

**UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET**

Aleksandra M. Erić-Nikolić

**AKTIVNOST SERUMSKE DIPEPTIDIL-
PEPTIDAZE IV I EKSPRESIJA CD26
ANTIGENA NA IMUNOKOMPETENTNIM
ĆELIJAMA PERIFERNE KRVI KOD
BOLESNICA SA BENIGNIM I MALIGNIM
PROMENAMA DOJKE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE**

Aleksandra M. Erić-Nikolić

**SERUM ACTIVITY OF DIPEPTIDYL-
PEPTIDASE IV AND EXPRESSION OF
CD26 ANTIGEN ON
IMMUNOCOMPETENT CELLS OF
PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS
WITH BENIGN AND MALIGNANT
BREAST TUMORS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

Mentor:

Prof. Dr Radan Džodić
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor:

Dr sci. Zorica Juranić, naučni savetnik
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

Komisija:

Prof. Dr Ivana Golubičić, predsednik,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. Dr Sanvila Rašković
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. Dr Dušan Popadić
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Doc. Dr Miloš Marković
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr med. Zora Nešković, naučni savetnik
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

SAŽETAK

Uvod: dipeptidil-peptidaza IV (DPPIV ili CD26) je serin-proteaza koja ima značajnu ulogu u brojnim biološkim procesima. Kalretikulin je protein koji reguliše brojne važne ćelijske funkcije. Cilj ovog rada je bio da se odredi serumska aktivnost DPPIV, procenat CD26⁺ belih krvnih ćelija i CD26⁺ limfocita, kao i srednja vrednost intenziteta fluorescencije ekspresije CD26 na limfocitima u bolesnica sa benignim i malignim lezijama dojke i u zdravih kontrola i da se utvrdi da li su intenzitet i lokalizacija povišene ekspresije kalretikulina u tumorskim ćelijama povezani sa povećanjem humoralnog imuniteta na kalretikulin u ispitivanim grupama. Takođe je analiziran procenat nekih limfocitnih subpopulacija, CD16⁺/56⁺ i CD16⁺/89⁺ kod bolesnica sa malignim i benignim promenama dojke, kao i kod zdravih kontrola.

Metode: Uključeno je 37 bolesnica sa benignim i 68 sa malignim promenama dojke, pre hirurškog tretmana, kao i 37 zdravih kontrola. Serumska aktivnost DPPIV izmerena je kolorimetrijskim testom, dok je broj CD26⁺ ćelija određena metodom protočne citomerije. Citoplazmatska i membranska ekspresija kalretikulina u malignim i benignim ćelijama parafinskih isečaka utvrđena je imunohistohemijski. Nivoi serumskih antikalretikulinskih antitela izmereni su ELISA metodom. Procenat ispitivanih limfocitni subpopulacija određen je metodom protočne citomerije.

Rezultati: Značajan pad u procentu ukupnih CD26⁺ ćelija ustanovljen je u grupi bolesnica sa benignim i malignim promenama u poređenju sa zdravim kontrolama. Intenzitet fluorescencije CD26 ekspresije na limfocitima je značajno niži kod bolesnica sa malignim promenama u poređenju sa zdravim kontrolama. Statistički značajna razlika je utvrđena u serumskim nivoima antikalretikulinskih IgA antitela između bolesnica i zdravih kontrola. Relativna učestalost gCD16^{dim+}/56^{bright+} subpopulacije imunokompetentnih ćelija je statistički značajno niža u bolesnica sa malignim, ali i benignim promenama dojke u odnosu na zdrave kontrole; statistički značajno niže vrednosti su utvrđene i u relativnoj učestalosti tCD16^{dim+}/56^{bright+} ćelija u bolesnica sa malignim promenama dojke u odnosu na one u zdravih kontrola; niže vrednosti procenta gCD16^{bright+}/56^{dim+} imunskih ćelija su takodje karakteristika bolesnica sa malignim ili benignim promenama u odnosu na zdravie kontrole. Procenat CD89⁺ imunskih ćelija (uglavnom granulocita) značajno je povišen kako u bolesnica sa

malignim promenama tako i u bolesnica sa benignim promenama u odnosu na zdrave kontrole.

Zaključci: U grupi bolesnica sa malignim promenama potvrđen je pad u procentu CD26⁺ ćelija, kao i pad ekspresije CD26 na limfocitima. Stepem povišene ekspresije kalretikulina u lobularnom karcinomu dojke je niži nego u duktalnom. Nivoi IgA antikalretikulinskih antitela bili su značajno viši kod bolesnica sa malignim promenama, kao i kod bolesnica sa benignim promenama, u komparaciji sa zdravim kontrolama.

Ključne reči: benigna bolest dojke, karcinom dojke, kalretikulin, antikalretikulinska antitela, ELISA, humoralni imunitet, limfocitne subpopulacije

ABSTRACT

Objective: Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV or CD26) is a serine protease which has a significant role in a variety of biological processes. Calreticulin is a protein which regulates many important cellular responses. The aim of this work was to determine serum DPPIV activity as well as the percentage of CD26⁺ white blood cells and of CD26⁺ lymphocytes and the mean fluorescence intensity (MFI) of CD26 expression on lymphocytes in groups of patients with benign or malignant breast tumors and in healthy controls and to elucidate whether the intensity and location of calreticulin overexpression in tumor cells are related to the elevated humoral immunity to calreticulin in patients with benign or malignant breast disease. It was also analyzed the percentage of some subpopulations of lymphocytes, such as: CD16⁺/56⁺ i CD16⁺/89⁺ in patients with benign and malignant breast lesions and in healthy controls as well.

Methods: This study involved 37 patients with benign and 68 patients with malignant breast tumors before surgical resection and 37 healthy volunteers. Serum DPPIV activity was determined by colorimetric test, while CD26⁺ cells were counted using flow cytometer. Cytoplasmatic or membranous calreticulin overexpression in malignant or benign cells in paraffinembedded tissues was determined using immunohistochemistry. Levels of the serum anti-calreticulin autoantibodies were detected by ELISA. Percentage of lymphocytes was determined using flow cytometry.

Results: Significant decrease in the percentage of CD26⁺ total white blood cells was found in the group of breast cancer patients and in patients with benign breast tumors compared to healthy people. The MFI of CD26 expression on lymphocytes was significantly lower for cancer patients in comparison to healthy controls. Statistically significant differences between serum levels of IgA of anti-calreticulin antibodies in controls and patients with breast tumors, and between controls and patients with nonmalignant breast diseases were found. It was revealed significant decrease in the percentage of gCD16^{dim+}/56^{bright+} cells in patients with benign and malignant breast lesions, as well as in the of percentage of tCD16^{dim+}/56^{bright+} in malignant breast lesions compared with healthy controls. It was also found significant decrease in the of percentage of gCD16^{bright+}/56^{dim+} cells in patients with benign and malignant breast lesions compared with healthy controls. Percentage of CD89⁺ cells was significant

elevated in patients with benign and malignant breast lesions compared to healthy controls.

Conclusions: Decreased percentage of CD26⁺ white blood cells and decreased CD26 expression on lymphocytes are characteristics of breast cancer patients. The degree of calreticulin overexpression in lobular breast carcinoma is lower than in ductal breast carcinoma. Elevated concentrations of anti-calreticulin IgA antibodies were present more frequently in patients with metastasis in locoregional lymph nodes in comparison to anti-calreticulin IgG antibodies.

Key words: benign breast disease, breast cancer, calreticulin, anti-calreticulin antibodies, ELISA, humoral immunity, CD26 expression, lymphocyte subpopulations

SADRŽAJ

1	UVOD	10
1.1	Epidemiološki parametri karcinoma dojke	10
1.2	Anatomija dojke	11
1.3	Benigne promene dojke	16
1.4	Maligne promene dojke	19
1.5	TNM klasifikacija karcinoma dojke	23
1.6	Klinički stadijumi karcinoma dojke	25
1.7	Uloga imunskog sistema u malignim bolestima; imunski status bolesnica sa karcinomom dojke	26
1.8	Dipeptidil-peptidaza IV	30
1.9	Kalretikulin – uloga u imunskom odgovoru i karcinomu	37
2	CILJEVI	42
3	BOLESNICE, METODE I MATERIJAL	43
3.1	Mesto i period istraživanja	43
3.2	Selekcija bolesnica	43
3.3	Klinički (hirurški) tretman promena u dojci	44
3.4	Prikupljanje humanog materijala	46
3.5	Instrumenti merenja (eksperimentalne metode)	46
3.5.1	Izolovanje limfocita periferne krvi	46
3.5.2	Izolovanje seruma	46
3.5.3	Analiza na protočnom citometru	47
3.5.4	Imunohistohemija	48
3.5.5	Direktna fotometrijska metoda	49
3.5.6	ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	50
3.6	Klinički deo istraživanja	50
3.7	Statistička metodologija	51
3.7.1	Statistička metodologija za određivanje aktivnosti serumske DPPIV	51
3.7.2	Statistička metodologija za određivanje overekspresije kalretikulina u tkivima benignih i malignih promena dojke	51
3.7.3	Obrada podataka dobijenih analizom na protočnom citometru	52

4	REZULTATI	53
4.1	Bolesnice sa malignim promenama dojke	53
4.2	Bolesnice sa benignim promenama dojke	55
4.3	Ispitivanje aktivnost serumske dipeptidil-peptidaze IV i ekspresije CD26 antigena na imunokompetentnim ćelijama periferne krvi	56
4.4	Ekspresija kalretikulina u benignim i malignim promenama dojke	64
4.5	Određivanje serumskih nivoa IgA i IgG anti-kalretikulinskih antitela u bolesnica sa benignim i malignim promenama dojke	67
4.6	Ispitivanje relativne učestalosti određenih subpopulacija mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnica i zdravih osoba	71
5	DISKUSIJA	77
5.1	Epidemiološke karakteristike uzorka	77
5.2	Serumska aktivnost DPPIV i ekspresija CD26 na mononuklearnim ćelijama periferne krvi	77
5.3	Perspektiva CD26/DPPIV kao prognostičkog markera	84
5.4	Ekspresija kalretikulina u benignim i malignim promenama dojke	86
5.5	Relativna učestalost određenih subpopulacija mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnica i zdravih osoba	88
6	ZAKLJUČCI	94
7	LITERATURA	95
8	BIOGRAFIJA	119

1. UVOD

1.1 Epidemiološke odlike raka dojke

Karcinom dojke je najčešći karcinom ženske populacije i osnovni uzrok mortaliteta od karcinoma među ženama. Godišnje se u svetu dijagnostikuje više od 1,1 milion novoobolelih i više od 410 000 umrlih žena od ove maligne bolesti u svetu. Drugi je karcinom po učestalosti, posle karcinoma pluća. Nešto više od polovine novootkrivenih slučajeva (55%) je u razvijenim zemljama, mada incidenca raste i u zemljama u razvoju.^{1,2} U Evropi je, prema podacima iz 2004. god. najčešći karcinom u žena, sa oko 370 000 novodijagnostikovanih, što je oko 27,4% svih dijagnostikovanih zloćudnih tumora u žena. Karcinom dojke je i najčešći uzrok smrti kod žena u Evropi, sa oko 129 900 smrtnih ishoda, što je 17,4% svih smrtnih ishoda uzrokovanih malignitetima.³ U SAD, karcinom dojke je, takođe, najčešće dijagnostikovani karcinom ženske populacije.⁴ Na globalnom nivou, najviša incidenca karcinoma dojke ustanovljena je u severnoj i zapadnoj Evropi, Severnoj Americi, Australiji, Novom Zelandu, kao i u zemljama Južne Amerike (Urugvaj, Argentina).¹ Visoka incidenca karcinoma dojke u razvijenim zemljama posledica je veće učestalosti poznatih faktora rizika: rana menarha, nuliparitet, kasni prvi porođaj, uticaj egzogeno unetih hormona (oralni kontraceptivi i menopauzalna hormonska terapija), gojaznost, kasna menopauza (prolongiran uticaj hormona, pre svih estrogena, kojima je dojka izložena u periodu od menarhe do menopauze).⁵

U kontekstu životne dobi, ustanovljen je porast u incidenci u premenopauzalnih žena (do 50. god.), što se može dovesti u vezu sa uticajem hormona (cirkulišućih estrogena), čiji nivo opada nakon menopauze.⁶

Procena je da će u 2030. god. biti 2,7 miliona novootkrivenih slučajeva, sa preko 60% u manje razvijenim delovima sveta.⁵

◇ *Epidemiološki parametri karcinoma dojke u Srbiji*

Prema Registru za rak centralne Srbije, karcinom dojke je, sa učešćem od 23,3%, najučestaliji malignitet u ženskoj populaciji u odnosu na malignitete ostalih lokalizacija

i najčešći uzrok mortaliteta u žena, uzrokovan karcinomom. Broj novoobolelih, kao i broj umrlih je najveći za region grada Beograda, višestruko veći nego u ostalim regionima Srbije. Stopa incidence za grad Beograd iznosi 124/100000, dok stopa mortaliteta iznosi 49,2/100000 stanovnika. U Srbiji je tokom poslednje dve dekade (od 1990.-2007. god.) za karcinom dojke zabeležena najveća standardizovana stopa mortaliteta, u odnosu na druge lokalizacije malignih bolesti, sa porastom stope od oko 16/100000 registrovano 1990. god. do 20/100000 stanovnika registrovano 2007. god.⁷

1.2 Anatomija dojke

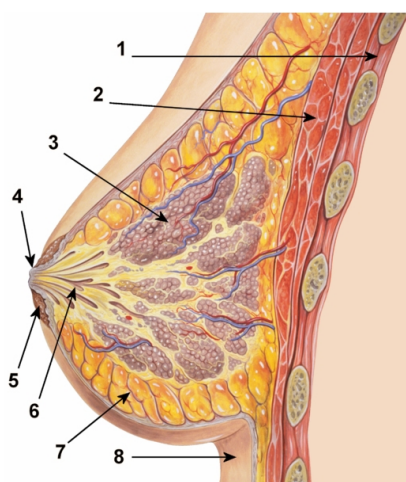
Dojka je modifikovana znojna žlezda kože, lokalizovana na prednjem i, delom, bočnom zidu grudnog koša, u projekcionom prostoru između II i VI rebarne hrskavice, medijalno do sternuma, a lateralno do srednje pazušne linije. Oko regije bradavice i areole (projekcioni prostor između IV i V rebra) cirkumferentno se prostiru kožne linije (tzv. Langerove linije), koje imaju hirurški značaj, u smislu određivanja incizionog mesta za biopsiju.⁸

Dojku čine dva osnovna dela: telo dojke (lat. *corpus mammae*) i bradavica dojke (lat. *papilla mammae*). Telo dojke čini mlečna žlezda (lat. *glandula mammaria*), mlečni kanal (lat. *ductus lactiferi*), zatim deo vezivnog tkiva (lat. *stratum fibrosum*) i deo masnog tkiva (lat. *stratum adiposum*).⁹ (slika 1.1) Koža dojke je tanka i sadrži folikule dlaka, znojne i lojne žlezde. Regija areole i bradavice se sastoji od stratifikovanog keratinizirajućeg skvamoznog epitela sa depozitom melanina, koji je odgovoran za pigmentaciju. Bradavica sadrži znojne i lojne žlezde, kao i nervne završetke. Na periferiji areole nalaze se tzv. Morganijeve kvržice, koje predstavljaju otvore lojnih žlezda, koje sekretuju mleku sličnu supstancu i smatra se da su to pomoćne mlečne žlezde.^{8,10}

Histološki, epitel dojke je ektodermalnog porekla i sastoji se od unutrašnjeg epitelijelnog sloja ćelija i spoljašnjeg mioepitelijelnog sloja, koji razdvaja epitelijelne ćelije od bazalne membrane.¹⁰

Ženska dojka se značajno menja u pogledu oblika, veličine i funkcije u različitim fiziološkim uslovima: u pubertetu, trudnoći, tokom laktacije i u postmenopauzalnoj regresiji. Karakteristična režnjevita struktura dojki, sa grananjem duktusa (kanala),

formiranjem acinusnih pupoljaka i proliferacijom interduktalne strome, javlja se u pubertetu, pod uticajem estrogena i progesterona. Međutim, parenhim dojke sa ćelijskom diferencijacijom dostiže kompletan razvoj tek krajem trudnoće, kada se kompletno razvijaju sekretorni kanalići. Na tome se bazira pretpostavka da je indukcija ćelijske diferencijacije u dojci tokom trudnoće delimično odgovorna za inhibiciju karcinogeneze. U menopauzi, dolazi do regresije acinusa, sa gubitkom intra- i interlobularnog vezivnog tkiva. ^{8, 10}



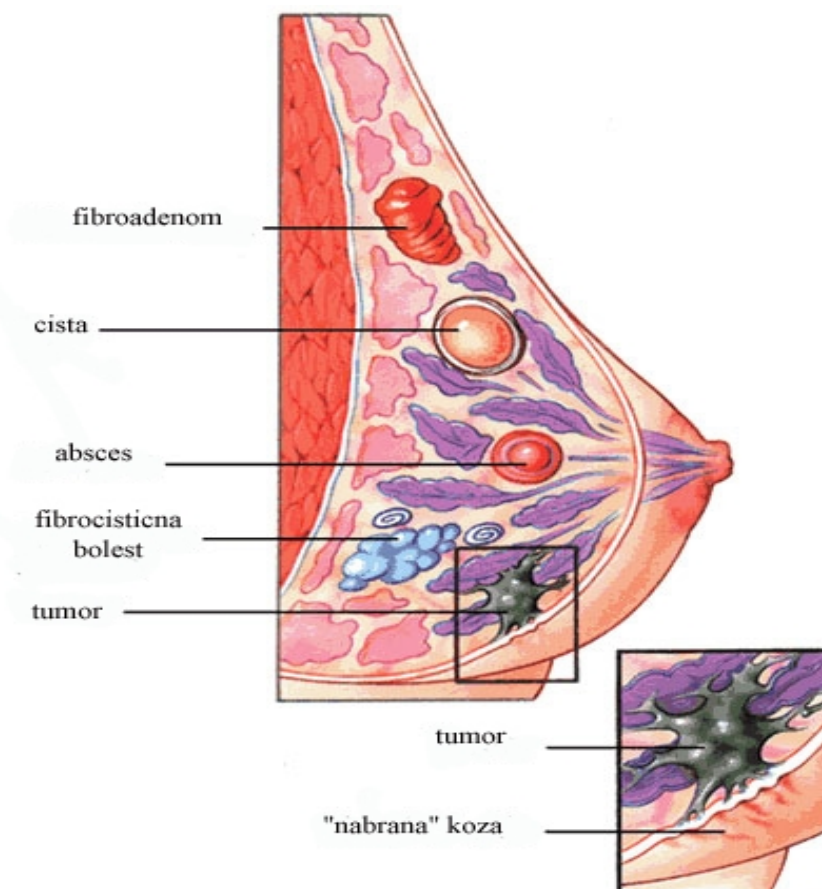
Slika 1.1. Anatomija dojke: 1. zid grudnog koša, 2. grudni mišići, 3. lobulusi; 4. bradavica; 5. areola 6. laktiferni kanal; 7. masno tkivo; 8. koža ¹¹

◇ Organizacija duktalno-lobularnog sistema dojke

Dojku čini 15-20 režnjeva (lobusa) radijalnog pravca pružanja, od bradavice. Svaki režanj se sastoji od 20-40 režnjića (lobulusa), od kojih svaki sadrži 10-100 alveola, koje su sekretorne jedinice dojke. Svaki lobus ima jedan terminalni ekskretorni duktus. Duktusi su promera 2mm i konvergiraju prema subareolarnim laktifernim sinusima ili duktusima, promera 5-8mm. Oko 5-10 glavnih duktusa se završava pojedinačnim otvorima na bradavici. Kuperovi ligamenti se protežu od kože do fascije velikog grudnog mišića i značajni su za pravilan oblik i arhitektoniku tkiva dojke. Skraćenje Kuperovih ligamenata dovodi do retrakcije kože i karakterističnog izgleda njene površine – "kora pomorandže". ^{8, 10}

Određene benigne i maligne promene dojke imaju predilekciju javljanja na pojedinim delovima duktalno-lobularnog sistema. (slika 1.2) Ciste i fibroadenomi se razvijaju

unutar lobulusa, dok se karcinomi najčešće javljaju u terminalnim duktusima. Papilomi i duktektazije se razvijaju u segmentnim duktusima, a klinički se manifestuju sekrecijom iz bradavice. Adenomi bradavice se takođe razvijaju u segmentnim duktusima, na mestu njihovog otvora na bradavici. Pagetova bolest dojke manifestuje se promenama na koži u areolarnoj regiji i bradavici i ukazuje na prisustvo karcinoma.¹⁰



Slika 1.2. Anatomska lokalizacija nekih patoloških procesa u dojci¹²

Vaskularizacija dojke potiče od unutrašnje mamarne arteije (lat. *a. mammaria interna*), koja je grana podključne arterije (lat. *a. subclavia*) i spoljne grudne arterije (lat. *a. thoracica lateralis*), grane pazušne arterije (lat. *a. axillaris*). Unutrašnje grane za dojku (lat. *rr. mammarii interni*) prilaze dojci sa njene unutrašnje i gornje strane. Ove grane nastaju iz probojnih grana (lat. *rr. perforantes*) unutrašnje grudne arterije. Probojne grane koje učestvuju u vaskularizaciji dojke probijaju II, III i IV međurebarni prostor uz ivicu grudne kosti. Spoljne grane za dojku (lat. *rr. mammarii laterales*) podeljene su na gornju i donju grupu. Gornja grupa je za gornji i spoljni deo dojke. Ove grane se pružaju oko donje ivice velikog grudnog mišića, a grane su spoljne grudne arterije. Donju grupu

čine grane zadnjih međurebarnih arterija (lat. *aa. intercostales posteriores*). Gornje grane za dojku polaze iz grudnih arterija (lat. *rr. pectorales*) grudnonatplečne arterije (lat. *a. thoracoacromialis*), a ponekad i direktno iz potključne arterije (lat. *a. subclavia*). Većina grana za dojku prolazi kroz njeno potkožno masno tkivo i račva se na površne grane za kožu i duboke grane koje ulaze u mlečnu žlezdu sa njene prednje strane.

