormalnom uzorku ekspresije gena CD44 u zloćudnim tumorima upućuju na to da bi ova metoda mogla poslužiti za rano otkrivanje raka.



## 6. ZAKLJUČNI PREGLED

1. Karcinomi dojke razlikuju se s obzirom na ekspresiju  $\beta 1$  integrina. Smanjena ekspresija udružena je s pozitivnim limfnim čvorovima, visokim morfometrijskim prognostičkim indeksom i malom mitotskom aktivnošću.

2. Dobro i slabo diferencirani tumori imaju višu razinu ekspresije  $\beta 1$  integrina nego umjereno diferencirani tumori.

3. Nema razlike u ekspresiji  $\beta 1$  integrina na stanicama primarnog tumora i stanicama metastaze.

4. Stanice medularnog raka snažno ispoljavaju molekulu  $\beta 1$ , ali je bojenje citoplazmatsko i većinom ne dolazi do pridruživanja  $\beta 1$  integrina staničnoj membrani.

5. Stanice mucinoznog raka snažno ispoljavaju molekulu  $\beta 1$ .

6. Povećana ekspresija molekule ICAM-1 udružena je s većim infiltratima limfocita.

7. Stanice velikih tumora, tumora s visokom mitotskom aktivnošću i slabo diferenciranih tumora jače ispoljavaju molekulu ICAM-1.

8. Stanice medularnih karcinoma ispoljavaju višu razinu molekule ICAM-1 nego stanice drugih histoloških tipova raka dojke.

9. Nema razlike u ekspresiji ICAM-1 stanicama primarnih tumora i stanicama metastaze.

10. Razina molekule CD44 viša je na stanicama tumora s visokom mitotskom aktivnošću.

11. Primarni tumori imaju manji postotak pozitivnih stanica i nižu razinu ekspresije CD44 nego metastaze.

12. Visoka razina molekule LFA-3 na površini tumorskih stanica nađena je na velikim tumorima, tumorima s visokom mitotskom aktivnošću, slabo diferenciranim tumorima i tumorima s visokim morfometrijskim prognostičkim indeksom.

13. Nema razlike u ekspresiji molekule LFA-3 na stanicama primarnih tumora i stanicama metastaze.

## 7. LITERATURA

1. Acevedo A. 1993 Distribution of ICAM-3 bearing cells in normal human tissues. Expression of a novel counter-receptor for LFA-1 in epidermal Langerhans cells. *Am J Pathol.* 143:774-783
2. Agrez M, Chen A, Cone RI, Pytela R, Sheppard D. 1994 The  $\alpha v\beta 6$  integrin promotes proliferation of colon carcinoma cells through a unique region of the  $\beta 6$  cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 127:547-556
3. Albelda SM, Buck CA. 1990 Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4:2868-2880.
4. Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. 1990 Integrin distribution in malignant melanoma; association of the  $\beta 3$  subunit with tumor progression. *Cancer Res* 50:6757-6764
5. Albelda SM. 1993. Biology of disease - Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest.* 68:4-17
6. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994 Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York, London
7. Ali IU, Campbell G, Lidereau R, Callahan R. 1988 Lack of evidence for the prognostic significance of c-erbB-2 amplification in human breast carcinoma. *Oncogene Res* 3:139-146
8. Altomonte M, Gloghini A, Bertola G, Gasparollo A, Carbone A, Ferrone S, Maio M. 1993 Differential expression of cell adhesion molecules CD54/CD11a and CD58/CD2 by human melanoma cells and functional role in their interaction with cytotoxic cells. *Cancer Res* 53:3343-3348
9. Anastassiou G, Duensing S, Steinhoff G, Kirchner H, Ganser A, Atzpodien J. 1995 In vivo distribution of integrins in renal cell carcinoma: integrin-phenotype alteration in different degrees of tumor differentiation and VLA-2 involvement in tumor metastasis. *Cancer Biother* 10(4):287-292
10. Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P, Zoller M. 1992 Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 257:682-685
11. Aruffo A. 1996 CD44: one ligand, two functions. *J Clin Invest* 98(10):2191-2192
12. Assoian RK, Marcantonio EE. 1996 Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 98:2436-2439.
13. Auer G, Eriksson E, Azavedo E, Caspersson T, Wallgren A. 1984 Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans. *Cancer Res* 44:394-396
14. Baak JPA, Dop VH, Kurver PHJ, Hermans JO. 1985 The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 56:374-382
15. Baak JPA. 1990 Mitosis counting in tumors. *Hum Pathol* 21:683-168

16. Bacus SS, Ruby SG, Weinberg DS. 1990 HER-2/neu oncogene expression and DNA ploidy analysis in breast cancers. *Arch Pathol Lab Med* 114:164
17. Bacus SS, Zelnic CR, Chin DM, Yarden Y, Kaminsky DB, Bennington J, Wen D, Marcus JN, Page DL. 1994 Medullary carcinoma is associated with expression of intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol* 145:1337-1348
18. Bagnasco M, Caretto AS, Olive D, Pedini B, Canonica GW, Betterle C. 1991 Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on thyroid epithelial cells in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease or papillary thyroid cancer. *Clin Exp Immunol* 83:309-313
19. Barsky SH, Baker A, Siegel GP, Togo S, Liotta LA. 1983 Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* 49:140-147
20. Barsky SH, Rao CN, Grotendorst GR, Liotta LA. 1982 Increased content of type V collagen in desmoplasia of human breast carcinoma *Am J Pathol* 108:276-283
21. Barsky SH, Togo S, Garbisa S, Liotta LA. 1983 Type IV collagenase immunoreactivity in invasive breast carcinoma. *Lancet* 8319:296-297
22. Bartolazzi A, Cerboni C, Full C, Valentini C, Natali PG. 1993 V $\alpha$ 3 distribution in normal and neoplastic non-lymphoid human tissues. *Pathol Res Pract* 189:387-393
23. Bartolazzi A, Peach R, Aruffo A, Stamenkovic I. 1994 Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J Exp Med* 180:53-66
24. Behrens J, Mareel MM, VanRoy FM, Birchmeier W. 1989 Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108:2435-2447
25. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B. 1989 Endothelial leukocyte adhesion molecule-1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243:1160-1165
26. Billaud M, Calender A, Seigneurin JM, Lenoir GM. 1987 LFA-1, LFA-3 and ICAM-1 expression in Burkitt's lymphoma. *Lancet* ii:1327-1328
27. Bittner JJ. 1936 Some possible effects of nursing on mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 84:162
28. Bloom HJG, Richardson WW. 1957 Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 11:359-377
29. Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. 1993 Differential expression of  $\alpha$ 6 and  $\alpha$ 2 very late antigen integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic prostate:simultaneous demonstration of cell surface receptors and their extracellular ligands. *Hum Pathol* 24:243-248
30. Bosman FT. 1993 Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem J* 25:469-477
31. Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, Ellis IO, Elston CW, Robertson JF, Blamey RW, Nicholson RI. 1989 Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer* 59:943-947



32. Boyd AW, Dunn SM, Fecondo JV, Culvenor JG, Duhrsen U, Burns GF, Wawryk SO. 1989 Regulation of expression of a human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) during lymphohematopoietic differentiation. *Blood* 73(7): 1896-1903
33. Braakman E, Goedegebuure PS, Vreugdenhil RJ, Segal DM, Shaw S, Bolhuis RLH. 1990 ICAM-melanoma cells are relatively resistant to CD3-mediated T-cell lysis. *Int J Cancer* 46:475-480
34. Brandley BK, Swiedler SJ, Robbins P. 1990 Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules. *Cell* 63:861-863
35. Brunner N, Keld D. 1993 Invasion and metastasis factors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 24:173-174
36. Buck CA. 1987 Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Ann Rev Cell Biol* 3:179-205
37. Cannistra SA, Kansas GS, Niloff J, De Franzo B, Kim Y, Ottensmeier C. 1993 Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. *Cancer Res* 53:3830
38. Carter CL, Allen C, Henson DE. 1989 Relationship of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63:181-187
39. Carter WG, Ryan MC, Gahr PJ. 1991 Epiligrin, a new adhesion ligand for integrin  $\alpha 3\beta 1$  in epithelial basement membranes. *Cell* 65:599-610.
40. Carter WG, Wayner EA, Bouchard TS, Kaur P. 1990 The role of integrin  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 3\beta 1$  in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J Cell Biol* 110:1387-1404
41. Carter WG, Wayner EA. 1988 Characterisation of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J Biol Chem* 263:4193-4201
42. Catterall JB, Gardner MJ, Turner GA. 1997 Hyaluronic acid, cell adhesion and metastasis. *Cancer J* 8(6):1-9
43. Chan BMC, Matsuura N, Takada Y, Zetter B, Hemler ME. 1991 In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* 251:1600-1602
44. Charpin C, Lissitzky JC, Jacquemier J, Lavaut MN, Kopp F, Pourreau-Schneider N, martin PM, Toga M. 1986 Immunohistochemical detection of laminin in 98 human breast carcinomas. *Hum Pathol* 17:355-365
45. Christiansen I, Gidlof C, Kalkner KM, Hagberg H, Benmarker H, Totterman T. 1996 Elevated serum levels of soluble ICAM-1 in non-Hodgkin,s lymphomas correlate with tumour burden, disease activity and other prognostic markers. *Br J Haematol* 92(3):639-646
46. Clark EA, Brugge JS. 1995 Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233-239
47. Clark GM, Dressler LG, Owens MA. 1989 Prediction of relapse or survival in patients with node negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 320:627-633
48. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. 1994 Pathologic basis of disease. 5<sup>th</sup> ed. WB. Saunders Company