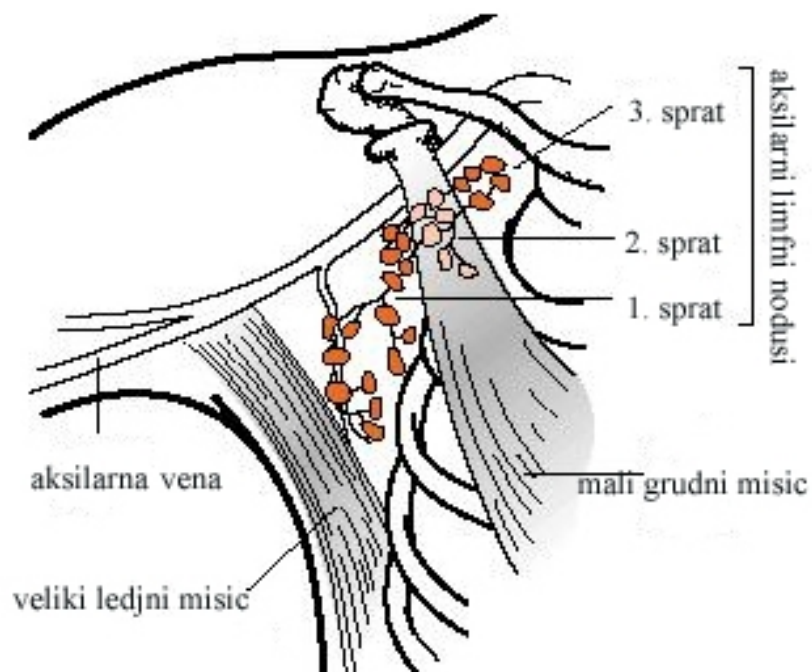
Vene dojke polaze iz površnih i dubokih venskih spletova. Površni venski sudovi se uglavnom ulivaju u bočne grudne vene (lat. *vv. thoracicae lat.*), gornju epigastričnu venu (lat. *v. epigastrica sup.*) i delom u vene baze vrata i anastomoziraju se međusobno, kao i sa dubokim venama dojke. Duboke vene dojke najvećim delom polaze iz mlečne žlezde i završavaju se u unutrašnjim grudnim venama (lat. *vv. thoracicae int.*) i u nekoliko gornjih međurebarnih vena.^{8,9,10}

◇ **Anatomija pazušne jame i limfatici dojke**

Pazušna jama (lat. *axilla*) je sa unutrašnje strane ograničena zidom grudnog koša, prema spolja širokim leđnim mišićem (lat. *m. latissimus dorsi*), sa gornje strane pazušnom venom (lat. *v. axillaris*), pozadi podlopatičnim mišićem (lat. *m. subscapularis*), a sa donje strane presekom prednjeg nazubljenog (lat. *m. serratus anterior*) i širokog leđnog mišića.

Oko 75% limfne drenaže dojke odnosi se na pazušne limfne noduse, a preostalih 25% na unutrašnje mamarne noduse i limfatike kože. Aksila sadrži 30-60 limfnih nodusa, koji su anatomski grupisani u tri sprata, u odnosu na mali grudni mišić (lat. *m. pectoralis minor*). Ova podela je od posebnog kliničkog značaja, u smislu određivanja obima disekcije aksile kod karinoma dojke: I sprat nalazi se upolje od spoljašnje ivice malog grudnog mišića; pozadi i između spoljašnje i unutrašnje ivice mišića je II sprat i unutra od unutrašnje ivice mišića je III sprat. (slika 1.3) Između velikog i malog grudnog mišića (lat. *m. pectoralis major et minor*) smešteni su interpektoralni limfni čvorovi (tzv. Roterovi nodusi). Unutrašnji mamarni nodusi su smešteni u interkostalnim prostorima i parasternalnom regionu. Limfna drenaža se odvija od unutrašnjih mamarnih nodusa prema interkostalnim nodusima, lociranim posteriorno duž kičme, kao i subpektoralno i subdijafragmalno.^{8,10}

Karcinom dojke obično metastazira u aksilarne, unutrašnje mamarne limfne noduse, ređe u supraklavikularne, infraklavikularne i interpektoralne noduse.^{13, 14} Supraklavikularni limfni put je kratak. Od vrha aksile, nekoliko velikih limfnih puteva, posle toka od nekoliko centimetara, uliva se u spoj jugularne vene sa potključnom. Supraklavikularni limfni nodusi nisu palpabilni, jer su duboko položeni, retroklavikularno. Ukoliko postoje palpabilni nodusi supraklavikularno, odgovaraju nodusima duž poprečne vratne arterije (lat. *a. cervicalis transversa*). Ova poslednja grupa nodusa položena je površnije i smatra se da su retrogradno zahvaćeni kada su pravi supraklavikularni nodusi ispunjeni metastazama.^{15,16} Širenje tumora u supraklavikularne noduse je loš prognostički faktor. Potvrđeno je da pacijenti sa metastazama u istostranim supraklavikularnim limfnim nodusima, bilo u sklopu primarne dijagnoze ili kao relaps, imaju jednako nepovoljan ishod bolesti kao i pacijenti sa udaljenim metastazama.¹⁴ Da bi se utvrdio stadijum tumora, potrebna je histološka verifikacija limfnih nodusa.



Slika 1.3. Anatomska lokalizacija limfatika dojke¹⁷

1.3 Benigne promene dojke

Benigne promene dojke se, zavisno od anatomske lokalizacije unutar arborizovanog stabla duktusa, mogu klasifikovati u tri grupe: ^{10, 18}

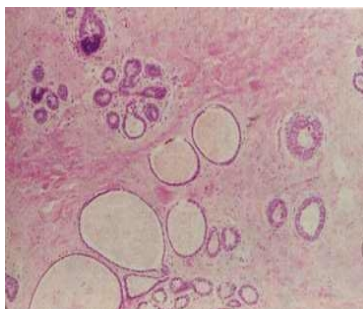
1. promene glavnih duktusa – galaktoreja, galaktokela, duktektazija i papilom;
2. promene terminalnih duktalobularnih jedinica – fibrocistična bolest, cistična formacija, sklerozirajuća adenoza, skleroza strome, epitelna hiperplazija i fibroadenom;
3. ostale benigne promene – akutni mastitis, absces, trauma, hematoma, nekroza masnog tkiva.

Intraduktalni papilom predstavlja neoplastični papilarni rast unutar glavnog duktusa. Često se klinički manifestuju seroznim ili hemoragičkim sekretom iz bradavice, kao i malim subareolarnim tumorima promera nekoliko mm i, retko, retrakcijom bradavice. U benignim papilomima postoje dva ćelijska tipa: epitelne i mioepitelne ćelije. Često je teška diferencijacija benignih papiloma od intraduktalnih papilarnih karcinoma; ipak, u prilog malignoj leziji govori citološka atipija, nepostojanje mioepitelnih ćelija, odsustvo fibrovaskularne strome. ^{10, 18}

Atipična duktalna hiperplazija (ADH) predstavlja formu preinvazivne neoplazme dojke, koja se morfološki graniči sa niskogradusnim DCIS (duktralni karcinom *in situ*). Kvantitativni kriterijumi za diferencijalnu dijagnozu sa DCIS su: veličina iznad 2mm, kao i više od 2 zahvaćena duktusa. Uz ADH često koegzistira DCIS ili invazivni karcinom. ¹⁹

Fibrocistična bolest ili displazija dojke je termin za širok spektar različitih nenormalnosti epitela i strome dojke, od potpuno benignih do onih koje su asocirane sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma. Klinički se često može manifestovati palpabilnim promenama u tkivu dojke. Kod 60-90% žena se tokom rutinskog pregleda ustanovi neki oblik fibrocistične bolesti dojke, od kojih se histološki najčešće opisuju tri oblika: 1. cistična formacija i fibroza; 2. epitelijelna hiperplazija (duktalna i lobularna) i 3. sklerozirajuća adenoza. Od pomenutih entiteta najveći rizik za razvoj karcinoma ima epitelijelna hiperplazija. Progresija od normalne morfologije duktusa, preko umerene i atipične hiperplazije do karcinoma *in situ* prethodi razvoju invazivnog karcinoma. ^{10, 18} Najčešći oblik je prosta fibrocistična promena, koji se karakteriše povećanjem fibrozne strome, udruženo sa stvaranjem cisti usled dilatacije izvodnih kanala. (slika 1.4) Cistične

lezije se klasifikuju na mikrociste (promera do 3mm) i makrociste (promera preko 3mm). Nastaju slivanjem lobularnih acinusa. Neretko se u cistama stvaraju epitelni proliferati u vidu papilarnih izraštaja. Limfocitna infiltracija u stromi je česta u svim formama fibrocistične bolesti.¹⁸



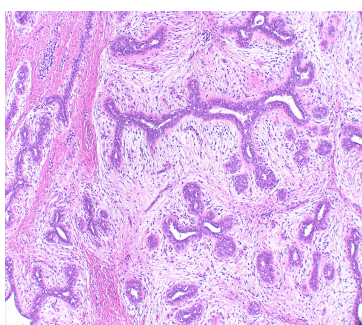
Slika 1.4. Fibrocistična bolest dojke²⁰

Sklerozirajuća adenoza predstavlja povećanje broja i elongaciju duktulusa, uz proliferaciju strome. Prisutna je mioepitelna proliferacija, ali bez znakova atipije. U žlezdanim lumenima česte su mikrokalcifikacije. Polje sklerozirajuće adenoze može imati i hrskavičavu konzistenciju, što klinički može davati utisak malignog tumora.¹⁸

Epitelna hiperplazija predstavlja proliferaciju epitelnih ćelija unutar žlezdanih struktura. Predstavlja rizik na razvoj karcinoma i često je diskutabilna granica između benigne hiperplazije i duktalne ili lobularne neoplazije. Kod epitelne hiperplazije luminalni prostori između proliferisanih ćelija su nepravilni, često pukotinasti, izgledaju "kompresibilno". Periduktalna fibroza i hronična inflamacija, kao i nekroza i krvavljenje su retki. Karakteristična je polimorfna ćelijska populacija, sastavljena od epitela, mioepitelnih ćelija i limfocita. Međutim, ne postoji citološka slika maligniteta, jedarca su neupadljiva, mitoze veoma retke.¹⁸

Fibroadenom je najčešći benigni tumor ženske dojke. Najčešće se dijagnostikuje kod mlađih žena. Istraživanja su potvrdila da žene sa fibroadenomom imaju 2-3 puta veći rizik da obole od karcinoma.²¹ U prilog tome govori i prisutna hiperplazija u okolnom parenhimu fibroadenoma. Razvoj fibroadenoma kod mlađih žena, dakle, može ukazivati na povećan rizik za karcinom.²¹ Fibroadenom je fibroepitelni tumor, sastavljen od fibroznog i glandularnog tkiva. Manifestuje se kao oštro ograničena, bezbolna, pokretna masa, najčešće veličine 2-4cm u prečniku, ali mogu biti i znatno većeg promera i može

nastaviti sa rastom pod dejstvom hormona tokom trudnoće. U starijih žena, fibroadenom podleže nekrozi sa formiranjem grubih, tzv. "pop-corn" kalcifikacija.^{10, 22} Histološki se opisuju dva tipa fibroadenoma: perikanalikularni, u kome stroma okružuje umnožene žlezdane elemente i intrakanalikularni, u kome je vezivnotkivna stroma mnogo izraženija i vrši kompresiju i deformaciju žlezdanih tvorevina, a posledica kompresije su kolabirani, pukotinasti žlezdani lumeni, sa epitelnim ćelijama u vidu uskih traka koje leže unutar fibrozne strome. (slika 1.5) U fibroadenomima se retko mogu naći i druga tkiva – masno, hrskavičavo, koštano, glatkomišićno.¹⁸



Slika 1.5. Fibroadenom²³

Akutni mastitis je najčešće bakterijske etiologije, najčešće nastaje tokom prve tri nedelje laktacije, usled oštećenja površinskog epitela dojke i nastalih ragada i fisura u predelu areole i mamile. Obično počinje kao serozno zapaljenje (dojka je uvećana, čvrsta i bolna, cela ili samo jedan njen deo), koji može preći u gnojni mastitis, sa obilnom granulocitnom infiltracijom intersticijuma i degenerativno-nekrotičnim promenama na epitelu acinusa. *Staphylococcus* obično izaziva lokalizovana zapaljenja, kada može doći do stvaranja abscesa, dok *streptococcus* izaziva difuzni inflamatorni proces. Tokom sanacije inflamatornog procesa, dolazi do fibroziranja i stvaranja lokalnog polja čvrste konzistencije, što može biti praćeno retrakcijom bradavice i neravninama na koži, čime klinički može simulirati karcinom.¹⁸

Nekroza masnog tkiva se često javlja sa bolom i podacima o traumi. U ranoj fazi može doći samo do krvavljenja, a kasnije nastaje centralna likvefakcija masti. Dolazi do fagocitoze nekrotičnog materijala i pojačane fibroblastne proliferacije i nakupljanja kalcijuma. Kao čvrsta masa sa retrakcijom kože, usled ožiljavanja, kao i zbog prisutnih kalcifikacija, nekroza masnog tkiva može klinički podsećati na karcinom.¹⁸

Inflamatorni pseudotumor dojke je redak patološki entitet. Klinički se najčešće manifestuje kao nodularna lezija, a radiološki se teško diferencira od karcinoma. Citološki nalaz nakon aspiracione biopsije ukazuje na postojanje gnezda dukalnog epitela, u inflamatornom okruženju, sastavljenom od fibrovaskularne strome, sa infiltracijom plazma-ćelija i limfocita. Postoji nekoliko histoloških varijeteta: inflamatorni tip (*plasma cell* granulom), celularni tip (inflamatorni miofibroblastični tumor) i hipocelularni tip (lezija nalik ožiljku, "scar-like" lezija).²⁴

1.4 Maligne promene dojke

Karcinomi dojke su klasifikovani u nekoliko tipova:

1. **duktalni karcinom** (lat. *ductal cell carcinoma*) sa podtipovima:

- ◇ invazivni (infiltrativni)
- ◇ mucinozni (koloidni)
- ◇ tubularni
- ◇ papilarni
- ◇ medularni

2. **lobularni karcinom** (lat. *lobular carcinoma*)

- ◇ invazivni (infiltrativni)

3. **maligni tumori porekla strome:**

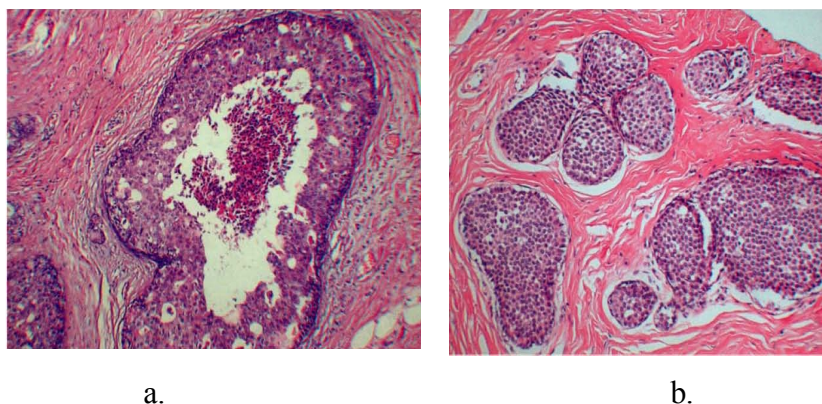
- ◇ maligni filodni tumor (lat. *phyllodes*)
- ◇ angiosarkom dojke

4. **inflamatorni karcinom dojke**

Neinvazivni (in situ) intraduktalni karcinom (DCIS) je najčešća forma *in situ* karcinoma dojke, sa velikim ćelijama koje često formiraju lumene (slika 1.6a). Ipak, one se mogu proširiti kroz duktalni sistem. Duktalni karcinom *in situ* histološki je klasifikovan u pet subtipova: komedokarcinom; solidni; kribriformni; papilarni i mikropapilarni. Komedokarcinom je DCIS visokog nuklearnog gradusa i dijagnostikuje se citološki, na osnovu malignih karakteristika jedra i povezan je sa tzv. "comedo" nekrozom unutar proširenih duktusa. Nasuprot, DCIS niskog gradusa se karakteriše

rastom relativno uniformnih ćelija, bez značajne nekroze i javlja se u formi kribriformnog i mikropapilarnog karcinoma.^{10,25}

Neinvazivni (*in situ*) lobularni karcinom (LCIS) se manifestuje proliferacijom dobro diferenciranih tumorskih ćelija u terminalnim duktusima (slika 1.6b). Oko 30% LCIS evoluiru u invazivni karcinom, često nakon mnogo godina. LCIS, za razliku od DCIS, skoro nikad ne formira detektabilnu leziju, već se obično otkriva incidentalno, kada koegzistira sa lezijama koje formiraju masu, kao što je fibroadenom ili sklerozirajuća adenoza. Kalcifikacije nisu indikativne za LCIS, a ukoliko postoje, češće su prisutne u okolnom, normalnom tkivu dojke, uz LCIS, nego u samoj neoplazmi. Važna razlika LCIS u odnosu na DCIS je ta što se LCIS mnogo češće javlja bilateralno i kao multifokalna bolest.²⁶



Slika 1.6. a. Duktalni karcinom *in situ* (DCIS) b. Lobularni karcinom *in situ* (LCIS)¹⁰

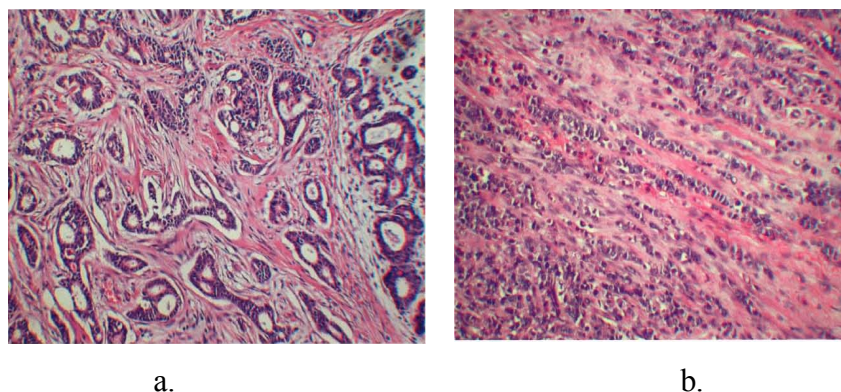
Invazivni duktalni karcinom potiče od epitelijelnih ćelija koje oblažu duktuse i histološki se karakteriše vrpčastim ili gnezdastim rasporedom malignih ćelija, koje su probile bazalnu membranu. (slika 1.7a) Klinički, invazivni duktalni karcinom determinišu: ćelijski tip, veličina tumora, gradus tumora, metastaze u limfnim nodusima, kao i prognostički faktori, koji uključuju hormonske receptore i pojačanu ekspresiju onkogeni.²⁵

- ◇ *Tubularni karcinom* je manje uobičajena varijanta invazivnog duktalnog karcinoma, dobro diferencirani, tubularne formacije. Prosečna veličina ovog tumora je oko 1cm i može se prevideti, s obzirom na nisku stopu mitoze i dobru ćelijsku diferencijaciju. Ipak, za razliku od benignih lezija, imaju angulirane konture i reaktivnu stromu i često invadiraju masno tkivo. Takođe,

imunohistochemijskim bojenjem potvrđuje se nedostatak mioepitelijelnih ćelija. Najčešće se javlja u peri- i postmenopauzi i ima odličnu prognozu.²⁵