49. D'Ardenne AJ, Richman PI, Horton MA, Mcaulay AE, Jordan S. 1991 Co-ordinate expression of the alpha-6 integrin laminin receptor subunit and laminin in breast cancer *J Pathol* 165:213-220
50. Dedhar S, Saulnier R. 1990 Alteration in integrin receptor expression on chemically transformed human cells: specific enhancement of laminin and collagen receptor complexes. *J Cell Biol* 110:481-489
51. Dickson RB, Lippman ME. 1992 Molecular determinants of growths, angiogenesis and metastases in breast cancer. *Seminars Oncol* 19:286
52. Doerr ME, Jones JJ. 1996 The roles of integrins and extracellular matrix proteins in the insulin-like growth factor I-stimulated chemotaxis of human breast cancer cells. *J Biol Chem* 271(5):2443-2447
53. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. 1986 Induction by IL-1 and interferon- $\gamma$ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137:245-254
54. Dustin ML, Singer KH, Tuck DT, Springer TA. 1988 Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon  $\gamma$  and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Exp Med* 167:1323-1340
55. Elledge RM, McGuire WL, Osborne K. 1992 Prognostic factors in breast cancer. *Seminars in oncology* 19:244-253
56. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. 1992 Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 20:479-489
57. Elston CW, Ellis IO. 1991 Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19:403-410
58. Ernstoff MS, Jaffee EM, Oeler T. 1992 The development and characterization of a natural killer cell-resistant human renal cell carcinoma cell line. *Nat Immun* 11(1):17-25
59. Fallenius AG, Auer GU, Carstensen JM. 1988 Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer* 62:331
60. Favrot MC, Combaret V, Lasset C. 1993 CD44 - a new prognostic marker for neuroblastoma. *New Engl J Med* 329(26):1965
61. Fidler IJ. 1990 Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eight G.H.A.Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 50:6130-6138
62. Fisher B, Fisher E, Redmond C, Brown A. 1986 Tumor nuclear grade, estrogen receptor, and progesterone receptor as an indicator of outcome following adjuvant therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 7:147-160
63. Fisher B, Slack NH, Bross IDJ. 1969 Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. *Cancer* 24:1071-1080
64. Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G. 1990 Pathologic findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer* 65:2121-2128

65. Fleming S. 1991. Cell adhesion and focusing of inflammatory responses. *Histopathology* 19:571-573
66. Fletcher CDM. *Diagnostic histopathology of tumors*. Churchill Livingstone 1995.
67. Fornaro M, Tallini G, Bofetiado CJM, Bosari S, Languino LR. 1996 Down-regulation of  $\beta_{1C}$  integrin, an inhibitor of cell proliferation, in prostate carcinoma. *Am J Pathol* 149:765-773
68. Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, Collins I, Gatter KC, Harris AL, Gearing A, Simmons DL. 1994 Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 54:4539-4546
69. Frenette PS, Wagner DD. 1996 Adhesion molecules - part I. *N Engl J Med* 334:1526-1529
70. Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, Gille I, Terpe HJ, Imhof BA. 1995 High expression level of alfa 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res* 55(4):901-906
71. Fujita N, Yaegashi N, Ide Y, Sato S, Nakamura M, Ishiwata I, Yajima A. 1994 Expression of CD44 in normal human versus tumor endometrial tissues: possible implications of reduced expression of CD44 in lymph-vascular space involvement of cancer cells. *Cancer Res* 54:3922
72. Furuta K, Zahurak M, Yang XL, Rosada C, Goodman SN, August JT, Hamilton SR. 1996 Relationship between CD44 expression and cell proliferation in epithelium and stroma of colorectal neoplasms. *A J Pathol*. 149:1147-1155
73. Garrod DR. 1993 Basic molecular and cell biology: cell to cell and cell to matrix adhesion. *BMJ* 306:703-705
74. Gehlsen KR, Argraves WS, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. 1988 Inhibition of in vitro tumor cell invasion by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptides. *J Cell Biol* 106:925-930
75. Giancotti FG, Ruoslahti E. 1990 Elevated levels of the  $\alpha 5 \beta 1$  fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of chinese hamster ovary cells. *Cell* 60:849-859
76. Gingras MC, Roussel E, Bruner JM, Branch CD, Moser RP. 1995 Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J Neuroimmunol* 57(1-2):143-153
77. Glukhova Marina, Koteliansky V, Sastre X, Thiery JP. 1995 Adhesion systems in normal breast and in invasive breast carcinoma. *Am J Pathol* 146(3):706-716
78. Gossler U, Jonas P, Luz A, Lifka A, Naor D, Hamann A, Holzmann B. 1996 Predominant role of  $\alpha 4$ -integrins for distinct steps of lymphoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4821-4826
79. Gould VE, Koukoulis GK, Virtanen I. 1990 Extracellular matrix proteins and their receptors in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *Cell Diff Develop* 32:409-416
80. Greenhough RB. 1925 Varying degrees of malignancy in cancer of the breast. *J Cancer Res* 9:452-463
81. Gregory CD, Murray RJ, Edwards CF, Rickinson AB. 1988 Downregulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in Epstein-Barr virus-positive Burkitt's