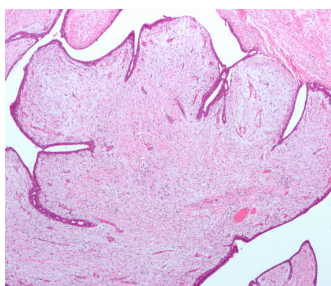
- ◇ *Mucinozni (koloidni) karcinom* je češća forma dobro diferentovanog duktalnog karcinoma, takođe najčešće u postmenopauzi. Manifestuje se kao tipična masivna želatinozna masa. Mikroskopski, karcinom je u obliku malih grozdastih formacija dobro diferentovanih ćelija, koje plutaju u mucinu.²⁵
- ◇ *Medularni karcinom* se karakteriše velikim, atipičnim, slabo diferentovanim ćelijama. Oštro su konturisan, što je u korelaciji sa mikroskopskim nalazom više napetih, a manje infiltrativnih ivica. Karakteristično je prisustvo limfocitnog infiltrata na periferiji tumora. Relativno je čest u žena sa mutacijom BRCA1 gena.²⁷

Invazivni lobularni karcinom je histološki predstavljen pojedinačnim ili nizovima tumorskih ćelija koji se protežu kroz fibrozni matiks dojke i ne formira grozdaste ili tubulske strukture. (slika 1.7b) Često je teško diferencirati lobularni od duktalnog karcinoma i u spornim slučajevima koristan je molekularni marker – nedostatak ekspresije E-kadherina kod lobularnog karcinoma, koji je najverovatnije i odgovoran za slabu kohezivnost ćelija u lobularnom karcinomu. U komparaciji sa duktalnim karcinomom, lobularni ima tendenciju multicentričnog javljanja u dojci, kao i metastaziranja u udaljene sisteme i organe (gastrointestinalni sistem, ovarijumi). Značajno je da su metastaze lobularnog karcinoma često okultne i stopa preživljavanja je slična kao za duktalni karcinom.^{10, 28}



Slika 1.7. a. Invazivni duktalni karcinom b. Invazivni lobularni karcinom¹⁰

Filodni tumori predstavljaju kombinovane epitelijelne i stromalne proliferacije dojke, sa povećanom stromalnom celularnošću, sa karakterističnim pukotinastim prostorima (slika 1.8). Obično su oštro ograničeni i veoma podsećaju na fibroadenome, mada najčešće dosežu veće dimenzije. Takođe, obično se javljaju kasnije u odnosu na uobičajenu pojavu fibroadenoma; dok se fibroadenom pretežno javlja u mlađoj životnoj dobi, filodni tumori su karakteristični za perimenopauzalno doba (između 40. i 50. godine). Mikroskopski, filodni tumori su sastavljeni od hipercelularne strome i benignih glandularnih elemenata; stroga diferencijacija između benignih i malignih filodnih tumora je često nemoguća. Tumori koji mikroskopski podsećaju na fibroadenome sa celularnom stromom (bez atipije), imaju benigni klinički tok; povećana celularnost u ovim tumorima koncentriše se periduktalno, u vidu fibroblastne proliferacije, uz sporadično prisustvo masnog tkiva. U malignoj formi filodnih tumora, dolazi do prerastanja glandularnog tkiva stromom malignih karakteristika, uključujući jedarnu atipiju i brojne mitoze. Maligni filodni tumori mogu sadržati pleomorfne stromalne elemente, kao što su hrskavica ili kost.²⁹



Slika 1.8: Filodni tumor³⁰

Angiosarkom dojke je maligni tumor, tipičan za mlađu životnu dob i predstavlja meku, nekalcifikovanu masu. Karakteriše se anastomozirajućom mrežom nepravilnih vaskularnih kanala, sa atipičnim endotelijelnim ćelijama. Potvrđeno je da se učestalije javlja u ozračenju dojci i ima lošu prognozu.³¹

Inflamatorni karcinom dojke je retka, ali veoma agresivna forma karcinoma dojke, koja se obično dijagnostikuje na osnovu prisustva tipičnih kliničkih simptoma: crvenilo, otok i povećana lokalna temperatura. Ovi simptomi su često povezani sa patološkim nalazom invazije kožnih limfatika. Moguća je i invazija kožnih limfatika u odsustvu

kliničkih znakova i simptoma, kada je reč o tzv. okultnom inflamatornom karcinomu, sa lošom prognozom.^{32,33}

1.5 TNM klasifikacija karcinoma dojke

U tabeli 1.1 dat je pregled TNM klasifikaciji karcinoma dojke³².

Tabela 1.1 TNM klasifikacija karcinoma dojke³²

PRIMARNI TUMORI (T)	
TX	primarni tumor se ne može potvrditi
T0	primarni tumor nije evidentiran
Tis	carcinoma <i>in situ</i>
Tis (DCIS)	Ductal carcinoma <i>in situ</i>
Tis (LCIS)	Lobular carcinoma <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Pagetova bolest bradavice, bez tumora (napomena: Pagetova bolest povezana sa tumorom klasifikuje se prema veličini tumora)
T1	najveći dijametar tumora je ≤ 2 cm
T1mic	mikroinvazija: najveći dijametar tumora je ≤ 0.1 cm
T1a	najveći dijametar tumora je 0.1 cm - 0.5 cm
T1b	najveći dijametar tumora je 0.5 cm - 1 cm
T1c	najveći dijametar tumora je 1 cm - 2 cm
T2	najveći dijametar tumora je 2 cm - 5 cm
T3	najveći dijametar tumora je ≥ 5 cm
T4	tumor bilo koje veličine sa direktnim širenjem na:
T4a	širenje na zid grudnog koša, bez zahvatanja grudnog mišića
T4b	edem (koji uključuje izgled kože dojke kao "kora pomorandže") ili ulceracije kože dojke ili satelitski kožni nodulusi u istoj dojci
T4c	T4a+T4b
T4d	inflamatorni karcinom
REGIONALNI LIMFNI NODUSI (N)	
NX	zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa se ne može potvrditi
N0	nema metastaza u regionalnim limfnim nodusima
N1	metastaze u pokretnim ipsilateralnim aksilarnim limfnim nodusima
N2	metastaze u ipsilateralnim fiksiranim aksilarnim limfnim nodusima ili u klinički aparentnim ipsilateralnim unutrašnjim mamarnim nodusima, u odsustvu klinički evidentnih metastaza u aksilarnim limfnim nodusima
N2a	metastaze u ipsilateralnim aksilarnim limfnim nodusima, fiksiranim međusobno ili za ostale strukture
N2b	metastaze samo u klinički aparentnim ipsilateralnim unutrašnjim mamarnim nodusima i u odsustvu klinički evidentnih metastaza u aksilarnim limfnim nodusima

N3	metastaze u ipsilateralnim infraklavikularnim limfnim nodusima, ili u klinički aparentnim ipsilateralnim unutrašnjim mamarnim nodusima i u prisustvu klinički evidentnih metastaza aksilarnih limfnih nodusa, ili metastaze u ipsilateralnim supraklavikularnim limfnim nodusima sa ili bez zahvatanja aksilarnih ili unutrašnjih mamarnih nodusa
N3a	metastaze u ipsilateralnim infraklavikularnim i aksilarnim limfnim nodusima
N3b	metastaze u ipsilateralnim unutrašnjim mamarnim i aksilarnim nodusima
N3c	metastaze u ipsilateralnim supraklavikularnim nodusima
	Regionalni limfni nodusi (pN); klasifikacija bazirana na disekciji aksilarnih nodusa, sa ili bez disekcije <i>sentinel</i> nodusa
pNX	zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa se ne može potvrditi
pN0	histološki bez metastaza u regionalnim nodusima
pN0(i-)	histološki bez metastaza u regionalnim nodusima, negativna imunohistohemija (IHC)
pN0(i+)	histološki bez metastaza u regionalnim nodusima, pozitivna IHC
pN0(mol-)	histološki bez metastaza u regionalnim nodusima, negativni molekularni nalazi (RT-PCR)
pN0(mol+)	histološki bez metastaza u regionalnim nodusima, pozitivni molekularni nalazi (RT-PCR)
pN1mi	mikrometastaze (0.2 mm - 2.0 mm)
pN1	metastaze u 1-3 aksilarna i/ili unutrašnja mamarna nodusa, klinički neaparentne, ali detektovane u <i>sentinel</i> nodusima
pN1a	metastaze u 1-3 aksilarna nodusa
pN1b	metastaze u unutrašnjim mamarnim nodusima, klinički neaparentne, ali detektovane u <i>sentinel</i> nodusima
pN1c	metastaze u 1-3 aksilarna i/ili unutrašnja mamarna nodusa, klinički neaparentne, ali detektovane u <i>sentinel</i> nodusima
pN2	metastaze u 4-9 aksilarnih nodusa ili u klinički aparentnim unutrašnjim mamarnim nodusima u odsustvu metastaza u aksilarnim nodusima
pN2a	metastaze u 4-9 aksilarnih nodusa (najmanje jedan tumorski deposit >2.0 mm)
pN2b	metastaze u klinički aparentnim unutrašnjim mamarnim nodusima u odsustvu metastaza u aksilarnim nodusima
pN3	metastaze u 10 ili više aksilarnih nodusa ili u infraklavikularnim nodusima ili u klinički aparentnim ipsilateralnim unutrašnjim mamarnim nodusima u prisustvu jednog ili više pozitivnih aksilarnih nodusa ili u više od 3 aksilarna nodusa i negativnim unutrašnjim mamarnim nodusima ili u ipsilateralnim supraklavikularnim nodusima
pN3a	metastaze u aksilarnim nodusima (najmanje jedan tumorski deposit >2.0 mm) ili metastaze u infraklavikularnim nodusima
pN3b	metastaze u klinički aparentnim unutrašnjim mamarnim nodusima u prisustvu jednog ili više pozitivnih aksilarnih nodusa ili u više od 3 aksilarna nodusa i u unutrašnjim mamarnim nodusima, sa mikroskopskom bolešću detektovanom disekcijom <i>sentinel</i> nodusa, ali klinički neaparentnom
pN3c	metastaze u ipsilateralnim supraklavikularnim nodusima

UDALJENE METASTAZE (M)	
MX	udaljene metastaze se ne mogu potvrditi
M0	bez udaljenih metastaza
M1	udaljene metastaze

1.6 Klinički stadijumi karcinoma dojke

U zavisnosti od veličine primarnog tumora, kao i proširenosti maligne bolesti na regionalne limfne noduse i/ili u udaljene sisteme i organe, karcinom dojke je klinički klasifikovan u stadijume: 0, I, II, III, IV (tabela 1.2).³⁵

Primarno hirurško lečenje karcinoma dojke jednom od pošteđenih hirurških intervencija ili modifikovanom radikalnom mastektomijom, indikovano je kod bolesnica sa tumorom u stadijumu 0 (neinvazivni karcinom manji od 0,1 cm), stadijumu I (T1, N0, M0), stadijumu II A (T0-1, N1, M0 ili T2, N0, M0) i stadijumu II B (T2, N1, M0 ili T3, N0, M0).³⁶

Tabela 1.2 Klinički stadijumi karcinoma dojke

stadijum	opis stadijuma
0	abnormalne ćelije koje oblažu duktuse dojke; neinvazivni, <i>in situ</i> karcinom povećan rizik za razvoj karcinoma u obe dojke
I	tzv. rani stadijum; karcinom manji od 2 cm u prečniku; limfni nodusi nisu zahvaćeni
II	tumor manji od 2 cm, ali proširen na limfne noduse aksile · u dojci nema tumora, ali su ćelije karcinoma dojke nađene u limfnim nodusima aksile · tumor je veličine od 2 do 5 cm i može, a ne mora biti proširen na limfne noduse aksile · tumor je veći od 5 cm, ali nije proširen na limfne noduse
III	IIIA: tumor je veći od 5 cm i proširen je na aksilarne noduse, koji su priljubljeni jedan uz drugi ili za okolno tkivo IIIB: tumor bilo koje veličine proširen na tkiva u blizini dojke – kožu, mišiće grudnog koša, kao i na aksilarne noduse; uključuje i inflamatornu bolest dojke, retku, ali agresivnu formu karcinoma dojke IIIC: tumor bilo koje veličine proširen na: · 10 ili više aksilarnih limfnih nodusa · limfne noduse iznad ili ispod klavikule i noduse na vratu · limfne noduse unutar same dojke i na aksilarne limfne noduse
IV	širenje karcinoma izvan regije dojke, u udaljene regije (pluća, jetra, kosti, mozak)

1.7 Uloga imunskog sistema u malignim bolestima; imunski status bolesnica sa karcinomom dojke

Na ulogu imunskog sistema u kontroli maligne transformacije ukazano je još u prvoj polovini XX veka, kada je eksperimentalno ustanovljeno imunološko odbacivanje tumorskih transplantata u miševa. ³⁷ U protekloj deceniji, zahvaljujući značajnom razvoju tumorske imunologije, identifikovani su tumorski proteini koji mogu stimulisati imunost pacijenata sa tumorom, čime je pokazano da tumori mogu biti imunogeni. ³⁸

Karcinom ne predstavlja samo prostu masu mutiranih ćelija, već sadrži različite tipove ćelija koje sa njima stupaju u interakciju, kao što su: fibroblasti, epitelne ćelije, vaskularne, mezenhimalne ćelije, kao i ćelije urođene i stečene imunosti. ^{39,40} Potvrđeno je da su i tumori dojke infiltrirani različitim populacijama ćelija imunskog sistema, uključujući T ćelije, B ćelije, ćelije prirodne ubice (*engl.* natural killer, NK) i makrofage. ⁴¹

Karcinom, dakle, može biti „osetljiv” na regulaciju posredovanu imunskim ćelijama, pogotovo u prvom stadijumu svog razvoja, kada je tumorska masa mala. Kada je tkivna homeostaza poremećena, tzv. rezidentni makrofagi i mast-ćelije promptno sekretuju medijatore – citokine, hemokine, matriksne proteaze, histamin, koji indukuju mobilizaciju dodatnih imunskih ćelija u oštećeno tkivo. Dendritske ćelije (DC) „prihvataju” strane antigene, migriraju do limfoidnih organa, gde ih prezentuju ćelijama stečenog imunskog odgovora. Funkcionalni antitumorska imunost podrazumeva imunski odgovor posredovan antigen-prezentujućim ćelijama (APC) i različitim efektorskim ćelijama, kao što su citotoksični T limfociti (CTL), pomoćnički T limfociti, kao i B ćelije. ³⁸

Sa druge strane, poznat je niz mehanizama kojima tumor izbegava kontrolu imunskog sistema domaćina mogućim indirektnim procesima koji podrazumevaju: gubitak ekspresije tumorskih antigena ili njihovu neadekvatnu prezentaciju; toleranciju na tumorske antigene; selekciju mutantnih tumorskih ćelija; blokirajuće faktore (membranski antigeni tumora, otpušteni u vanćelijsku tečnost, rastvorljivi kompleksi tumorskih antigena (Ag) i antitela (At), a možda i sama At, mogu delovati kao faktori koji na različite načine blokiraju efikasnu antitumorsku odbranu); fenomen povlačenja

(rezultat je neusklađenosti brzine rasta tumora i vremena potrebnog za razvoj imunskog odgovora); povećanu ekspresiju regulatornih proteina komplementa (RPK) u malignim ćelijama, što dovodi do rezistencije malignog tkiva na oštećenje posredovano komplementom, omogućavajući tumorskim ćelijama da izbegnu citolizu; dejstvo imunosupresivnih citokina: TGF-beta, interleukin (IL)-10; tumorsku produkciju endotelnog faktora rasta krvnih sudova (*engl.* vascular endothelial growth factor, VEGF), koja može sprečiti sazrevanje DC.^{37, 42} U odnosu na imunske mehanizme koje indukuju, tumorski antigeni se dele na one koje predominantno prepoznaju T limfociti i one koje predominantno prepoznaju antitela.⁴³

Na osnovu antigenske specifičnosti i vremena aktivacije, razlikujemo dva oblika imunskog odgovora: tzv. urođeni ili prirodni i stečeni ili adaptivni ćelijski odnosno humoralni imunski odgovor. Komponente urođenog ćelijskog imunskog odgovora – DC, NK ćelije, makrofagi, neutrofil, bazofili, eozinofili i mast-ćelije, a dodatno i humoralnog imunskog odgovora, kao i proteini sistema komplementa, predstavljaju tzv. prvu liniju odbrane. Jedinstvena karakteristika prirodnog imunskog odgovora, po kome se on razlikuje od stečenog imunskog odgovora, jeste promptni odgovor na patogene, nezavisno od njihove antigenske specifičnosti i bez prethodne senzibilizacije na njih. Aktivacija urođenog imunskog odgovora vodi aktivaciji sofisticiranijih oblika specifičnog, adaptivnog imunskog odgovora.⁴⁴

Komponente urođenog i adaptivnog imunskog sistema mogu imati ambivalentan uticaj na razvoj karcinoma, tj. mogu podsticati, ali i inhibisati njegov rast. Naime, ćelije urođenog imunskog sistema mogu delovati direktno i indirektno. Direktni mehanizmi uključuju indukciju oštećenja DNA, pre svega generisanjem slobodnih radikala, dok indirektni mehanizmi podrazumevaju dejstvo citokina, hemokina, metaloproteinaza matriksa, podsticanje angiogeneze i tkivno remodelovanje putem produkcije faktora rasta, kao i supresiju antitumorskog adaptivnog imunskog odgovora (tumorsko izbegavanje imunskog nadzora). Ćelije adaptivnog imunskog sistema mogu inhibisati rast tumora direktno, antitumorskom aktivnošću citotoksičnih T ćelija, kao i posredstvom citokina. Sa druge strane, mogu uticati na rast tumora aktivnošću regulatornih T ćelija koje suprimiraju antitumorski odgovor T ćelija, kao i humoralnim imunskim odgovorom koji pojačava hroničnu inflamaciju u tumorskom okruženju.⁴⁵ Tumorsko mikrokruženje ima ključnu ulogu u nastanku, progresiji i metastatskoj

diseminaciji karcinoma.⁴⁶ Stromalni fibroblasti, miofibroblasti, endotelijalne i imunske ćelije iz tumorskog okruženja obezbeđuju faktore rasta, proteaze, kao i angiogeni potencijal neophodan za rast tumora.^{47, 48} VEGF je najznačajniji citokin koji podstiče angiogenezu i razvoj tumora.³⁹ Pokazano je i da tumor može pokrenuti progenitorske ćelije iz kostne srži u cilju pokretanja angiogeneze.⁴⁹ Pretpostavlja se da interakcije između tumora i sredine dovode do promena u proteomu, posebno u ranom stadijumu razvoja tumora. Vršena su poređenja proteina plazme miševa koji imaju tumor sa proteomskim i analizama genske ekspresije ćelija humanog karcinoma dojke i Her2/neu-indukovanim tumorima dojke. Među proteinima čija se količina povećavala u plazmi miševa, više od polovine je identifikovano u ćelijskim linijama humanog karcinoma dojke i za oko 80% je potvrđen porast genske ekspresije u Her2/neu tumorima dojke. Ovi nalazi ukazuju da je sam tumor verovatno izvor nekih izmenjenih proteina nađenih u plazmi miševa. Pored toga, posle samo 5 nedelja Her2/neu onkogene aktivnosti uočene su ekstenzivne neoplastične promene duž dukalnog stabla. Iako su lezije bile klinički nedektabilne, značajne promene u proteomu plazme su već vidljive. Ove promene reflektuju akutnu fazu odgovora, pokretanje makrofaga i neutrofila, remodelovanje ekstraćelijskog matriksa (ECM) i, potencijalno, proteine nastale iz samog tumora. Generalno, proteomske promene u plazmi koje nastaju tokom razvoja karcinoma potiču iz različitih izvora: nespecifičnih sistemskih reakcija, od drugih odgovora od strane domaćina, specifičnih za karcinom dojke, ali ne potiču od samog tumora, kao i proteini koji potiču direktno od tumora i lokalnog tumorskog okruženja.⁴⁶ Generalno, proteomske promene u plazmi koje nastaju tokom razvoja karcinoma potiču iz različitih izvora: nespecifičnih sistemskih reakcija, od drugih odgovora od strane domaćina, specifičnih za karcinom dojke, ali ne potiču od samog tumora, kao i proteini koji potiču direktno od tumora i lokalnog tumorskog okruženja. Mnoge od alteracija proteoma plazme nisu detektovani u inflamaciji, što ukazuje da su verovatno povezani sa ranim stadijumom karcinoma. Porast nekih od ovih proteina u plazmi korelira sa veličinom tumora i rapidno opada nakon onkogene deindukcije, ukazujući da prate rast tumora.⁴⁶

NK ćelije predstavljaju prvu liniju odbrane protiv tumorskih ćelija. Predstavljaju 10-15% limfocita periferne krvi. Za razliku od CTL, ove ćelije liziraju obolele ćelije bez prethodne senzibilizacije. Većina NK ćelija eksprimira CD16 i CD56 antigene (uz

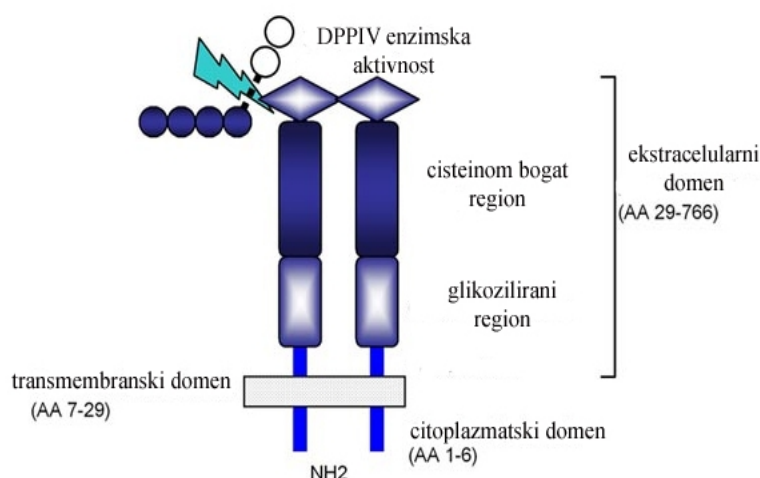
odsustvo CD3 antigena).⁵⁰ NK ćelije poseduju dvostruku citolitičku aktivnost: jedna se odnosi na ćelijsku citotoksičnost zavisnu od antitela – ADCC, a druga na spontanu, MHC-nezavisnu citotoksičnost. ADCC reakcija je karakteristična za CD16⁺ NK ćelije, budući da CD16 antigen, kao transmembranski protein, predstavlja receptor za Fc region imunoglobulina IgG1 i IgG3. Na značaj NK ćelijske antitumorske aktivnosti indirektno ukazuje i značajno smanjenje NK citotoksičnosti u pacijenata sa tumorima, uključujući i tumore dojke, u poređenju sa zdravim osobama.⁵¹ Tzv. CD klasifikacija NK ćelija podrazumeva koekspresiju Fc γ receptora III (CD 16), kao i izoformu humanog neuralnog molekula ćelijske adhezije (CD56).⁵² Pokazano je da CD56⁺ limfociti imaju glavnu ulogu u imunskom nadzoru i antitumorskom odgovoru.⁵³ Tzv. CD56^{dim} ćelije, koje ekspimiraju visok nivo CD16 poseduju veću citotoksičnost od CD56^{bright}, koje ekspimiraju nizak nivo CD16. Pokazano je da CD56^{bright} subpopulacija, koja predstavlja oko 10% cirkulišućih NK ćelija i ima sposobnost produkcije brojnih citokina, predstavlja prekursore CD56^{dim} NK ćelija i može biti od značaja u ranom imunološkom odgovoru, u smislu koordinacije između prirodnog i stečenog imuniteta. Iako NK ćelije u perifernoj krvi predstavljaju samo mali deo ukupnog broja NK ćelija prisutnih u telu, porast njihovog broja u krvi je u vezi sa pojačanim imunskim nadzorom.⁵² Većina (>95%) NK ćelija periferne krvi pripada CD56^{dim}CD16⁺ citolitičkim NK ćelijama, dok ostatak (<5%) predstavljaju CD56^{bright}CD16⁻ ćelije. NK ćelije, CD56^{bright}CD16⁻ više nego CD56^{dim}CD16⁺, produkuju citokine, u cilju zaštite od infektivnih agenasa i tumora.⁵⁴ Analizom učestalosti NK ćelija u limfocitima periferne krvi bolesnica sa karcinomom dojke, potvrđen je značajan porast u procentu ukupnih NK ćelija u invazivnom duktalnom karcinomu u odnosu na grupu zdravih. Sa druge strane, kod ostalih tipova karcinoma uočen je pad u procentu ukupnih NK ćelija, u poređenju sa zdravom grupom. U slučaju aktiviranih NK ćelija (CD56⁺) primećen je njihov porast, kako u duktalom invazivnom karcinomu, tako i u ostalim tipovima karcinoma dojke u poređenu sa zdravom grupom. Što se tiče učestalosti NK ćelija unutar intratumorskih lezija, nije uočena značajna razlika u njihovom prisustvu unutar invazivnog duktalnog karcinoma i ostalih tipova tumora, u odnosu na benigne lezije. Neki autori ukazuju da NK ćelije periferne krvi ne ukazuju na vezu tumora i domaćina, kao i da ćelijska imunost (u perifernoj krvi) ne korelira uvek sa prognozom. Takođe, funkcionalne analize tumor-infiltrujućih limfocita (TIL) i limfocita periferne krvi (*engl.*

peripheral blood lymphocytes, PBL), ukazuju da je ćelijska imunost "nishedno regulisana" unutar samog tumora, dok citotoksični imunski odgovor, kao deo ćelije imunosti, predominantno postoji u perifernoj krvi.⁵⁵

CD89 (FcalphaRI) je transmembranski glikoprotein, eksprimiran na neutrofilima, eozinofilima, monocitima, makrofagima. Predstavlja imunoreceptor koji se vezuje za Fc fragment IgA antitela.^{56, 57} Subpopulacija imunskih ćelija sa CD89 receptorom za Fc fragment alfa imunoglobulina, može da omogući uništavanje ćelija ADCC mehanizmom, pri čemu bi IgA imunoglobulin mogao da bude aktivno antitelo, čime se omogućava veza između ćelijskog i humoralnog imunskog sistema, koja dovodi do brojnih imunoloških efektorskih funkcija, uključujući, osim ADCC reakcije, fagocitozu, kao i otpuštanje inflamatornih medijatora i citokina.⁵⁸ Posebno je ukazano na značaj humanih IgA antitela u pokretanju neutrofila za ADCC. Eksperimentalno je potvrđeno da je FcalphaRI receptor efikasan pokretački molekul u citolizi posredovanoj neutrofilima, kao i da neutrofilima imaju citolitičko dejstvo na širok spektar tumorskih ćelija, kao i da FcalphaRI antitela (IgA) indukuju pojačano uništavanje Her2/neu+ ćelije karcinoma dojke.⁵⁹

1.8 Dipeptidil-peptidaza IV (DPPIV)

Dipeptidil-peptidaza IV (DPPIV) ili CD26 je glikoprotein od 110 kD, eksprimiran na površini epitelijelnih ćelija pankreasa, jetre, creva, bubrega, prostate, lakrimalnih, salivarnih i znojnih žlezda, kao i na ćelijama imunskog sistema: T i B limfocitima, NK ćelijama, makrofagima. Analizom izolovane CD26 komplementarne DNA (cDNA) potvrđeno je da predstavlja tip II transmembranskog proteina, koji se sastoji od 766 amino-kiselina i pripada familiji serin-proteaza.⁶⁰⁻⁶³ CD26/DPPIV se sastoji od kratkog citoplazmatskog domena od 6 amino-kiselina, transmembranskog regiona i ekstracelularnog domena sa dipeptidil-peptidaznom IV (enzimskom) aktivnošću (slika 1.9).⁶⁴



Slika 1.9. Šematski prikaz strukture CD26 ⁶⁴

CD26 se vezuje za adenzin-deaminazu (ADA), enzim koji ima ključnu ulogu u razvoju i funkciji limfoidnih tkiva. ADA je dominantno citoplazmatski protein, ali je prisutan i na ćelijskoj površini kao ekto-enzim (ecto-ADA). U mononuklearnim ćelijama periferne krvi, ecto-ADA je prisutan na većini monocita i B ćelija, kao i na 10-20% T ćelija. Funkcija ADA-e na ćelijskoj površini je da reguliše nivo ekstraćelijskog adenzina ili deoksiadenozina, koji su toksični za limfocite. Gubitak ili urođeni deficit ADA-e, uzrokovan mutacijama u ADA genu dovodi do tzv. teške kombinovane imunodeficijencije. ADA na ćelijskoj površini ima i ekstraenzimsku aktivnost; putem interakcije sa ADA-vezujućim proteinom CD26 može imati kostimulatorni efekat u T ćelijskoj aktivaciji posredovanoj T ćelijskim receptorom. Na T ćelijama periferne krvi, ekspresija CD26 je pojačano regulisana nakon T ćelijske aktivacije. Naime, sistem ADA-CD26 je bitan u interakciji između limfocita i nelimfoidnih ćelija, pre svega epitelijelnih. U tim interakcijama ADA-CD26 bi mogla biti uključena u prve stupnjeve međućelijskog prepoznavanja, što je bitno za imunološki razvoj. ⁶⁵ Osim transmembranske, postoji i solubilna forma DPPIV (sCD26), prisutna u serumu, plazmi, urinu, cerebrospinalnoj, sinovijalnoj tečnosti. Transmembranska i solubilna forma CD26 ispoljavaju enzimsku aktivnost cepanjem dipeptida sa N-terminalnog kraja peptida ili proteina koji na drugoj N-terminalnoj poziciji imaju aminokiseline alanin ili prolin. Na ovaj način dolazi do aktivacije, inaktivacije ili modulacije aktivnosti različitih bioaktivnih peptida. ⁶¹⁻⁶³ Osim toga, solubilna forma CD26/DPPIV reguliše

ekspresiju CD89 na APC, dovodeći do pojačanja APC-T ćelijske interakcije i T ćelijske proliferacije, što ima važne implikacije u smislu imunoregulacije.⁶⁶

Brojna istraživanja tokom protekle dve decenije su potvrdila značaj CD26 u različitim fiziološkim funkcijama, u imunskoj regulaciji, u autoimunskim oboljenjima, metaboličkim poremećajima, a novija istraživanja sve češće impliciraju njegovu ulogu u biologiji karcinoma.^{60,67}

◇ **Uloga CD26 u imunskoj regulaciji**

CD26/DPPIV je jedna od glavnih komponenata imunskog odgovora, sa važnom ulogom u T ćelijskoj funkciji.^{60,67} Izvorno okarakterisan kao antigen T ćelijske diferencijacije, CD26 je prevashodno eksprimiran na CD4⁺ memorijskoj T ćelijskoj populaciji, pri čemu CD4⁺CD26⁺T-ćelijska populacija omogućava maksimalan imunski odgovor pri ponovnom "susretu" sa antigenom.⁶⁸ U brojnim istraživanjima je pokazano da je proliferativna aktivnost CD26⁺T ćelija periferne krvi nakon mitogene stimulacije značajno veća od CD26⁻T ćelija, što ukazuje da CD26 može biti od koristi kao marker T ćelijske aktivacije.^{60,69} Pored pojačane ekspresije na aktiviranim T ćelijama, CD26 učestvuje u procesima signalne transdukcije, kao kostimulatorni molekul, prenoseći signale značajne za T ćelijsku aktivaciju. Pokazano je da CD26 može provoditi komitogene signale putem tzv. CD3/T ćelijskog receptorskog kompleksa (TCR) ili preko CD2 puta zrelih humanih T limfocita. Takođe, CD26 prenosi komitogeni signal u aktivaciju humanih timocita posredovanu sa CD3/T. Za razliku od zrelih T ćelija periferne krvi, sposobnost CD26 da prenosi komitogene signale u timocitima je ograničena samo na CD3 put i ne uključuje aktivaciju indukovanu sa CD2. Takođe, ekspresija CD26 je potvrđena i na medularnim timocitima, populaciji relativno zrelih timocita sa visokim nivoom ekspresije CD3. Ovi podaci sugerišu da CD26 može imati ulogu u timusnoj diferencijaciji i maturaciji kroz različito "angažovanje" CD3 puta.⁷⁰

Potvrđeno je da CD26⁺ *Jurkat* ćelije T ćelijske leukemije slično T ćelijama periferne krvi, ispoljavaju pojačanu mobilizaciju intraćelijskog kalcijuma i produkciju IL-2 u prisustvu anti-CD26 i anti-CD3 antitela.⁷¹ Naime, eksperimentalno je potvrđeno da CD26⁺DPPIV⁺ *Jurkat* ćelije proizvode značajno viši nivo IL-2 u odnosu na CD26⁺DPPIV⁻ ćelije i ćelije nakon stimulacije sa anti-CD26 i anti-CD3 antitelima. Ovi

podaci snažno sugerišu da DPPIV enzimski aktivnost CD26 pojačava ćelijske odgovore na CD26⁺ Jurkat ćelije na eksterne stimuluse, i to preko CD26 i/ili CD3/TCR kompleksa, što rezultuje pojačanom produkcijom IL-2 i T-ćelijskom aktivacijom.⁶⁰ Značajna uloga DPPIV enzimski aktivnosti u T-ćelijskoj proliferaciji pokazana je i u eksperimentima sa solubilnim CD26 molekulima. Eksperimenti u kojima je korišćen solubilni rekombinantni CD26 koji sadrži DPPIV (sCD26⁺DPPIV⁺), kao i oni sa solubilnim CD26 mutiranim na mestu DPPIV (sCD26⁺DPPIV⁻) su pokazali da prisustvo DPPIV enzimski aktivnosti dovodi do povećane proliferacije T-ćelija periferne krvi. Ipak, solubilna forma sCD26⁺DPPIV⁺ sama po sebi ne obezbeđuje mitogene signale i ne pojačava T-ćelijske odgovore na mitogene stimuluse, ukazujući da sCD26 može ispoljavati pojačavajući efekat na T-ćelijski odgovor na ponovljene antigene preko svog uticaja na APC.⁷² Potvrđeno je i da egzogeno uneti sCD26 povećava ekspresiju kostimulativnog molekula CD86 na monocitima, posredstvom DPPIV aktivnosti, kako na proteinskom, tako i na nivou mRNA. U skladu sa ovim eksperimentalnim podacima, sCD26, posebno njegova DPPIV enzimski aktivnost, pojačava T-ćelijski imunski odgovor na ponovljene antigene putem svog direktnog efekta na antigen-prezentujuće ćelije.⁶⁶

U brojnim studijama korišćeni su hemijski inhibitori DPPIV aktivnosti CD26 (Lys[Z(NO₂))]-tiazolidid, Lys[Z(NO₂)]-piperidid, Lys[Z(NO₂)]-pyrolidid) koji su doveli do inhibicije DNA sinteze i produkcije interleukina (IL-2, IL-10, IL-12) i IFN- γ u T-limfocitima, čime je takođe potvrđena ključna uloga ovog enzima u T-ćelijskoj aktivaciji. Sa druge strane, prisustvo ovih inhibitora povećava sekreciju imunoinhibitivnog citokina TGF-beta 1 u T-ćelijama, ukazujući da ovaj citokin utiče na regulatorni efekat CD26/DPPIV na funkciju T-ćelija.⁷³ Ipak, postoje i oprečni podaci koji ukazuju da DPPIV enzimski aktivnost nije neophodna za CD26-posredovanu T-ćelijsku funkciju; naime, DPPIV inhibitori ne inhibišu CD26-posredovanu T-ćelijsku citotoksičnost.⁷⁴ Ovi oprečni podaci se mogu delimično razjasniti relativno specifičnom ili nesepecifičnom toksičnošću hemijskih DPPIV inhibitora u različitim eksperimentima. Takođe, biološki efekat DPPIV može zavistiti od pojedinačnih eksperimentalnih modela, koji su, opet, u vezi sa različito manifestovanim ćelijskim procesima u svakom od njih.⁶⁰

◇ CD26 i karcinom

Pored činjenice da status CD26/DPPIV može biti izmenjen u nekim malignitetima, u brojnim istraživanjima je pokazano da i sam CD26 može uticati na rast i razvoj nekih tumora. Naime, uloga CD26 u tumorima može biti kontradiktorna; dok je u nekim tumorima odsustvo CD26 povezano sa njihovim razvojem, u nekim drugim tumorima prisustvo ovog enzima je povezano sa agresivnim ponašanjem tumora.⁶⁷

Iako je prisutan u normalnim hepatocitima i melanocitima, gubitak ekspresije ili aktivnosti DPPIV potvrđen je u hepatocelularnom karcinomu⁷⁵ i u melanomu.⁷⁶ Takođe, potvrđena je uloga DPPIV u karcinomima pluća, konkretno u supresiji rasta NSCLC (engl. *non small cell lung carcinoma*). Naime, ustanovljeno je da su ekspresija DPPIV na ćelijskoj površini, kao i njena enimska aktivnost smanjene u ćelijskim linijama NSCLC, za razliku od normalnog bronhijalnog i alveolarnog epitela.⁷⁷

U nekim studijama je ukazano na regulatornu ulogu ovog enzima u neoplastičnoj transformaciji i progresiji ovarijalnog karcinoma. U ćelijskim linijama ovarijalnog karcinoma, ekspresija DPPIV je varijabilna. Naime, pokazano je da je ekspresija ovog enzima u negativnoj korelaciji sa invazivnim potencijalom karcinoma; dolazi do smanjenja kako invazivnosti, tako i migracije ćelija unutar karcinomske ćelijske linije tretirane sa DPPIV, a potvrđeno je i smanjenje intraperitonealne diseminacije i prolongiranog preživljavanja *in vivo*.⁷⁸

Nadalje, ispitivana je i potencijalna interakcija ovog enzima sa kadherinima i ostalim molekulima uključenim u progresiju karcinoma i metastaziranje. Kadherini su transmembranski glikoproteini, sa važnom ulogom u međućelijskoj adheziji, među kojima je posebno značajan E-kadherin, bitan za invazivnost tumora. Potvrđeno je da je ekspresija DPPIV u pozitivnoj korelaciji sa ekspresijom E-kadherina; naime, povećana ekspresija DPPIV korelira sa opadanjem metastatskog potencijala *in vivo*, a uloga DPPIV ogleda se u ushodnoj regulaciji E-kadherina i tkivnih inhibitora matriks-metaloproteinaza.⁷⁹

Takođe, potvrđeno je i da je DPPIV uključen u procese transformacije i progresije endometrijalnog adenokarcinoma. DPPIV je eksprimiran u normalnom endometriju; naime, njegova ekspresija je potvrđena kako u proliferativnoj, tako i u sekretornoj fazi (s tim što je u ovoj drugoj fazi ekspresija niža). Ekspresija DPPIV u adenokarcinomu

bila je jaka ili umerena u gradusu 1, dok je u gradusu 2 i 3 bila slaba ili negativna, dok korelacija između ekspresije DPPIV i kliničkog stadijuma nije potvrđena.⁸⁰

Ukazano je na značajnu ulogu CD26 i u razvoju nekih hematoloških maligniteta. U nekim subtipovima T-ćelijskih neoplazmi ekspresija CD26 korelira sa lošom prognozom. Naime, ekspresija CD26 je potvrđena prevashodno u agresivnim subtipovima non-Hodgkin limfoma, kao što su T-limfoblastni limfom (LBL), T-akutna limfoblastna leukemija (ALL) i T-ćelijski CD30⁺ anaplastični "large cell" (ALC) limfom. Takođe je pokazano da ekspresija CD26 u T-ćelijskom LBL/ALL korelira sa značajno lošijim preživljavanjem.^{81, 82} Potvrđeno je i da je prisustvo CD26 na površini ćelija T-ćelijske "large granular" limfocitne leukemije (T-LGLL) značajno u inhibiciji mijeloidnih progenitora, što može ukazati na vezu između nivoa ekspresije i stepena mijelosupresije⁸³, dok je u drugim tipovima T-ćelijskog limfoma CD26 odsutan ili slabo ekspimiran.⁶⁷ Gubitak ekspresije CD26 je karakterističan za T-ćelijski limfom i pokazano je da može poslužiti kao dijagnostički marker za ovu bolest.⁸⁴ S obzirom na značaj CD26 u biologiji T-ćelija, posebno u T-ćelijskim malignitetima, može, eventualno, biti meta u target-terapiji nekih T-ćelijskih tumora. Pokazano je da anti-CD26 monoklonska antitela mogu ispoljiti antitumorsku aktivnost. Anti-CD26 monoklonsko antitelo inhibiše rast ćelija ALC limfoma *in vitro*.⁸⁵

Pored potvrđenih efekata anti-CD26 monoklonskih antitela na inhibiciju tumorskog rasta, pokazano je i da enzimaska aktivnost DPPIV značajna u determinisanju senzitivnosti neoplastičnih ćelija na citotoksične agense; ćelije unutar ćelijske linije T-ćelijske leukemije, tretirane sa CD26 molekulom, bile su senzitivnije na doksorubicin i etoposid u poređenju sa netretiranim ćelijama.⁸⁶ Doksorubicin i etoposid su inhibitori topoizomeraze II, koja je, kao unutarćelijski protein, njihov ciljani molekul. U vezi sa tim, može se smatrati da prisustvo CD26/DPPIV dovodi do povećane ekspresije topoizomeraze II, što može imati značajne kliničke implikacije u tretmanu T-ćelijskih i eventualno drugih maligniteta. Veza između ekspresije CD26/DPPIV i topoizomeraze II, koja je uključena u ćelijski rast i proliferaciju, može rasvetliti klinička zapažanja da prisustvo CD26 korelira sa agresivnim kliničkim ponašanjem nekih tumora, uključujući i T-ćelijske malignitete.⁶⁷