- lymphoma underlies tumor cell escape from virus-specific T cell surveillance. *J Exp Med* 167:1811-1824
82. Gross N, favre S, Beck D, Meyer M. 1992 Differentiation-related expression of adhesion molecules and receptors on human neuroblastoma tissues, cell lines and variants. *Int J Cancer* 52(1):85-91
  83. Guerin M, Gabillot M, Mathieu MCH, Travagli JP, Spielmann M, Andrien N, Rion G. 1989 Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and non-inflammatory breast cancer: prognostic significance. *Int J Cancer* 43:201-208
  84. Gui GP, Wells CA, Browne PD, Yeomans P, Jordan S, Puddefoot JR, Vinson GP, Carpenter R. 1995 Integrin expression in primary breast cancer and its relation to axillary nodal status. *Surgery* 117(1):102-108
  85. Guirguis R, Marguelis I, Tarabolletti G, Schiffman E, Liotta LA. 1987 Cytokine-induced pseudopodial protrusion is coupled to tumor cell migration. *Nature* 329:261-263
  86. Gumbiere BM. 1996 Cell adhesion: the molecular basis of the architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357
  87. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. 1991 A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65(1):13-24
  88. Guo YJ Liu G, Wang X, Jiu D, Wu M, Ma J, Sy MS. 1994 Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer Res* 54:422-426
  89. Guo YJ, Ma J, Wang JH, Che X, Navula J, Bigby M, Wu M, Sy MS. 1994 Inhibition of human-melanoma growth and metastasis in-vivo by anti-CD44 monoclonal-antibody. *Cancer Res* 54:1561-1565
  90. Hale LP, Martin ME, McCollum DE. 1989 *Arthritis Rheum* 32:22-30
  91. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. 1990 Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250:1684-1689
  92. Hart IR, Nigel TG, Wilson RE. 1989 Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochim Biophys Acta* 989:65-84
  93. Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. 1989 CD44 - a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 10(12):423-428
  94. Heider KH, Hofmann M, Hors E, Van denBerg F, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. 1993 A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 120:227-233
  95. Hemler M, Elices MJ, Chan BMC, Zetter B, Matsuura N, Takada Y. 1990 Multiple ligand binding functions for VLA-2 ( $\alpha 2\beta 1$ ) i VLA-3 ( $\alpha 3\beta 1$ ) in the integrin family. *Cell Differ Develop* 32:229-238
  96. Hemler ME. 1990 VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol.* 8:365-400
  97. Hogg N, Berlin C. 1995 Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol Today* 16:327-330

98. Hughes EN, August JR. 1981 *J Biol Chem* 256:7023-7027
99. Humphries MJ, Olden K, Yamada K. 1986 A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233:467-470
100. Hynes RO. 1987 Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554
101. Hynes RO. 1992 Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25
102. Imayama S, Furumura M, Hori Y. 1992 Differential localization of ICAM-1 and HLA-DR expression on epidermal basal surface in mycosis fungoides and lichenoid reaction. *Exp Dermatol* 1(3):134-140
103. Jackson AM, Alexandrov AB, Prescott S, James K, Chisholm GD. 1992 Role of adhesion molecules in lymphokine-activated killer cell killing of bladder cancer cells: further evidence for a third ligand for leukocyte function-associated antigen-1. *Immunology* 76(2):286-291
104. Jalkanen S, Bargatze RF, Toyos J, Butcher EC. 1987 lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95-kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal, or synovial endothelial cells *J Cell Biol* 105:983-990
105. Jalkanen S, Joensuu H, Soderstrom KO, Klemi PJ. 1991 Lymphocyte homing and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Invest* 87:1835-1840
106. Jalkanen ST, Barkatze RF, Herron LR, Butcher EC. 1986 *Eur J Immunol* 16:1195-1202
107. Joensuu H, Klemi PJ, Toikkanen S, Jalkanen S. 1993 Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *A J Pathol.* 143:867-874
108. Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwable W, Riethmuller G. 1989 De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:641-644
109. Jones JL, Critchley DR, Walker RA. 1992 Alteration of stromal protein and integrin expression in breast - a marker of premalignant change? *J Pathol* 167:399-406
110. Jones LMH, Gardner MJ, Catterall JB. Hyaluronic acid secreted by mesothelial cells: a natural barrier to ovarian cancer cell adhesion. *Clin Exp Metastasis* 13:373
111. Juliano RL, Haskill S. 1993 Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 120:577-585
112. Juliano RL. 1987 Membrane receptors for extracellular matrix macromolecules: relationship to cell adhesion and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 907:261-278
113. Kajiji S, Tamura RN, Quaranta V. 1989 A novel integrin ( $\alpha E\beta 4$ ) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors. *EMBO J* 8:673-680
114. Kaufmann R, Frosch D, Westphal C, Weber L, Klein CE. 1989 Integrin VLA-3: ultrastructural localization at cell-cell contact sites of human cell cultures. *J Cell Biol* 109:1807-1815
115. Kerbel RS. 1979 Immunologic studies of membrane mutants of a highly metastatic murine tumor. *Am J Pathol* 97:609-616

116. Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL, Dustin ML, Staunton DE, Springer TA. 1989 The leukocyte integrins. *Adv Immunol* 46:149-182
117. Klein B, Levin I, Kfir B, Mishaeli M, Shapira J, Klein T. 1995 The significance of soluble interleukin-2, soluble interleukin-2 receptors, soluble ICAM-1 and beta 2-microglobulin in breast cancer patients. *Tumour Biol* 16(5):290-296
118. Klein CE, Steinmayer T, Kaufmann D, Weber L, Brocker EB. 1991 Identification of melanoma progression antigen as integrin VLA-2. *J Invest Dermatol* 96:281-284
119. Knudson CB, Knudson W. 1993 Hyaluronan-binding proteins i development, tissue homeostasis and disease. *FASEB J.* 7:1233-1241
120. Knudson W. 1996 Tumor-associated hyaluronan. *Am J Pathol.* 148(6):1721-1726
121. Korabiowska M, Brinck U, Honig J, Mora O, Bartkowski S, Schauer A. 1995 CD44: a marker of metastases of head and neck melanomas. *In vivo* 9(3):253-256
122. Koretz K, Moller P, Lehnert T, Hinz U, Otto HF, Herfarth C. 1995 Effect of CD44v6 on survival in colorectal carcinoma. *Lancet* 345:327-328
123. Koretz K, Schlag P, Boumsell L, Moller P. 1991 Expression of VLA- $\alpha$ 2, VLA- $\alpha$ 6, and VLA- $\beta$ 1 chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in colon carcinomas and their liver metastases. *Am J Pathol* 138:1-10
124. Koretz K, Schlag P, Moller P. 1991 Sporadic loss of leucocyte-function-associated antigen-3 (LFA-3) in colorectal carcinomas. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 419:389-394
125. Korhonen M, Laitinen L, Yianne J, Koukoulis GK, Quaranta V, Juusela H, Gould VE, Virtanen I. 1992 Integrin distributions in renal cell carcinomas of various grades of malignancy. *Am J Pathol* 141:1161-1171
126. Koukoulis GK, Virtanen I, Korhonen M, Laitinen L, Quaranta V, Gould VE. 1991 Immunohistochemical localization of integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. *Am J Pathol* 139(4):787-799
127. Koyama S, Ebihara T, Fukao K. 1992 Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) during the development of invasion and/or metastasis of gastric carcinoma. *J Cancer Res* 118:609-614
128. Kvale D, Krajci P, Brandtzaeg P. 1992 Expression and regulation of adhesion molecules ICAM-1 (CD54) and LFA-3 (CD58) in human intestinal epithelial cell lines. *Scand J Immunol* 35:669-676
129. Larsen E, Celli A, Gilbert GE, Furie B, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. 1989 PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 59:305-312
130. Larson RS, Springer TA. 1990 Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 114:181-217
131. Lasky LA. 1991 Lectin cell adhesion molecules (LEC-CAMs): A new family of cell adhesion proteins involved with inflammation. *J Cell Biochem* 45:139-146
132. Laurent TC, Fraser JRE. 1992 Hyaluronan. *FASEB J.* 6:2397-2404
133. Lee BJ, Hauser H, Pack GT. 1934 Gelatinous carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 59:841-850



134. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. 1993 CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol.* 54:271-335
135. Leslie KO, Howard P. 1992 Oncogenes and antioncogenes in human breast carcinoma. *Pathol. Annual* 27:321
136. Lessey BA, Albelda S, Buck CA, Castelbaum AJ, Yeh I, Kohler M, Berchuck A. 1995 Distribution of integrin cell adhesion molecules in endometrial cancer. *Am J Pathol* 146(3):717-726
137. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. 1983 Tumor invasion and the extracellular matrix: rhoads memorial award lecture. *Lab Invest* 49(6):636- 649
138. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. 1991 Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64:327-336
139. Liotta LA. 1986 Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 46:1-7
140. Mackay CR, Imhof BA. 1993 Cell adhesion in the immune system. *Immunol Today* 14:99-102
141. Makgoba MW, Sanders ME, Ginter Luce GE, Gugel EA, Dustin ML, Springer TA, Shaw S. 1988 Functional evidence that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for LFA-1-dependent adhesion in T cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 18:637-640
142. Makgoba MW, Sanders ME, Shaw S. 1989 The CD2-LFA3 and LFA-1-ICAM pathways: relevance to T-cell recognition. *Immunol Today* 10(12):417-422
143. Maki HS, Hoehn JL. 1989 Influence of estrogen receptors on survival and recurrence in patients with breast cancer without lymph node metastases. *Arch Surg* 124:377-380
144. Marcantonio EE, Hynes RO. 1988 Antibodies to the conserved cytoplasmic domain of the integrin  $\beta 1$  subunit react with proteins in vertebrates, invertebrates, and fungi. *J Cell Biol* 106:1765-1772
145. Marlin SD, Springer TA. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51:813-819
146. Matsumura Y, Hanbury D, Smith J, Tarin D. 1994 Non-invasive detection of malignancy by identification of unusual CD44 gene activity in exfoliated cancer cells. *Br Med J* 308:619-624
147. Matsumura Y, Tarin D. 1992 Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340:1053-1058
148. Matsuura N, Puzon-McLaughlin W, Irie A, Morikawa Y, Kakudo K, Takada Y. 1996 Induction of experimental bone metastasis in mice by transfection of integrin  $\alpha 4\beta 1$  into tumor cells. *Am J Pathol* 148(1):55-61
149. Mayer B, Jauch KW, Gunthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, Johnson JP. 1993 De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 342:1019-1022.
150. Mayer B, Lorenz C, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW, Funke I, Johnson JP. 1995 Expression of leukocyte cell adhesion molecules on gastric carcinomas: possible involvement of LFA-3 expression in the development of distant metastases. *Int J Cancer* 64(6):415-423