U karcinomu prostate je potvrđena povećana enzimsko aktivnost DPPIV. Naime, DPPIV aktivnost je detektovana kako u karcinomu prostate, tako i u benignoj hiperplaziji prostate, s tim što je u karcinomu dvostruko veća.⁸⁷

Ushodna regulacija DPPIV je takođe potvrđena i u karcinomu tiroidne žlezde, dok je kod njenih benignih oboljenja ekspresija DPPIV obično negativna. S obzirom na značajne razlike u ekspresiji, implicirano je da se imunohistohemjske analize sa DPPIV antitelima mogu koristiti kao test u diferencijalnoj dijagnozi oboljenja tiroidne žlezde.⁸⁸

S obzirom da je CD26, osim na ćelijskoj površini, prisutan i u serumu, njegov serumski nivo može da se analizira u kontekstu biološkog ponašanja nekih tumora. U kolorektalnom karcinomu, na primer, serumski nivoi CD26 mogu imati potencijalni dijagnostički i prognostički značaj. Kod pacijenata u ranom stadijumu bolesti, visok preoperativni serumski nivo CD26 je značajno povezan sa smanjenjem perioda bez bolesti.⁸⁹

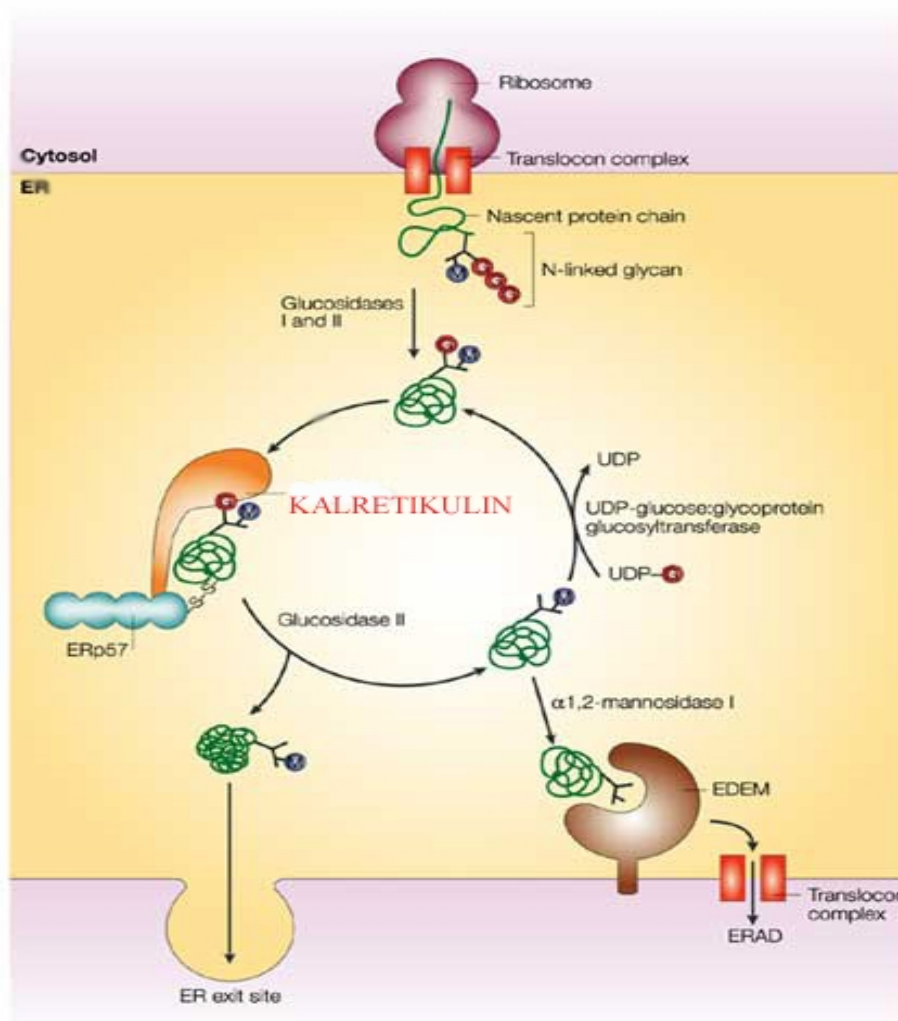
CD26/DPPIV ima ulogu u tumorskoj migraciji i metastaziranju, shodno svojoj sposobnosti da se vezuje za proteine ECM, kao što su kolagen i fibronektin.^{90, 91}

Reagujući sa komponentama ekstraćelijskog matriksa, CD26 može uticati na imunsku regulaciju putem preusmeravanja aktiviranih limfoidnih ćelija ka mestu tumora ili inflamacije,⁹² kao i na kliničko ponašanje tumora.⁶⁷ U kontekstu karcinoma dojke, potvrđeno je da se CD26 molekuli prisutni na endotelijelnim ćelijama pluća specifično vezuju za fibronektin na ćelijskoj površini karcinoma dojke, favorizujući tumorsku adheziju i metastaziranje. Takođe, identifikovano je vezujuće mesto na fibronektinu za CD26/DPPIV i peptidi koji sadrže ove CD26/DPPIV vezujuće domene fibronektina blokiraju interakciju CD26/DPPIV-fibronektin, čime se značajno smanjuju metastaze karcinoma dojke u plućima.⁹³

Na osnovu brojnih istraživanja, CD26/DPPIV imponuje kao veoma važan faktor razvoja i progresije različitih maligniteta. Međutim, s obzirom na svoju multifunkcionalnu prirodu, ovaj molekul može kod različitih tumora ispoljiti kontradiktorne efekte; dok je ekspresija CD26/DPPIV povezana sa smanjenjem progresije nekih tumora, kod nekih drugih tumora korelira sa agresivnim kliničkim tokom. Enzimsko aktivnost ovog molekula dovodi do degradiranja brojnih hemokina, koji verovatno imaju različit uticaj na rast tumora kod različitih neoplazmi.⁶⁷

1.9 Kalretikulin – uloga u imunskom odgovoru i karcinomu

Kalretikulin (CRT) je Ca-vezujući protein i molekularni šaperon (šaperoni su proteini koji pomažu u pravilnom savijanju proteina za vreme ili nakon translacije) od 46 kDa, u luminalnom delu endoplazmatskog retikuluma (ER). Kalretikulin, zajedno sa kalneksinom i ERp57 (protein ER od 57 kDa) je uključen u proces "savijanja" nascentnih polipeptida koji bočno prelaze preko kroz ER. (slika 1.10). Kalretikulin, kao i kalneksin, vrši supresiju agregacije glikoziliranih i neglikoziliranih proteina, putem međusobnih interakcija proteina, kao i proteina sa oligosaharidima.⁹⁴



Slika 1.10. Šaperonska funkcija kalretikulina⁹⁵

Kalretikulin se sastoji od tri različita strukturna i funkcionalna domena: N-, P- i C-domena. N-domen uključuje vezujuća mesta za polipeptide, karbohidrate, za Zn^{2+} i za disulfide i formira stabilno jezgro rezistentno na proteolizu u prisustvu Ca^{2+} .^{94, 96} P-domen kalretikulina vezuje Ca^{2+} sa relativno visokim afinitetom, ali sa niskim kapacitetom (1 mol Ca^{2+} /1 mol proteina).⁹⁷ U P-domenu se nalazi i vezujuće mesto za ERp57. C-domen je odgovoran za vezivanje 50% luminalnog Ca^{2+} u ER, sa visokom kapacitetom (25 mol Ca^{2+} /1 mol proteina) i malim afinitetom.⁹⁴

Funkcija CRT kao šaperona i njegov kapacitet za vezivanje Ca^{2+} uključeni su u različite ćelijske procese. Ca^{2+} ima važnu ulogu u ćeliji kao jedinstveni signalni molekul koji utiče na različite ćelijske procese. Najveći deo unutarćelijskog Ca^{2+} se nalazi u lumenu ER. Promene u njegovoj koncentraciji dovode do oštećenja transporta na relaciji ER-Goldži aparat, otežanog transporta molekula kroz nuklearne pore, kao i do prekida funkcije šaperona.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Naime, bilo kakav poremećaj u zalihama Ca^{2+} unutar ER, kao i opstrukcija njegovog otpuštanja iz ER, imaju potencijal da aktiviraju transkripcionu i translacionu kaskadu, a ove kaskade regulišu šaperoni, proteini koji su uključeni i u apoptotske procese.⁹⁴

Preko 50% Ca^{2+} unutar lumena ER je vezano za CRT.¹⁰¹ Povećana ekspresija CRT dovodi do povećanje količine unutarćelijskog Ca^{2+} , dok ćelije sa deficitom Ca^{2+} i smanjen kapacitet njegovog skladištenja.^{102, 103} U studijama sa animalnim modelima, kao i u eksperimentima sa ćelijama koje imaju deficit ili pojačanu ekspresiju CRT, pokazano je da je regulacija homeostaze kalcijuma jedna od najvažnijih funkcija CRT.⁹⁴ Međutim, istraživanja u proteklih 20 godina potvrđuju da je CRT uključen i u različite procese izvan ER, vezane za ćelijsku površinu, citoplazmu i jedro.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ Pretpostavlja se da CRT na ćelijskoj površini ima ulogu u antigenskoj prezentaciji, u aktivaciji komplementa, uklanjanju apoptoznih ćelija, imunogenosti tumorskih ćelija, u fagocitozi, u zarastanju rana.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ U citoplazmi CRT funkcioniše kao aktivator integrina i sprovodnik signala između integrina i kalcijumskih kanala u plazma-membrani.¹¹¹ Veoma su značajna i istraživanja koja se odnose na ulogu CRT u jedru, koja ukazuju da je on komponenta nuklearnog matriksa u hepatocelularnom karcinomu.¹¹²

Kalretikulin je identifikovan kao antigen u serumu pacijenata sa različitim autoimunskim oboljenjima, kao što su: SLE (sistemski eritemski lupus), celijakija, reumatoidni artritis, kao i neka parazitarna oboljenja.¹¹³⁻¹¹⁶ Lociran na ćelijskoj

površini, CRT intereaguje sa C1q, prvom komponentom komplemента, aktivirajući klasičan put komplemента. U svetlu imunskog sistema, veoma je važna i uloga kalretikulina u tzv. CTL (citotoksičnim T-limfocitima). Naime, CTL oslobađaju specifične proteaze – perforin i granzime nakon interakcije sa ciljnim ćelijama, što rezultira njihovom lizom i apoptozom. Kalretikulin se nalazi u sekretornim granulama citotoksičnih limfocita zajedno sa perforinom. Zahvaljujući svom kapacitetu za vezivanje Ca^{2+} , CRT ima protektivnu ulogu za CTL, inaktivirajući u njima perforin, koji penetrira kroz plazma-membranu ciljne ćelije. Nasuprot tome, neka istraživanja ukazuju da CRT nije od ključnog značaja za citolitičku aktivnost perforina i granzima, ali da je potreban za efikasan kontakt CTL sa ciljnom ćelijom.^{117, 118}

Značajna uloga CRT u borbi protiv karcinoma potvrđena je u brojnim studijama terapije karcinoma, a podrazumeva učešće imunskog sistema u uklanjanju karcinomskih ćelija. Naime, preapoptotska translokacija CRT ka površini ćelije je ključna za imunogenost ćelija koje umiru.¹¹⁹ Kalretikulin se translocira do ćelijske površine sa proteinom ERp57 prezentujući se T-ćelijama, čime inicira imunski odgovor i apoptozu. Interakcija između CRT i ERp57 je veoma bitna za imunogenost ćelije, jer prekid ovog kontakta prevenira ekspresiju CRT na ćelijskoj površini, čime ćeliju čini rezistentnom prema dejstvu T-ćelija i sledstvenom imunskom odgovoru. Deplecija CRT takođe dovodi do rezistencije prema T-ćelijama, ali je potvrđeno da egzogena aplikacija CRT može da prevaziđe ovu rezistenciju, ukazujući na njegovu važnost u imunskom odgovoru na tumorske ćelije.^{119, 120} Sa druge strane, opadanje koncentracije Ca^{2+} u ER takođe indukuje ekspresiju CRT na ćelijskoj površini. U skladu sa tim, CRT-zavisna Ca^{2+} signalizacija može oblikovati imunski odgovor,^{121, 122} čime je podstaknuta ideja o potencijalnoj aplikaciji CRT u terapiji karcinoma i njegovoj primeni u adjuvantnoj hemioterapiji. Naime, eksperimentalno je pokazano da administracija CRT sa tumorskim antigenim peptidima rezultuje pojačanom imunogenošću u poređenju sa aplikacijom tumorskih antigena samostalno.^{123, 124}

Kalretikulin je detektovan na površini mnogih ćelija sisara, uključujući trombocite, fibroblaste, apoptotične i endotelijelne ćelije, pri čemu je takođe potvrđeno da ima značajnu ulogu u ćelijskom odgovoru na apoptozu.⁹⁴ Povećana ekspresija CRT dovodi do izraženije osetljivosti na apoptozu, za razliku od ćelija sa deficitom CRT, za koje je pokazano da su rezistentne na apoptozu, usled smanjenja zaliha Ca^{2+} u ER.¹²⁵

Kalretikulin na ćelijskoj površini u asocijaciji sa fosfatidil-serinom, obezbeđuje signal neophodan za uklanjanje mrtvih ćelija, kako od strane "profesionalnih" fagocita (makrofagi, neutrofilii), tako i od strane fibroblasta. Značaj prisustva CRT na apoptotičnim ćelijama za fagocitozu potvrđen je eksperimentalno na mišjem modelu, odsustvom fagocitoze kod miševa bez CRT-a, dok je egzogenom aplikacijom CRT ovaj proces uspostavljen.⁹⁴

Citotoksični T-limfociti i NK ćelije imaju ključnu ulogu u imunskom odgovoru na virusom inficirane i tumorske ćelije. Ove ćelije ostvaruju svoju funkciju posredstvom dva procesa: apoptozom, indukovanom Fas-Fas ligand interakcijom i/ili dejstvom komponenata citolitičkih granula.^{126, 127} Nakon aktivacije CTL, ekspresija CRT je ushodno regulisana i protein se usmerava prema litičkim granulama i prema plazma-membrani.¹²⁸ Osim u autoimunskim oboljenjima, ekspresija CRT je ispitivana i potvrđena i u brojnim malignitetima, uključujući i karcinom dojke. Lwin i saradnici su pokazali *in vitro* da agresivniji tipovi karcinomskih ćelijskih linija pokazuju višu ekspresiju CRT od manje agresivnih. Takođe, pokazali su da je ova ekspresija u pozitivnoj korelaciji sa veličinom tumora dojke i razvojem udaljenih metastaza. Ovi podaci impliciraju povezanost ekspresije CRT sa uznapredovalošću tumora, kao i ulogu ovog proteina kao potencijalnog prognostičkog markera.¹²⁹

Iako konvencionalna terapija karcinoma koja podrazumeva radio- i hemioterapiju dovodi do smrti tumorskih ćelija tzv. intrinzičkim mehanizmima, bez direktnog učešća imunskog sistema domaćina, postoje specifične okolnosti u kojima konvencionalni antikancerski tretmani mogu indukovati modalitet ćelijske smrti koji je imunogen, pri čemu "umiruće" ćelije indukuju tumor-specifični imunski odgovor.¹³⁰ Pokazano je da tumorske ćelije koje podležu imunogenoj ćelijskoj smrti translociraju unutarćelijski CRT (endo-CRT) prema plazma-membrani (ekto-CRT), olakšavajući prepoznavanje tumorske ćelije, fagocitozu dendritičnim ćelijama i sledstvenu eliminaciju tumora T-ćelijama. Antraciklini i γ -zračenje koji indukuju imunogenu ćelijsku smrt dovode do ekspozicije CRT na ćelijskoj površini, dok drugi proapoptotički agensi za koje je pokazano da dovode do neimunogene ćelijske smrti ne indukuju ekspoziciju ekto-CRT.¹³¹ Na mišjem modelu je pokazano da antraciklini indukuju snažnu, preapoptotičku translokaciju CRT ka ćelijskoj površini. Naime, blokada CRT suprimira fagocitozu (od strane dendritičnih ćelija) tumorskih ćelija tretiranih antraciklinima i poništava njihovu

imunogenost. Administriranje rekombinantnog CRT ponovo uspostavlja imunogeni efekat ćelijske smrti i pojačava antitumorski efekat leka *in vivo*. Ovi podaci karakterišu CRT kao faktor koji determiniše antikancerski imunski odgovor i implicira mogućnost primene imunogene hemioterapije. Deplecija CRT-a poništava imunogenost ćelijske smrti indukovanu antraciklinima, dok egzogena administracija CRT ili podsticanje površinske ekspozicije CRT farmakološkim agensima, mogu pojačati imunogeni efekat ćelijske smrti.¹³¹

Pokazano je da kod bolesnica sa karcinomom dojke postoji overekspresija kalretikulina u tumorskim ćelijama koja, zajedno sa serumskom IgG imunoreaktivnošću na tumorsku stromu, korelira sa postoperativnom pojavom metastaza, posebno kod Her-2⁺ bolesnica, sa metastazama u aksilarnim limfnim nodusima.¹³²

2. CILJEVI

1. Ispitati aktivnost serumske dipeptidil-peptidaze IV i ekspresije CD26 antigena na imunokompetentnim ćelijama periferne krvi kod bolesnica sa malignim i benignim promenama dojke, kao i kod zdravih kontrola
2. Ispitati serumski nivo antikalretikulinskih IgA i IgG antitela kod bolesnica sa malignim i benignim promenama dojke, kao i kod zdravih kontrola, kao i povezanost između intenziteta i lokalizacije ćelijske (memranska ili citoplazmatska) ekspresije kalretikulina u tkivnim isečcima tumorskog tkiva dojke i prisustva povišenih nivoa serumskih IgA i IgG antikalretikulinskih antitela.
3. Ispitati relativnu učestalost određenih limfocitnih subpopulacija: CD16⁺/56⁺ i CD16⁺/89⁺ kod bolesnica sa malignim i benignim promenama dojke, kao i kod zdravih kontrola

3. BOLESNICE, METODE I MATERIJAL

3.1 Mesto i period istraživanja

Istraživanje je sprovedeno u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije (Odeljenje za eksperimentalnu onkologiju - Laboratorija za modifikatore biološkog odgovora; Klinika za onkološku hirurgiju - Odeljenje hirurgije dojke), u periodu od januara 2010. do juna 2011. god.

3.2 Selekcija bolesnica

U ovom istraživanju tipa kliničko-eksperimentalne studije preseka, učestvovalo je 105 bolesnica sa benignim ili malignim promenama dojke, predviđenih za hiruršku terapiju, od kojih 68 sa malignim i 37 sa benignim promenama dojke. Starost bolesnica je u intervalu od 19. – 82. godine (prosečna starost je 54,4 godine). Uključujući kriterijumi za selekciju ispitanica su: adultno doba (≥ 18 godina) i dijagnostikovana primarna lezija dojke, za koju je primarno indikovano hirurški tretman - stadijumu 0 (neinvazivni karcinom manji od 0,1 cm), stadijumu I (T1, N0, M0), stadijumu II A (T0-1, N1, M0 ili T2, N0, M0) i stadijumu II B (T2, N1, M0 ili T3, N0, M0). Isključujući kriterijumi za selekciju ispitanica su: lezija dojke za koju primarno nije indikovano hirurški tretman; kardiorespiratorna insuficijencija; hematološka oboljenja.

Sve bolesnice su pre učešća u istraživanju pročitale i popunile Informisani pristanak, prethodno odobren od Etičkog komiteta Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Putem Informisanog pristanka, bile su zamoljene da daju uzorak krvi i deo tkivnog kalupa biopsije tumora.

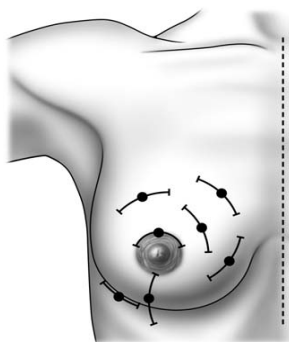
U istraživanje je bilo uključeno i 37 zdravih osoba, kao kontrole.

3.3 Klinički (hirurški) tretman promena u dojci

Nakon obavljenih dijagnostičkih procedura, koje podrazumevaju: fizikalni pregled, mamografski pregled, ultrasonografski pregled, kao i, u situacijama kada je to indikovano, pregled magnetnom rezonancijom, eventualno biopsiju, bolesnice su, zavisno od tipa promene i stadijuma bolesti (ukoliko je maligna promena u pitanju), bile podvrgnute odgovarajućem hirurškom tretmanu promene u dojci.

◇ *Ekscizionna biopsija*

Ekscizionna biopsija podrazumeva kompletnu eksciziju karcinoma, uz minimalnu količinu okolnog zdravog tkiva. Ukoliko se, nakon ekscizije, ispostavi da je promena maligna, a patološki se verifikuje da su margine bez tumora, dodatna ekscizija tkiva dojke nije neophodna. Kožne, tzv. Langerove linije dojke (v. Uvod), protežu se od regije areole i bradavice cirkumferentno prema spolja i bitne su prilikom određivanja incizije; incizione linije ne smeju biti upravne, već semicirkularne ili periareolarne, tako da prate prirodne kožne linije (slika 3.1).⁸

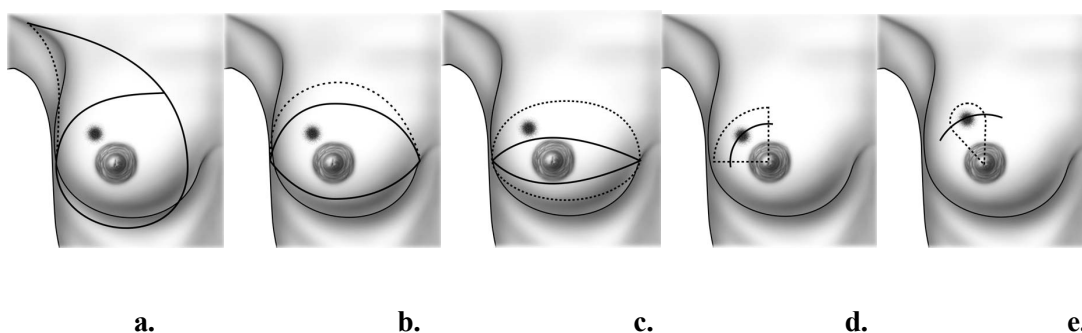


slika 3.1. Preporučene incizione linije za ekscizionu biopsiju⁸

Ekscizionna biopsija se koristi i za uklanjanje i definitivnu dijagnozu benigne promene dojke, fibroadenoma, kada se načini periareolarna ili inframamarna incizija kroz koju se odstranjuje promena.

◇ *Varijante incizija i hirurški tretman karcinoma dojke*

Radikalna mastektomija je ranije (William Halsted, XIX vek) predstavljala optimalni tretman primarnog karcinoma dojke. Ova operacija podrazumeva uklanjanje dojke, velikog i malog grudnog mišića i sva tri sprata limfnih nodusa.^{8, 15, 133} Incizija za ovu proceduru uključuje i dojku i aksilu (slika 3.2a.). S obzirom da je ovo mutilantna operacija, više se ne preporučuje.



slika 3.2. Varijante incizija i obim hirurškog zahvata kod karcinoma dojke⁸

Modifikovana radikalna mastektomija je manje mutilantna, budući da podrazumeva uklanjanje dojke uz očuvanje grudnih mišića i uklanjanje I sprata ili I i II sprata limfnih nodusa (*sectio Madden*). Koristi se eliptična incizija, koja uključuje dojkicu i proteže se do aksile (slika 3.2b.). Ovaj oblik mastektomije se preporučuje u slučaju velikog primarnog tumora ili prisustva multicentričnih tumora.

Mastektomija uz poštedu kože podrazumeva mastektomiju sa uklanjanjem kompleksa areola-bradavica, ali uz očuvanje ostatka kože dojke. Načini se uzana eliptična incizija, koja uključuje regiju areole i bradavice, ali ne mora nužno uključivati i primarni tumor (slika 3.2c.).

Kvadrantektomija podrazumeva uklanjanje čitavog kvadranta dojke koji sadrži tumor, kroz zakrivljenu inciziju (slika 3.2d.).

Segmentalna ekscizija (lampektomija) se izvodi kroz zakrivljenu inciziju, duž kožnih Langerovih linija, koja se načini iznad tumora (slika 3.2e.).^{8, 133}

3.4 Prikupljanje humanog materijala

Prikupljanje humanog materijala podrazumevalo je prikupljanje uzoraka krvi i prikupljanje tkivnih uzoraka tumora. Uzorci krvi su prikupljeni od 68 bolesnica sa malignim i od 37 bolesnica sa benignim promenama dojke, jedan dan pre planiranog hirurškog tretmana. Takođe, uzorci krvi su prikupljeni i od 37 zdravih osoba (kontrola). Od bolesnica, kao i od zdravih osoba, uzorak krvi je prikupljen na isti način: jednim špricom je iz brahijalne vene uzeto 10ml krvi, bez dodatka heparina (antikoagulans), a drugim špricom je uzeto 2,5ml krvi, kome je dodato 0,07ml heparina.

Tkivni uzorci tumora uzeti su od delova tkivnog kalupa biopsije tumora načinjenih ranije, u cilju postavljanja histopatološke dijagnoze.

3.5 Instrumenti merenja (eksperimentalne metode)

3.5.1 Izolovanje limfocita periferne krvi

Mononuklearne ćelije periferne krvi (*engl.* peripheral blood mononuclear cells, PBMC) su izolovane iz heparinizirane krvi, koja se najpre centrifugira na 500xg, 10 min, zatim se naliva na separator – Lymphoprep (Nypacon, Norway), pa se ponovo centrifugira na 500xg, 35 min. Nakon centrifugiranja u epruveti su uočene tri faze: prva, gornja faza predstavlja izdvojenu plazmu, u drugoj fazi su PBMC, a u trećoj eritrociti koji imaju najveću masu i pri centrifugiranju padaju na dno. Iz epruvete je prvo izdvojena plazma, a PBMC su prebačene u hranljivi medijum i ta suspenzija je centrifugirana 10 min na 500xg. Nakon centrifugiranja, na dnu epruvete su izdvojene PBMC. Potom su tri puta ispirane u hranljivom medijumu RPMI 1640 (CM, Gibco, UK), sa 10% FCS-om (Sigma, USA).

3.5.2 Izolovanje seruma

Krv iz šprica bez dodatka heparina je prebačena u sterilnu epruvetu, u sterilnoj komori, na 37°C. Nakon 30 min, formiran je koagulum, koji je odstranjen, a tečni deo krvi

centrifugiran je 30 min. na 500xg. Nakon centrifugiranja izdvojen je serum, koji je, potom, u zapreminama od 1 ml izdvajan u eppendorf epruvete, u kojima je na -20°C zamrznut do upotrebe.

3.5.3 Analiza na protočnom citometru

Protočna citometrija je metoda koja omogućava multiparametarsku analizu fizičkih i hemijskih karakteristika ćelija, koristeći optički i elektronski detekcioni sistem. Snop laserske svetlosti određene talasne dužine je usmeren na ćelijsku suspenziju. Svaka pojedinačna ćelija pri prolasku kroz svetlosni snop apsorbira svetlost preko fluorescentnih molekula unutar ili na površini ćelije, koji se ekscitiraju, a potom emituju svetlost više talasne dužine. Optički detektorski sistem konvertuje emitovanu svetlost u električni signal. Nakon amplifikacije, analogni signal se konvertuje u digitalni, što omogućava grafički prikaz ispitivanih događaja.

Imunofenotip izolovanih limfocita periferne krvi identifikovan je pomoću direktno obeleženih monoklonskih antitela (imunofenotipizacija): CD16PE/CD56FITC, CD16FITC/CD89PE i CD26PE. Iz svakog uzorka je prikupljeno 10000 ćelija periferne krvi (PBMC za CD16PE/CD56FITC i CD16FITC/CD89PE, odnosno PBL za CD26PE) i analizirano CellQUEST softverom.

Imunofenotipizacija - u epruvete su sipana monoklonska antitela (Becton Dickinson, San Jose, USA), 5 µl antitela sa fikoeritrinom (PE) i 5 µl antitela sa FITC-om. Potom je dodato po 50 µl suspenzije ćelija (uzorka limfocita), vorteksirano i inkubirano u ledenom kupatilu 30 min. Uzorci su dva puta ispirani u 500 ml rastvora za pranje (CellWASH, BD Biosciences, cat. no. 349524) i vorteksirani, a potom centrifugirani 5 min. na 400xg. Nakon ispiranja je odliven supernatant i dodato je 500 ml rastvora za pranje, vorteksirano i odloženo na 4°, do analiziranja.

Ekspresija CD26 na ćelijama periferne krvi određena je tako što je 50 µL pune krvi dodato na 2.5 µL (0.05 mg/mL) rastvora antitela za CD26, obeležena fikoeritrinom (PE; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA, catalog no. 340423) nakon čega je sadržaj vorteksovano i inkubirano u mraku 15 min. Potom je dodato 800 µL rastvora za liziranje (FACS Lysing solution, BD Biosciences, cat. no. 349202), vorteksovano i inkubirano u mraku 10 min i centrifugirano 5 min na 400xg. Uzorci su

isprani dva puta i na kraju je dodato 200 μ L "cell fix" rastvora (CellFIX, BD Biosciences, cat. no. 340181). Ekspresija CD26 na ćelijama (limfociti, monociti i granulociti) određena je korišćenjem FACSCalibur protočnog citometra (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA). Prikupljeni podaci su analizirani CELLQuest softverom (BD Biosciences).

3.5.4 Imunohistohemija

Imunohistohemija je metoda za lokalizaciju antigena u tkivnim isečcima, pomoću obeleženih antitela, putem antigen-antitelo reakcije, koja se vizualizuje različitim markerima, kao što su fluorescentne boje, enzimi, radioaktivni elementi. Ova metoda omogućava vizuelizaciju ćelijskih komponenata. Određivanje povećane ekspresije kalretikulina (membranske i citoplazmatske) u ćelijama parafinskih isečaka benignih i malignih tkiva dojke realizovano je korišćenjem kozijih antikalretikulinskih antitela (Abcam, cat. br. Ab 39818), prema preporuci proizvođača. Vizualizacija formiranih kompleksa je omogućena vizualizacionim sistemom Ultravision+ detekcioni sistem (Labvision Thermo Shandon cat. No 100426). Stepenn imunoreaktivnosti procenjen je na osnovu prisustva i intenziteta reakcije između antikalretikulinskog antitela i kalretikulina prisutnog u citoplazmi ili na membrani tumorskih ćelija, pri čemu je korišćena arbitrarna skala, od 0 do 3+: 0 označava odsustvo obojenosti preparata koje je uglavnom karakteristično za zdravo tkivo, dok 3+ odgovara intenzitetu obojenja koji se dobija kada se analizira obojenje HCC (hepatocelularnog karcinoma). Stepenn 1+ definisan je kao "slabo" bojenje, dok su stepeni 2+ i 3+ definisani kao "intenzivno" bojenje (izražena overekspresija). Ukoliko povećanje ekspresija kalretikulina na membrani nije bila izraženije nego citoplazmi, označeno je kao citoplazmatska lokalizacija. Bitno je naglasiti da se istovremeno prisustvo membranskog povećanja ekspresije kalretikulina u slučaju intenzivnog citoplazmatskog prebojavanja (2+ i 3+) ne može isključiti, korišćenjem optičkog mikroskopa.

◇ *Postupak pripreme patohistoloških preparata iz tkivnog kalupa tumora*

Od tkivnog kalupa su, sečenjem na Mikrotom-u, napravljeni tkivni rezovi, debljine 4-5 μ m, nakon čega su uneti u vodeno kupatilo, na 50°C. Potom su stavljeni na predmetna stakla i sušeni su na 58-60°C, nakon čega su histološki bojani. Prvi korak je

deparafinizacija ksilolom, 20 min, zatim apsolutnim alkoholom 20 min, pa 96% alkoholom 15 min i na kraju destilovanom vodom 5 min. Potom je izvršeno demaskiranje antigena, kuvanjem u citratnom puferu (pH 6,0) 40 min, u vodenom kupatilu na 95° ili u mikrotalasnoj peći 20 min, na 850 W. Nakon toga je usledilo hlađenje 20 min, ako je zagrevanje bilo u vodenom kupatilu ili 10 min, ako je zagrevanje bilo u mikrotalasnoj peći. Preparati su potom tretirani sa 3% H₂O₂, 10-15 min. i ispirani vodom, pa potom PBS-om dva puta, 2 min. Nakon toga su inkubirani sa zečijim anti-IgG poliklonalnim antitelom (DAKO, USA) i zečijim anti-kalretikulinskim poliklonalnim antitelom (CHEMICON International, Sweden), u razblaženju 1: 400 za oba antitela, 35-45 min. i ispirani PBS-om dva puta, 2 min. Zatim je usledila vizuelizacija pomoću LSAB (engl. *labeled streptavidin-biotin*) (DAKO, USA) sistema. Prvo je dodato biotinizovano antitelo, pa je posle 30 min. preparat ispran dva puta u PBS-u. Nakon toga je dodat streptavidin obeležen alkalnom fosfatazom. Nakon 30 min. usledilo je ispiranje u PBS-u. Zatim je dodat DAB supstrat (1 ml) i DAB hromogen (1 kap) i nakon 10-20 min. izvršena je dehidratacija: prvo 96% alkoholom, pa nakon 15 min. 100% alkoholom i nakon 20 min ksilolom. Posle 20 min. preparati su pokriveni.

3.5.5 Direktna fotometrijska metoda

Direktna fotometrijska metoda korišćena je za određivanje enzimske aktivnosti DPPIV u serumu, iz mikroploča sa 96 bunarčića, kao što je opisano u radu Jarmolowske i saradnika¹³⁴, u izvesnoj meri modifikovano. U uzorke seruma, kao i u njihove slepe probe, dodato je 50 μL 0.3 M Gly/NaOH pufera (pH 8.7), 20 μL 1.5 mM Gly-Pro-*p*-nitroanilida *p*-toluensulfonata (supstrat za DPPIV substrate, Sigma G2901) i 50 μL of distilovane vode. Standardni uzorci su sadržali 20 μL 1.5 mM *p*-nitroanilina (Sigma N2128) umesto supstrata, a njihove slepe probe su sadržale 20 μL distilovane vode. Nakon 30 min inkubacije na 37°C, dodato je 50 μL ohlađenog (4°C) 1M acetatnog pufera (pH 4.2), u slepe probe serumskih uzoraka, kako bi se sprečila enzimska reakcija. Potom je dodato 10 μL seruma u serumske uzorke i njihove slepe probe. U standardne uzorke i standardne slepe probe dodato je 10 μL distilovane vode. Mikroploče su potom inkubirane narednih 30 min na 37°C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodatkom 50 μL ohlađenog (4°C) 1M acetatnog pufera (pH 4.2) u uzorcima koji sadrže serum.

Uzorci standarda i njihove slepe kontrole su sadržale istu količinu acetatnog pufera. Apsorbanca (A) je merena na talasnoj dužini od 405 nm. Aktivnost DPPIV u serumu računata je prema formuli:

$$\text{Enzimska aktivnost} = \frac{(A \text{ uzorka seruma} - A \text{ slepe probe uzorka seruma} / A \text{ standarda} - A \text{ slepe probe standarda}) * 100}{A}$$

Enzimska aktivnost: IU/L = 1 μM/min/L seruma.

Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu.

3.5.6 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

ELISA predstavlja imunološko-biohemijsku metodu za određivanje prisustva antigena ili antitela u uzorku. U ovom istraživanju, određivanje nivoa antikalretikulinskih IgA i IgG antitela u serumu vršeno je ELISA metodom, na način kako je opisano u prethodnim istraživanjima (Sánchez i sar., 2008, 2003).^{135, 136} Naime, humanim rekombinantnim kalretikulinom u finalnoj koncentraciji od 5 mg/ml fosfatnog pufera (PBS) obložene su polistirenske ploče za mikrotitraciju sa 96 bunarčića (Gama, Czech Republic) tokom noći, na 4°C. Blokirajući pufer (1% bovin serum albumin - BSA) u PBS (Sigma, Germany) korišćen je kao negativna kontrola. Svaki uzorak seruma i standardni serum, razblaženi u blokirajućem puferu (1:20, 1:100 za IgA i 1:100, 1:500 za IgG) analizirani su u triplikatu. Najviši optički denzitet (OD) kontrole je oduzet od srednje vrednosti izmerenog OD.

3.6 Klinički deo istraživanja

Klinički deo istraživanja podrazumeva analizu kliničkih parametara, koristeći kao izvor istorije bolesti: utvrđivanje tipa lezije dojke; utvrđivanje kliničkog stadijuma tumora; procenu povezanosti tih kliničkih parametara sa ćelijskim i humoralnim imunološkim parametrima.

3.7 Statistička metodologija

3.7.1 Statistička metodologija za određivanje aktivnosti serumske DPPIV

Statistička značajnost dobijenih rezultata procenjena je korišćenjem Kruskal Wallis-ovog testa, kao i asimptotskog Wilcoxon-ovog testa sume rangova. Korelacija između dva parametra u svakoj grupi bolesnica testirana je Spearman-ovim rangom korelacije. Normalne distribucije parametara analizirane su korišćenjem Kolmogorov-Smirnov-ovog testa i Shapiro-Wilk-ovog testa. Za analizu je korišćen statistički program: R version 2.8.1 (2008-12-22) Copyright (C) 2008 The R Foundation for Statistical Computing (ISBN 3-900051-07-0). Za određivanje statističke značajnosti rezultata korišćena je tzv. Bonferroni korekcija ($p < 0.05/3$).

Porast nivoa enzimske aktivnosti u serumu definisan je kao vrednost iznad srednje vrednosti za kontrolnu grupu, plus standardna devijacija (SD). Pad nivoa enzimske aktivnosti u serumu definisan je kao vrednost ispod srednje vrednosti kontrolne grupe minus SD.

3.7.2 Statistička metodologija za određivanje overekspresije kalretikulina u tkivima benignih i malignih promena dojke

Neparametarski Mann–Whitney *U*-test je korišćen za komparaciju serumskih nivoa IgA i IgG antikalretikulinskih antitela između grupa bolesnica i kontrolne grupe.¹³⁷ Koncentracije antikalretikulinskih antitela u serumu su izražene kao arbitrarne jedinice (AU), pri čemu je OD standardnog seruma korišćena kao referentna vrednost (uzeta 100%). Tzv. *cut-off* vrednosti za antikalretikulinska antitela su izražene kao srednja vrednost plus 2SD, na osnovu podataka dobijenih iz serumskog pula 38 kontrolnih uzoraka. Vrednosti koje su prevazilazile *cut-off* evaluirane su kao pozitivne.

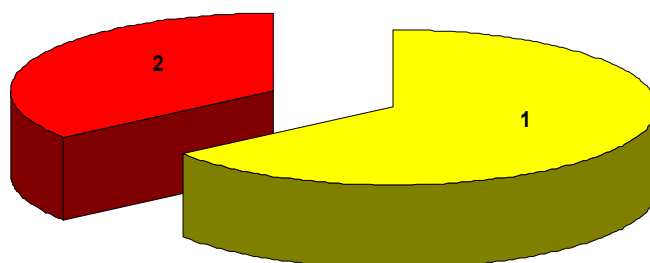
3.7.3 Obrada podataka dobijenih analizom na protočnom citometru

Analizirani parametri: CD16PE/CD56FITC, CD16FITC/CD89PE i CD26PE predstavljeni su, obradom preko CellQUEST softvera, kao procenat PBMC za CD16PE/CD56FITC i CD16FITC/CD89PE, odnosno kao procenat PBL za CD26PE po ispitivanom uzorku. Tako dobijeni podaci analizirani su sledećim statističkim testovima:

- Za testiranje razlika između grupa od interesa, a u zavisnosti od prirode ispitivanih parametara, korišćeni su Kruskal Wallis-ov test; Wilcoxon-ov test sume rangova, Wilcoxon-ov test sume rangova sa kontinuiranom korekcijom, asimptotski Wilcoxon-ov test sume rangova i egzaktni Wilcoxon-ov test sume rangova.
- Za opis parametara od značaja, a u zavisnosti od njihove prirode, korišćene su mere deskriptivne statistike: frekvencije, procenti, srednja vrednost (prosek), medijana, standardna devijacija (SD) i opseg (raspon).
- Za nivo statističke značajnosti usvojena je vrednost $\alpha=0.05$. U slučaju višestrukog testiranja nad istim setom podataka, korišćena je Bonferroni korekcija α -vrednosti ($\alpha_1=0.05/3=0.0167$).
- Analiza podataka je rađena u statističkom programu R version 2.8.1 (2008-12-22)
Copyright (C) 2008 The R Foundation for Statistical Computing
ISBN 3-900051-07-0.

4. REZULTATI

U istraživanju je učestvovalo 105 bolesnica, predviđenih za hiruršku terapiju, od kojih 68 (64,76%) sa malignim promenama dojke, 37 (35,24%) sa benignim promenama dojke (grafikon 4.1) i 37 zdravih osoba kao kontrole. Starost bolesnica je u intervalu od 19 – 82 godine (prosečna starost je 54,4 godine).