151. Mc Divitt RW, Stone KR, Craig RB, Meyer JS. 1985 A comparison of human breast cancer cell kinetics measured by flow cytometry and thymidine labeling. *Lab Invest* 52:287
152. Mechtersheimer G, Munk M, Barth T, Koretz K, Moller P. 1993 Expression of  $\beta 1$  integrins in non-neoplastic mammary epithelium, fibroadenoma and carcinoma of the breast. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 422:203-210
153. Meredith J Jr, Takada Y, Fornaro M, Languino LR, Schwartz MA. 1995 Inhibition of cell cycle progression by the alternatively spliced integrin  $\beta 1c$ . *Science* 269:1570-1572
154. Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW. 1990 Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J.Exp.Med.* 172:69-75
155. Mulder JR, Kruyt PM, Sewnath M, Oosting J, Seldenrijk CA, Weidema W, Johan G, Offerhaus A, Pals ST. 1994 Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 344:1470-1472
156. Muller A. 1993 PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 178:449-460
157. Natali P, Nicotra MR, Cavaliere R, Bigotti A, Romano G, Temponi M, Ferrone S. 1990 Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res* 50:1271-1278
158. Neville AM. 1989 The clinical use of human tumor markers. *Ann Chir Gynaecol* 78:7-12
159. Neville AM. 1991 Prognostic factors in primary breast cancer. *Diagn Oncol* 1:53-63
160. Obiri NI, Tandon N, Puri RK. 1995 Up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on human renal cell carcinoma cells by interleukin-4. *Int J Cancer* 61(5):635-642
161. Pals ST, Horst E, Ossekoppele GJ, Fidgor CG, Scheper RJ, Meijer CJLM. 1989 Expression of lymphocyte homing receptor as a mechanism of dissemination in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 73:885-888
162. Pardi R, Inverardi L, Bender JR. 1992 Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. *Immunol.Today* 13:224-230
163. Pasqualini R, Hemler ME. 1994 Contrasting roles for integrin  $\beta 1$  and  $\beta 5$  cytoplasmic domains in subcellular localization, cell proliferation, and cell migration. *J Cell Biol* 125:447-460
164. Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FCA. 1990 ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand sialosyl-LEX. *Science* 250:1130-1132
165. Picker LJ, Nakache M, Butcher EC. 1989 Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J Cell Biol* 109:927-937
166. Pignatelli M, Hanby AM, Stamp GWH. 1991 Low expression of  $\beta 1$ ,  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$  subunits of VLA integrins in malignant mammary tumours. *J Pathol* 165:25-32
167. Pignatelli M, Smith MEF, Bodmer WF. 1990 Low expression of collagen receptors in moderate and poorly differentiated colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 61:636-638

168. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW. 1994 Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 24:41-47
169. Plantefaber LC, Hynes RO. 1989 Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *cell* 56:281-290
170. Plow EF, Zhang L. 1997 A MAC-1 attack: Integrin functions directly challenged in knockout mice. *J Clin Invest* 99(6):1145-1146
171. Rank F, Dombernowski P, Jespersen NCB, Pedersen BV, Keiding N. 1987 Histologic malignancy grading of invasive ductal breast cancer. *Cancer* 60:1299-1305
172. Roberts L. 1993 Zeroing in on a breast cancer susceptibility gene. *Science* 259:622-625
173. Rochefort H, Augereau P, Briozzo P. 1988 Structure, function, regulation and clinical significance of the 52 kd pro-cathepsin D secreted by breast cancer cells. *Biochimie* 70:943-949
174. Rosen SD, Bertozzi CR. 1994 The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol* 6:663-673
175. Ruiz P, Schwarzler C, Gunthert U. 1995 CD44 isoforms during differentiation and development. *BioEssays* 17:17-24
176. Ruoslahti E, Giancotti FG. 1989 Integrins and tumor cell dissemination. *Cancer Cells* 1:119-126
177. Ruoslahti E. 1991 Integrins. *J Clin Invest.* 87:1-5
178. Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK. 1987 Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence and death from breast cancer. *Lancet* i:1398-1402
179. Sainsbury JRC, Farndon JR, Harris AL, Sherbet GV. 1985 Epidermal growth factor receptors on human breast cancers. *Br J Surg* 72:186-189
180. Santala P, Heino J. 1991 Regulation of integrin-type cell adhesion receptors by cytokines. *J Biol Chem* 266(34):23505-23509
181. Santarosa M, Favaro D, Quaia M, Spada A, Sacco C, Talamini R, Galligioni E. 1995 Expression and release of intercellular adhesion molecule-1 in renal-cancer patients. *Int J Cancer* 62(3):271-275
182. Sastry SK, Horwitz AF. 1993 Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol* 5:819-831
183. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. 1990 Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343:170-173
184. Schadendorf D, Gawlik C, Haney U, Ostmeier H, Suter L, Czarnetzki BM. 1993 Tumour progression and metastatic behavior in vivo correlates with integrin expression on melanocytic tumours. *J Pathol* 170:429-434
185. Scheibenbogen C, Keilholz U, Meuer S, Dengler T, Tilgen W, Hunstein W. 1993 Differential expression and release of LFA-3 and ICAM-1 in human melanoma cell lines. *Int J Cancer* 54(3):494-498