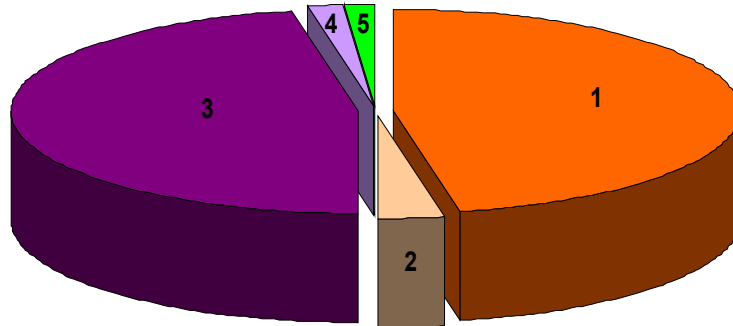


Grafikon 4.1. Učestalost bolesnica sa malignim i benignim promenama dojke:

1. bolesnice sa malignim promenama
2. bolesnice sa benignim promenama

4.1 Bolesnice sa malignim promenama dojke

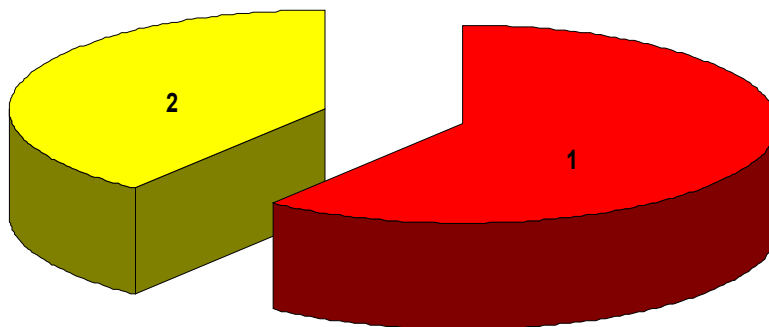
U grupi bolesnica sa malignim promenama dojke, najbrojniji su invazivni karcinomi (64 bolesnice), sa podjednakom zastupljenošću dva najčešća histopatološka entiteta: kod 32 bolesnice dijagnostikovano je *Ca ductale invasivum mammae* (47,06%) i kod 32 bolesnice *Ca lobulare invasivum mammae* (47,06%). Kod dve bolesnice je dijagnostikovano *Ca ductale in situ mammae* (2,94%), dok je *Ca lobulare in situ mammae* bio prisutan kod jedne bolesnice (1,47%). Kod jedne bolesnice je dijagnostikovano *Carcinosarcoma mammae* (1,47%). (grafikon 4.2)



Grafikon 4.2. Zastupljenost patohistoloških tipova malignih promena dojke:

1. *Carcinoma ductale invasivum mammae*
2. *Carcinoma ductale in situ mammae*
3. *Carcinoma lobulare invasivum mammae*
4. *Carcinoma lobulare in situ mammae*
5. *Carcinosarcoma mammae*

Kod 27 bolesnca (39,71%) dijagnostikovane su metastaze karcinoma dojke u limfnim nodusima aksile (*Ca mammae metastaticum lymphonodi*), dok kod 41 bolesnice (60,29%) nije bilo metastatski izmenjenih nodusa (*Sinus histiocytosis reactiva lymphonodorum*). (grafikon 4.3).



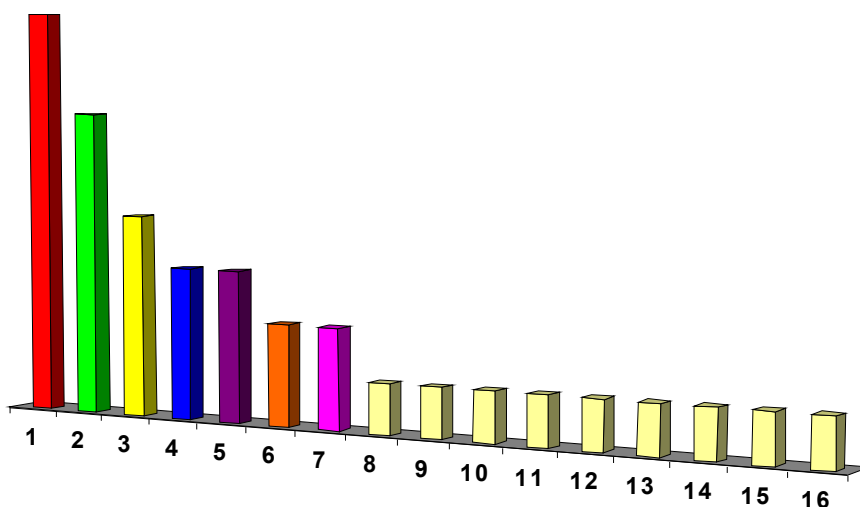
Grafikon 4.3. Zastupljenost metastaza u limfnim nodusima aksile:

1. bez metastaza – *Sinus histiocytosis reactiva lymphonodorum*
2. sa metastazama – *Carcinoma mammae metastaticum lymphonodi*

Kod dve bolesnice (2,94%) dijagnostikovane su udaljene metastaze karcinoma dojke, kod obe u koštanom sistemu (*Metastasis in ossibus generalisata*).

4.2 Bolesnice sa benignim promenama dojke

U grupi bolesnica sa benignim promenama dojke, najzastupljenije su fibrocistične displazije: kod 8 bolesnica (21,62%) je dijagnostikovana proliferativna forma, dok je kod 6 bolesnica (16,22%) prisutna neproliferativna forma ove bolesti. Četiri bolesnice (10,81%) su imale dijagnostikovanu fibrocističnu bolest dojke, kod tri (8,12%) je bio prisutan intraduktalni papilom, kod tri atipična lobularna hiperplazija (8,12%). Dve bolesnice (5,41%) su imale histopatološki verifikovan fibroadenom, a dve (5,41%) intracistični papilom. Kod preostalih devet bolesnica dijagnostikovani su različiti benigni patohistološki entiteti: masna involucija (2,7%); policistična displazija (2,7%); fibroskleroza dojke (2,7%); benigni filodni tumor (2,7%); prosta inflamirana cista (2,7%); periduktalni hronični mastitis (2,7%); masna nekroza sa kalcifikacijama (2,7%); depigmentacija kože (2,7%) i hronična nespecifična inflamacija (2,7%). (grafikon 4.4.)



Grafikon 4.4. Zastupljenost patohistoloških tipova benignih promena dojke:

1. *Dysplasia fibrocystica proliferativa mammae* (8)*
2. *Dysplasia fibrocystica nonproliferativa mammae* (6)
3. *Fibrocystic changes mammae* (4)
4. *Papilloma intraductale* (3)
5. *Hyperplasia lobularis atypica* (3)
6. *Fibroadenoma* (2)
7. *Papilloma intracysticum mammae* (2)
8. *Involutio adiposa mammae* (1)
9. *Dysplasia polycystica* (1)
10. *Fibrosclerosis mammae* (1)
11. *Tu phillodes mammae benignus* (1)
12. *Cystis simplex mammae in inflammatione* (1)
13. *Mastitis periductalis chronica* (1)
14. *Necrosis textus adiposus et calcificationes mammae* (1)
15. *Depigmentatio cutis* (1)
16. *Inflamatio chronica non-specifica mammae* (1)

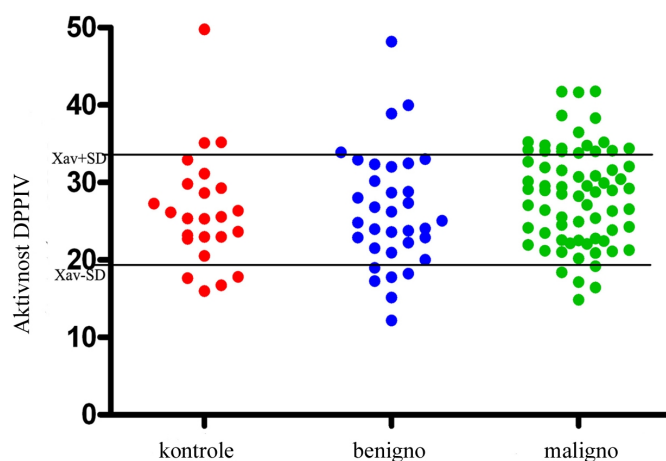
- U zagradi () je prikazan broj bolesnica sa odgovarajućim tipom benigne promene dojke

4.3 Ispitivanje aktivnost serumske dipeptidil-peptidaze IV i ekspresije CD26 antigena na imunokompetentnim ćelijama periferne krvi

◇ Aktivnost serumske DPPIV kod zdravih osoba i kod bolesnica sa benignim i malignim promenama dojke

Aktivnost serumske DPPIV je testirana u svakoj grupi (bolesnice sa benignim promenama dojke, bolesnice sa malignim promenama dojke i zdrave osobe). Komparacija podataka je predstavljena u odabranim reprezentativnim podgrupama bolesnica sa malignim promenama: podgrupa sa histološkim gradusom G2, podgrupe sa nuklearnim gradusima NG1 i NG2, kao i podgrupe sa ili bez metastaza u regionalnim limfnim nodusima.

Aktivnost serumske DPPIV u jedinicama IU/L nije pokazala statistički značajnu razliku između bolesnica sa benignim ili malignim lezijama u poređenju sa kontrolama. (grafikon 4.5 i tabela 4.1).



Grafikon 4.5. DPPIV aktivnost u serumu bolesnica sa benignim ili malignim promenama dojke i kod zdravih kontrola. $X_{av} \pm SD$ su *cut-off* vrednosti dobijene od zdravih kontrola

Tabela 4.1. Serumska aktivnost DPPIV, %CD26⁺ limfocita, % ukupnih CD26⁺ ćelija, % limfocita i MFI (*mean fluorescence intensity*) CD26 ekspresije na limfocitima kod zdravih kontrola i bolesnica sa benignim i malignim promenama dojke

Bolesnice	n	serumska DPPIV aktivnost (IU/L)	% CD26 ⁺ limfocita	% ukupnih CD26 ⁺ ćelija	% limfocita	MFI CD26 ekspresije na limfocitima
Kontrole	24	26.34 ± 7.33	49.58 ± 11.13	12.93 ± 4.29	23.78 ± 8.33	284.50 ± 111.61
Benigne promene dojke	34	26.34 ± 7.52	51.14 ± 12.87	9.91 ± 4.47*	19.70 ± 6.54 (p=0.0534)	246.10 ± 171.05
Maligne promene dojke	69	28.29 ± 6.30	51.61 ± 9.71	10.04 ± 4.52**	19.67 ± 7.12 p= 0.04932	207.10 ± 147.22 ***

U poređenju sa zdravim kontrolama: * (p<0.01), ** (p<0.007), *** (p< 0.012)

Koristeći *cut off* vrednosti za aktivnost serumske DPPIV (dobijene kako je opisano u poglavlju Metode), 19,01 IU/L i 33,67 IU/L, 4 i 3 od 24 kontrole su imale snižen ili povišen nivo aktivnosti DPPIV. Neznatna učestalost osoba sa izmenjenom aktivnošću DPPIV prisutna je i u grupi bolesnica sa benignim promenama (6 i 4 od 34 bolesnice imale su smanjen odnosno povećan nivo aktivnosti DPPIV). Veća učestalost (18 od 69) osoba sa povišenom DPPIV aktivnošću prisutna je samo u grupi bolesnica sa karcinomom dojke. (tabela 4.2)

Tabela 4.2. Učestalost osoba sa izmenjenim parametrima

	Zdrave osobe	Bolesnice sa benignim promenama dojke	Bolesnice sa malignim promenama dojke
Broj osoba u grupi	24	34	69
Učestalost osoba sa sniženom serumskom aktivnošću (<19.01 IU/L) DPPIV	4 (24)	6 (34)	4 (69)
Učestalost osoba sa povišenom serumskom aktivnošću (>33.67 IU/L) DPPIV	3 (23)	4 (34)	18 (69) *
Učestalost osoba sa sniženim % (<38.45%) CD26 ⁺ limfocita	4 (23)	4 (31)	3 (65)
Učestalost osoba sa povišenim % (>67.71%) CD26 ⁺ limfocita	2 (23)	6 (31)	11 (65)
Učestalost osoba sa sniženim % (<8.64%) CD26 ⁺ ćelija bele krvne loze	2 (23)	11 (31)	24 (65) *
Učestalost osoba sa povišenim % (>17.22%) CD26 ⁺ ćelija bele krvne loze	3 (23)	1 (31)	6 (65)
Učestalost osoba sa sniženim MFI CD26 (<172.89) ekspresije na limfocitima	3 (23)	12 (32) *	36 (66) *
Učestalost osoba sa povišenim MFI CD26 (>396.11) ekspresije na limfocitima	3 (23)	8 (32)	6 (66)
Učestalost osoba sa sniženim % (<15.45%) limfocita	2 (23)	10 (33) *	21 (67) *
Učestalost osoba sa povišenim % (>32.10%) limfocita	5 (23)	1 (33)	3(67)

* povećana učestalost osoba sa izmenjenim parametrima

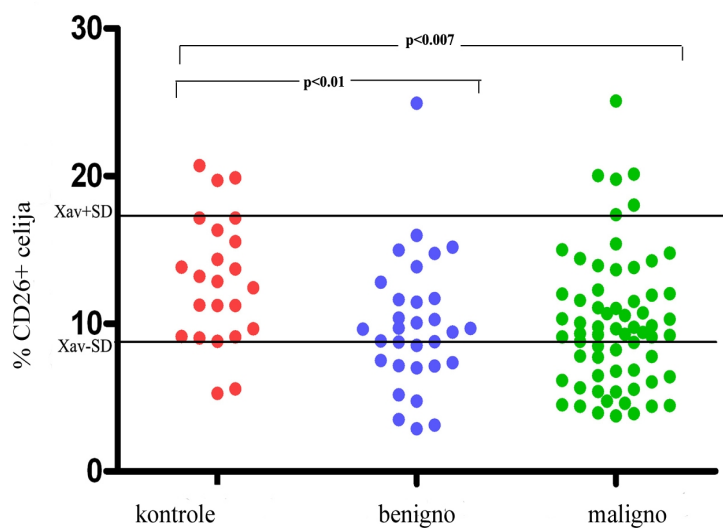
◇ **Ekspresija CD26 antigena na imunokompetentnim ćelijama periferne krvi kod bolesnica sa malignim i benignim promenama dojke, kao i kod zdravih kontrola**

U ranijim istraživanjima je potvrđeno da je prisustvo DPPIV u serumu povezano sa gubitkom transmembranskog CD26 antigena sa površine limfocita.⁵⁹⁻⁶¹ Shodno tome, u ovom radu ispitivana je ekspresija CD26 na populaciji leukocita, u grupama ispitanica i kod zdravih osoba.

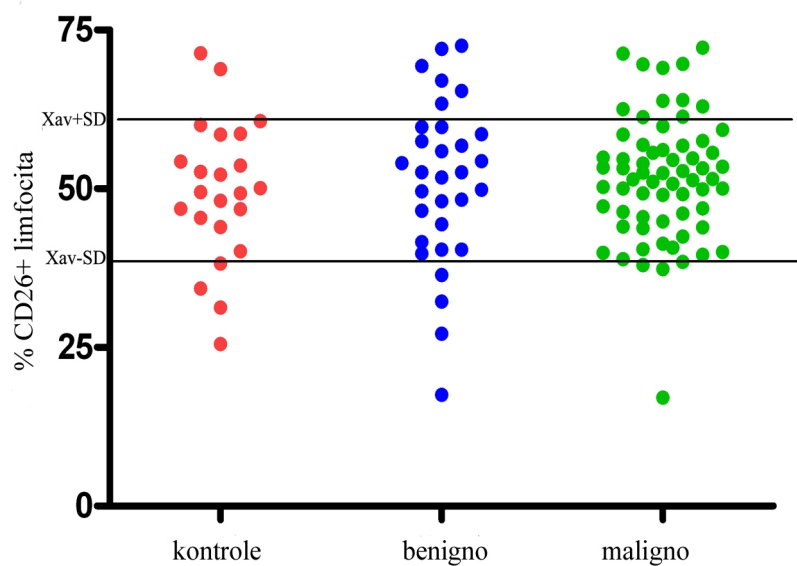
Podaci prikazani na grafikonu 4.6 pokazuju da postoji statistički značajano niži procenat ukupnih CD26⁺ ćelija (ukupna bela krvna zrnca periferne krvi sa ekspresijom CD26) u bolesnica sa benignim (Wilcoxon rank sum test: W= 210; p< 0.01) i malignim (Wilcoxon rank sum test sa korekcijom: W= 463; p< 0.007) promenama u komparaciji sa zdravim kontrolama. (tabela 4.1). Iako nije ustanovljena statistički značajna razlika u procentu CD26⁺ limfocita (grafikon 4.7) u grupama bolesnica i u grupi zdravih kontrola, bitno je napomenuti da postoji statistički značajan pad intenziteta fluorescencije u ekspresiji CD26 na limfocitima (p<0.012), jedino u grupi bolesnica sa malignim promenama u komparaciji sa zdravim kontrolama (grafikon 4.8). Značajno je, takođe, da je intenzitet fluorescencije (MFI - *mean fluorescence intensity*) ekspresije CD26 na polimorfonuklearnim ćelijama i monocitima bolesnica, kao i zdravih kontrola bio zanemarljiv.

Budući da je CD26 ecto-ADA vezujući kompleksni protein⁵⁹⁻⁶¹, promene u ekspresiji CD26/ADA na limfocitima mogu uticati na njihov broj (usled nesposobnosti ćelija bez ecto-ADA da konvertuju verovatno toksični adenzin u netoksični inozin). Shodno tome, u ovom radu analiziran je i procenat limfocita u krvi ispitivanih grupa (Tabela 4.1). Niže vrednosti (ali ne statistički značajne) u procentu limfocita prisutne su u bolesnica sa karcinomom dojke u komparaciji sa vrednostima za zdrave kontrole (Wilcoxon rank sum test: W= 558; p= 0.04932) (grafikon 4.9).

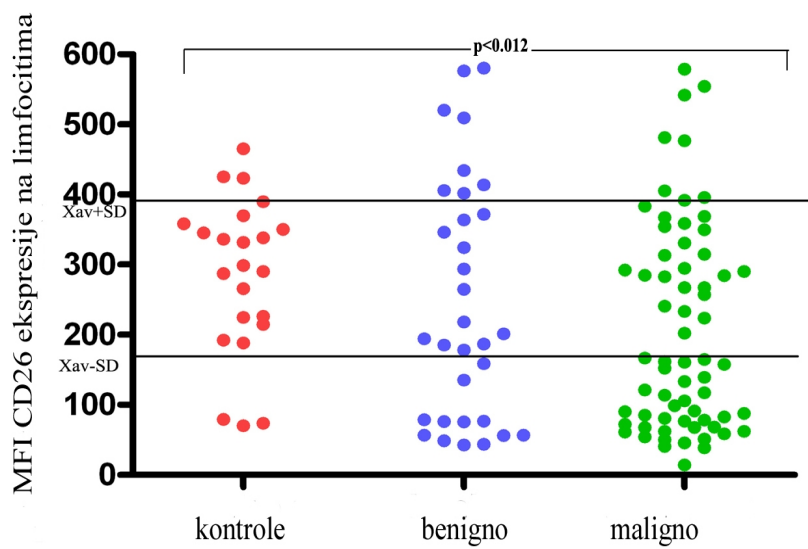
Reprezentativni FSC/SSC dot-blotovi za zdrave kontrole i za bolesnice sa malignim promenama dojke u kojima se može uočiti pad populacije limfocita, prikazani su u grafikon 4.10. Nadalje, grafikon 4.11 prikazuje reprezentativan histogram plot sa CD26⁺ preklapanjem zdravih kontrola i bolesnica sa karcinomom dojke sa slabijim CD26 bojenjem.



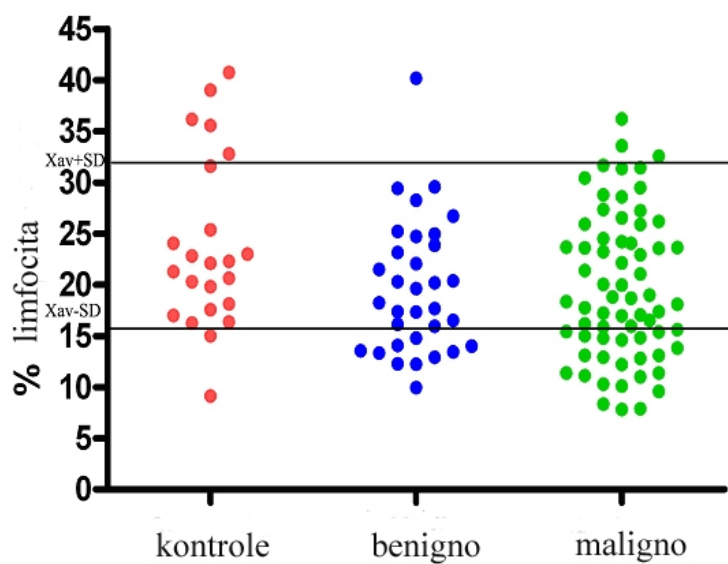
Grafikon 4.6. Procenat CD26⁺ ukupnih ćelija bele krvne loze kod zdravih kontrola i kod bolesnica sa benignim ili malignim promenama dojke. Xav+/-SD su *cut-off* vrednosti dobijene od zdravih kontrola.