186. Schulz TF, Mitterer M, Vogetseder W, Bock G, Myones B, Dierich MP. 1988 Identification and characterization of a novel membrane activation antigen with wide cellular distribution. *Europ J Immunol* 18:7-11
187. Schwaeble W, Kerlin M, Meyer zum Buschenfelde KH, Dippold W. 1993 De novo expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in pancreas cancer. *Int J Cancer* 53:328-333
188. Schwartz MA. 1993 Signaling by integrins: Implications for tumorigenesis. *Cancer Res* 53:1503-1506
189. Shaw LM, Chao C, Wewer UM, Mercurio AM. 1996 function of the integrin alpha 6 beta 1 in metastatic breast carcinoma cells assessed by expression of a dominant-negative receptor. *Cancer Res* 56(5):959-963
190. Shay JW, Wright WE, Werbin H. 1993 Toward a molecular understanding of human breast cancer: A hypothesis. *Breast Cancer Res Treat.* 25:83-94
191. Shimizu Y, Minemura M, Tsukishiro T, Kashii Y, Miyamoto M, Nishimori H, Higuchi K, Watanabe A. 1995 Serum concentration of intercellular adhesion molecule-1 in patients with hepatocellular carcinoma is a marker of the disease progression and prognosis. *Hepatology* 22(2):525-531
192. Shimizu Y, Shaw S, Graber N. 1991 Activation-independent binding of human memory T cells to adhesion molecule ELAM-1. *Nature* 349:799-802
193. Sloane BF, Honn KV. 1984 Cysteine proteinase and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 3:249-265
194. Springer T. 1990 Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434
195. Spyrtos F, Brouillet JP, DeFreeno A. 1989 Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 2:1115-1118
196. Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B. 1991 The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J.* 10:343-348
197. Stauder R, Gunthert U. 1995 CD44 isoforms. Impact on lymphocyte activation and differentiation. *The Immunologist* 3:78-83
198. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. 1988 Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52:925-933
199. Streuli CH, Bissell MJ. 1990 Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. *J Cell Biol* 110:1405-1415
200. Sugino T, Gorham H, Yoshida K, Bolodeoku J, Nargund V, Cranston D, Goodison S, Tarin D. 1996 Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am J Pathol* 149:873-882
201. Sugiyama M, Woodman A, Sugino T, Crowley S, Ho K, Smith J, Matsumura Y, Tarin D. 1995 Non-invasive detection of bladder cancer by identification of abnormal CD44 proteins in exfoliated cancer cells in urine. *J Clin Pathol Mol Pathol* 48:142-143
202. Takeichi M. 1991 Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451-1455

203. Tawil NJ, Gowry V, Djoneidi M, Nip J, Carbonetto S, Brodt P. 1996 Integrin alpha3beta1 can promote adhesion and spreading of metastatic breast carcinoma cells on the lymph node stroma. *Int J Cancer* 66(5):703-710
204. Terpe HJ, Christiansen H, Gonzales M, Berthold F, Lampert F. 1995 Differentiation and prognosis of neuroblastoma in correlation to the expression of CD44s. *Eur J Cancer* 31A(4):549-552
205. Terpe HJ, Storkel S, Zimmer U, Anquez V, Fischer C, Pantel K, Gunthert U. 1996 Expression of CD44 isoforms in renal cell tumors. *Am J Pathol* 148:453-463
206. Therpe HJ, Stark H, Prehm P, Gunthert U. 1994 CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelia of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry* 101:79-89
207. Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M, Freiss G, Christensen IJ, Khalaf S, Paolucci F, Pau B, Rasmussen BB, Rose C. 1989 Association between high concentration of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res* 49:6008-6014
208. Tomita Y, Kimura M, Tanikawa T, Nishiyama T, Morishita H, Takeda M, Fujiwara M, Sato S. 1993 Immunohistochemical detection of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and major histocompatibility complex class I antigens in seminoma. *J Urol* 149:659-663
209. Tomita Y, Watanabe H, Kobayashi H, Nishiyama T, Tsuji S, Imai K, Abo T, Fujiwara M, Sato S. 1993 Expression of intercellular adhesion molecule-1 on transitional cell cancer. *Am J Pathol* 143:191-198
210. Toole BP, Biswas C, Gross J. 1979 Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 76:6299-6303
211. Turley EA, Treiak M. 1985 Glycosaminoglycan production by murine melanoma variants in-vivo and in-vitro. *Cancer Res* 45:5098
212. Udagawa T, Hopwood VL, Pathak S, McIntyre BW. 1995 Integrin-mediated entry into S phase of human gastric adenocarcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 13(6):427-438
213. Vanky F, Wang P, Patarroyo M, Klein E. 1990 Expression of the adhesion molecule ICAM-1 and major histocompatibility complex class I antigens on human tumor cells is required for their interaction with autologous lymphocytes in vitro. *Cancer Immunol Immunother* 31:19-27
214. Varner JA, Emerson DA, Juliano RL. 1995 Integrin alpha5beta1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* 6(6):725-740
215. Vignon F, Capony F, Chambon M, Freiss G, Garcia M, Rochefort H. 1986 Autocrine growth stimulation by the MCF-7 breast cancer cells by the estrogen-regulated 52kd protein. *Endocrinology* 118:1537-1545
216. Vleminck K, Vakaet L, Mareel MM, Fiers W, VanRoy F. 1991 Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66:107-119
217. Vogetseder W, Feichtinger H, Schulz TF, Schwaeble W, Tabaczewski P, Mitterer M, Bock G, Marth C, Dapunt O, Mikuz G, Dierich MP. 1989 Expression of 7F7-antigen, a

- human adhesion molecule identical to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human carcinomas and their stromal fibroblasts. *Int J Cancer* 43:768-773
218. Wang C, Tammi M, Guo H, Tammi R. 1996 Hyaluronan distribution in the normal epithelium of esophagus, stomach, and colon and their cancers. *A J Pathol* 148(6):1861-1869
219. Webb DSA, Mostowski HS, Gerrard TL. 1991 Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J Immunol* 146:3682-3686
220. Weetman AP, Cohen S, Makgoba MW, Borysiewicz LK. 1989 *J Endocrinol* 122:185-191
221. World Health Organization. *Histologic Typing of Breast Tumors*, 2<sup>nd</sup> ed. 1982 *Am J Clin Pathol* 78:86
222. Yamada KM, Kennedy DW, Yamada SS, Galnick H, Chen WT, Akiyama SK. 1990 Monoclonal antibody and synthetic peptide inhibitors of human tumor cell migration. *Cancer Res* 50:4485-4496
223. Yeo TK, Nagy JA, Yeo KT, Dvorak HF, Toole BP. 1996 Increased hyaluronan at sites of attachment to mesentery by CD44-positive mouse ovarian and breast tumor cells. *Am J Pathol* 148:1733-1740
224. Zutter MM, Krigman HR, Santoro SA. 1993 Altered integrin expression in adenocarcinoma of the breast. Analysis by in situ hybridization. *Am J Pathol* 142:1439-1448
225. Zutter MM, Mazoujian G, Santoro SA. 1990 Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast. *Am J Pathol* 137 (4): 863-870
226. Zutter MM, Santoro SA. 1990 Widespread histologic distribution of the  $\alpha 2\beta 1$  integrin cell-surface collagen receptor. *Am J Pathol* 137(1):113-120
227. Zylstra S, Chen FA, Gosh SK, Repasky EA, Rao U, Takita H, Bankert RB. 1986 Membrane-associated glycoprotein (gp160) identified on human lung tumors by a monoclonal antibody. *Cancer Res* 46:6446-6451



## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20.01.1963.g. u Rijeci. Osnovnu i srednju školu završila sam u Rijeci. Medicinski fakultet upisala sam 1981. godine, a apsolvirala 1986. godine. Od treće godine studija radila sam kao demonstrator na Zavodu za anatomiju, a nakon obavljenog pripravničkog staža te položenog stručnog ispita zaposlila sam se na istom Zavodu u svojstvu stručnog suradnika. Poslijediplomski studij iz Kliničke imunologije upisala sam 1988. godine, a 1991.g obranila sam magisterski rad pod naslovom "Uloga stanične imunosti u kontroli rasta singeničnog fibrosarkoma izazvanog metilholantrenom u miša". Iste godine izabrana sam u zvanje asistenta.

Od listopada 1991. g. radim na Zavodu za patologiju i patološku anatomiju. Specijalistički ispit iz patologije položila sam 1996. godine. Sudionik sam znanstvenoistraživačkog projekta pod naslovom "Angiogeneza kao prognostički faktor karcinoma" (006211).