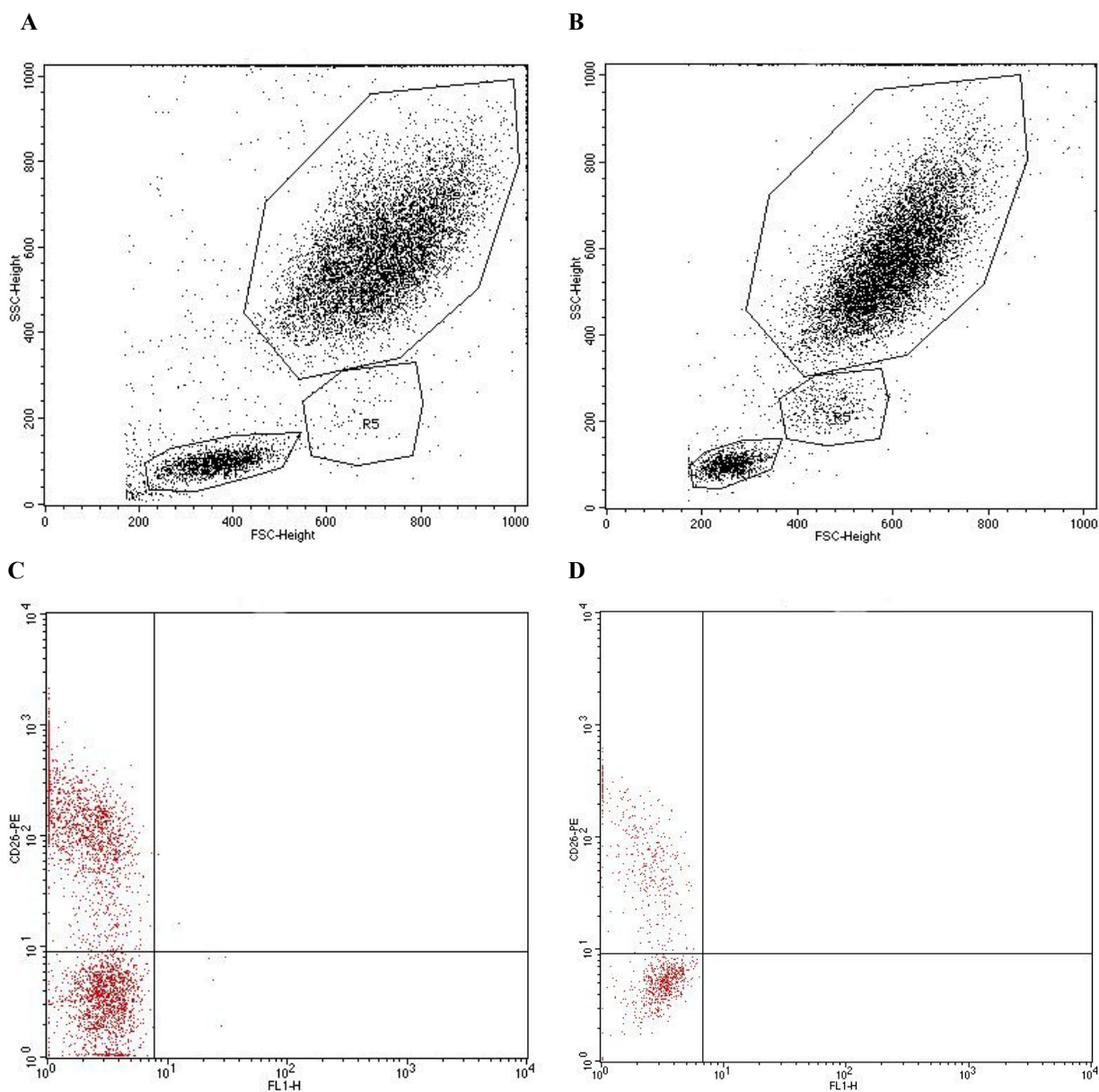
Grafikon 4.7. Procenat CD26⁺ limfocita kod zdravih kontrola i kod bolesnica sa benignim ili malignim promenama dojke. Xav+/-SD su *cut-off* vrednosti dobijene od zdravih kontrola.



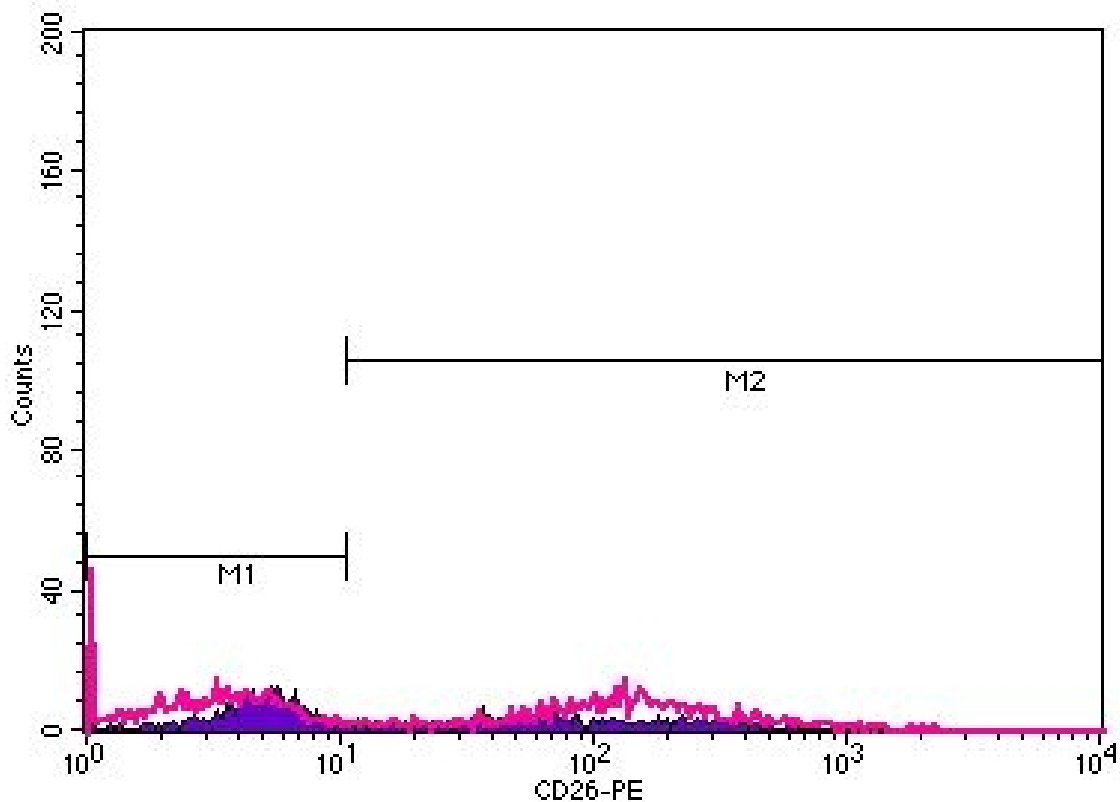
Grafikon 4.8. MFI ekspresije CD26 na limfocitima kod zdravih kontrola i kod bolesnica sa benignim ili malignim promenama dojke. $X_{av} \pm SD$ su *cut-off* vrednosti dobijene od zdravih kontrola.



Grafikon 4.9. Procenat limfocita kod zdravih kontrola i kod bolesnica sa benignim ili malignim promenama dojke. $X_{av} \pm SD$ su *cut-off* vrednosti dobijene od zdravih kontrola.



Grafikon 4.10. A.FSC/SSC dot-blot za zdrave kontrole pokazuje tri osnovne populacije ćelija bele krvne loze; B.FSC/SSC dot-blot za bolesnice sa malignim promenama dojke; C. i D.dot-plotovi “gejtovanih” limfocita, bojenih sa CD26, zdrave kontrole (C) i bolesnice sa malignim promenama dojke (D).



Grafikon 4.11. Histogram plot CD26⁺: smanjenje MFI kod bolesnica sa malignim promenama dojke (ljubičasto) u odnosu na zdrave kontrole (pink)

◇ **Veza između nivoa serumske aktivnosti DPPIV, CD26 bojenja ćelijske površine i kliničko-patoloških karakteristika bolesnica sa promenama dojke**

Moguća korelacija između DPPIV serumske aktivnosti, procenta limfocita, procenta CD26⁺ limfocita i CD26⁺ belih krvnih zrnaca ispitivana je u svakoj grupi (zdrave kontrole, kao i bolesnice sa benignim i malignim promenama dojke). Analizirane su, takođe, i reprezentativne podgrupe bolesnica sa malignim tumorima: podgrupa sa histološkim gradusom 2 (G2), podgrupe sa nuklearnim gradusom 1 i 2 (NG1 i NG2), podgrupe sa različitom veličinom tumora (T1 i T2), kao i podgrupe sa ili bez metastaza u regionalnim limfnim nodusima. Nije potvrđena statistički značajna razlika između pomenutih ispitivanih parametara u ispitivanim podgrupama bolesnica sa karcinomom dojke.

U ovim analizama je pokazano da 7 od 18 bolesnica sa karcinomom dojke koje su imale povišenu aktivnost serumske DPPIV, ima i snižen procenat (ispod *cut-off* vrednosti) CD26⁺ belih krvnih zrnaca i/ili snižen procenat limfocita. Takođe, u 12 od pomenutih 18 bolesnica sa karcinomom dojke, potvrđen je pad MFI CD26 ekspresije na limfocitima. Pokazano je i da je 36 od 66 bolesnica sa malignim promenama dojke ispoljilo pad MFI CD26 ekspresije na limfocitima, kao i da je 15 od njih imalo i snižen procenat limfocita (Tabela 4.2). Evidentiran pad MFI CD26 ekspresije na limfocitima nije u korelaciji sa prisustvom metastaza u regionalnim limfnim nodusima ispitivanih bolesnica.

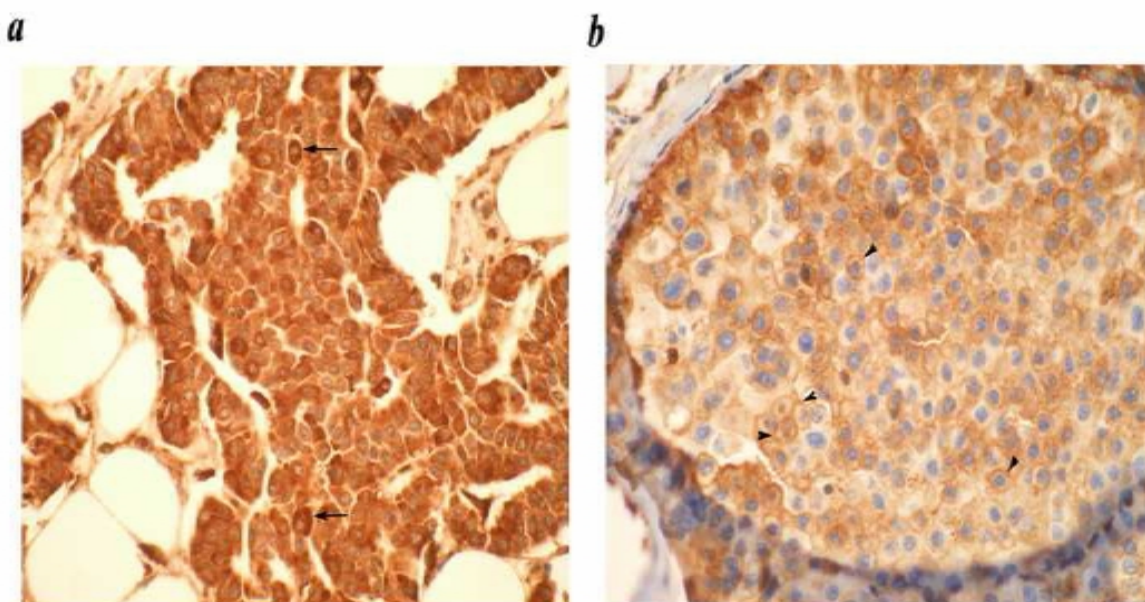
4.4 Ekspresija kalretikulina u benignim i malignim promenama dojke

Imunoreaktivnost antikalretikulinskih antitela sa kalretikulinom u ispitivanim isečcima tkiva dojke predstavljena je na slici 1a kao „intenzivno bojenje” (prikazano braon bojom) ćelija u kojima je uočena overekspresija kalretikulina. Analiza podataka dobijenih nakon imunohistohemijskog bojenja na kalretikulin tkivnih isečaka benignih ili malignih promena, prikazanih na slici 4.1a i 4.1b, pokazuje prisustvo citoplazmatske imunoreaktivnosti na kalretikulin u 55 i membranske u 8 analiziranih uzoraka od 57 (jedna bolesnica sa duktalnim karcinomom dojke od 58 ispitivanih sa malignom promenom je isključena iz analize, jer uzorak nije bio tehnički korektno načinjen) analiziranih uzoraka bolesnica sa malignim promenama (tabela 4.3).

Tabela 4.3. Učestalost bolesnica (n/57) sa malignim promenama dojke i nivo overekspresije kalretikulina u njihovim tkivnim isečcima

nivo overekspresije kalretikulina (intenzitet IHC* bojenja)	učestalost bolesnica (n/57) sa citoplazmatskim prebojavanjem kalretikulina	učestalost bolesnica (n/57) sa membranskim prebojavanjem kalretikulina
0	2/57	49/57
1+	20/57	4/57
2+	19/57	4/57
3+	16/57	0/57

*IHC - imunohistohemija



Slika 4.1. Overekspresija kalretikulina u duktalnom karcinomu dojke. Parafinski isečci obeleženi zečjim poliklonalnim antitelima (Abcam) na kalretikulin. Citoplazmatsko bojenje malignih ćelija – strelica (a). Membransko bojenje malignih ćelija na kalretikulin označeno glavom strelice (b)

Citoplazmatska imunoreaktivnost na kalretikulina je uočena u 17, a membranska u 11 od 26 analiziranih tkivnih isečaka benignih promena (jedna bolesnica od 27 ispitivanih sa benignim promenama je isključena iz analize, jer uzorak nije bio tehnički korektno načinjen) (tabela 4.4). Treba istaći da je značajna overekspresija kalretikulina (arbitrarno rangirana kao 2+ i 3+ intenzitet bojenja) u malignim ćelijama dojke uočena kod 35 od 57 analiziranih isečaka tumorskog tkiva, slab intenzitet bojenja (rangiran kao 1+) detektovan kod 20 od 57 uzoraka, a odsustvo bojenja ustanovljeno je kod 2 od 57 uzoraka tumorskog tkiva (tabela 4.3). Intenzivna (2+) membranska overekspresija kalretikulina konstatovana je samo kod 4 od 57 ispitivanih uzoraka. Slab intenzitet bojenja (1+) bio je prisutan takođe u 4 tkivna uzorka. Među bolesnicama sa duktalnim karcinomom intenzivna citoplazmatska overekspresija kalretikulina (2+ i 3+) konstatovana je kod 20, dok je slabo bojenje uočeno kod 7 od 27 analiziranih uzoraka. Sa druge strane, kod bolesnica sa lobularnim karcinomom, intenzivna citoplazmatska overekspresija kalretikulina (2+ i 3+) detektovana je kod 12, slab intenzitet bojenja kod 11, dok kod jedne od 24 analizirane bolesnice nije bilo prebojenosti tkivnog uzorka. U odnosu na intenzitet overekspresije kalretikulina, ovo istraživanje pokazuje da je intenzivna citoplazmatska overekspresija kalretikulina češće prisutna u tkivu duktalnog, nego lobularnog karcinoma. U ćelijama benignih promena dojke, intenzivna citoplazmatska overekspresija kalretikulina (2+ i 3+) prisutna je u 10 od 26, slab intenzitet bojenja (1+) uočena je u 7 od 26 analiziranih tkivnih isečaka, dok je 9 od 26 uzoraka bilo negativno na bojenje (tabela 4.4).

Tabela 4.4. Učestalost bolesnica (n/26) sa benignim promenama dojke i nivo overekspresije kalretikulina u njihovim tkivnim isečcima

nivo overekspresije kalretikulina (intenzitet IHC bojenja)	učestalost bolesnica (n/26) sa citoplazmatskim prebojavanjem kalretikulina	učestalost bolesnica (n/26) sa membranskim prebojavanjem kalretikulina
0	9/26	15/26
1+	7/26	6/26
2+	8/26	2/26
3+	2/26	3/26

Nadalje, treba napomenuti da, iako zdravo (ne-tumorsko) tkivo u najvećem broju ispitivanih tkivnih isečaka nije pokazalo imunoreaktivnost sa anti-kalretikulinskim antitelima, u 7 od 26 analiziranih uzoraka benignih promena, uočeno je bojenje okolnog normalnog epitela. Intenzivna (2+ i 3+) membranska overekspresija kalretikulina ustanovljena je kod 5 od 26, dok je slab intenzitet (1+) membranske overekspresije kalretikulina uočena kod 6 od 26 ispitivanih uzoraka benignih promena.

4.5 Određivanje serumskih nivoa IgA i IgG anti-kalretikulinskih antitela u bolesnica sa benignim i malignim promenama dojke

Serumski nivoi IgA i IgG anti-kalretikulinskih antitela određivani su za 56 bolesnica sa malignim i 23 bolesnice sa benignim promenama dojke.

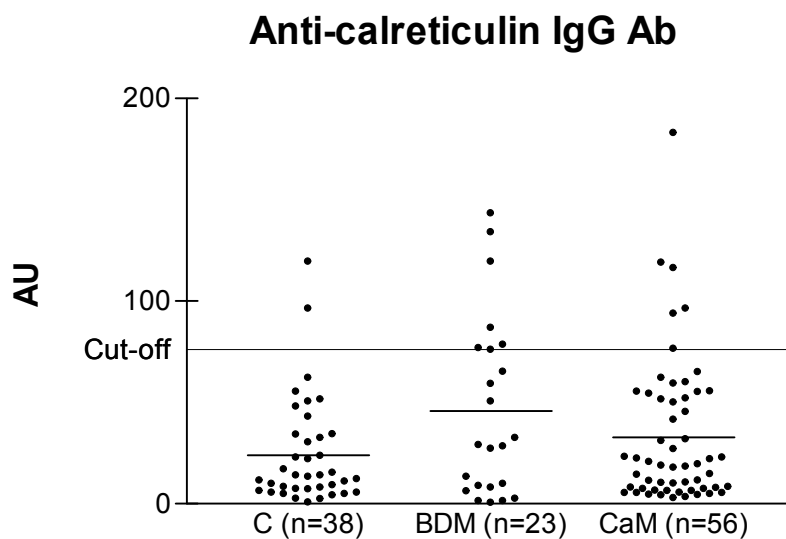
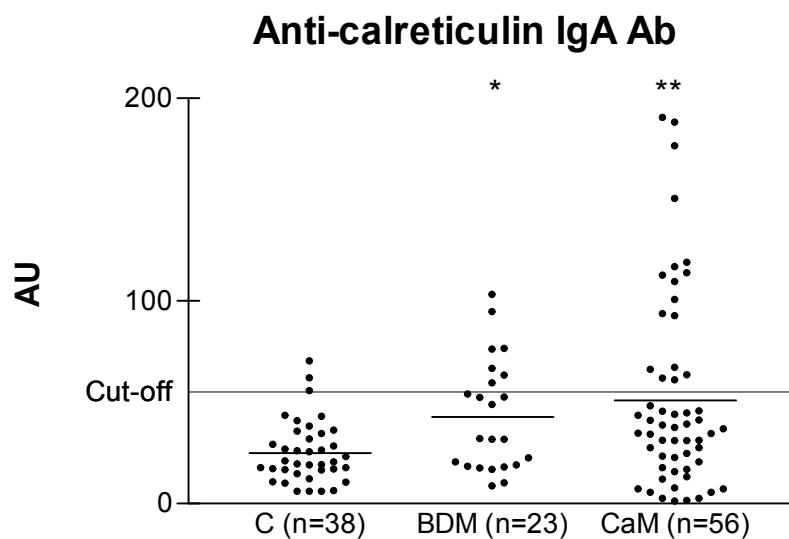
Cut-off vrednosti za određivanje nivoa anti-kalretikulinskih antitela ustanovljeni su analizom uzoraka 38 zdravih kontrola, kao srednja vrednost + 2 standardne devijacije (55 arbitrarnih jedinica za IgA, odnosno 76 za IgG). Distribucija serumskih IgA i IgG anti-kalretikulinskih antitela u bolesnica sa benignim i malignim promenama dojke i kod zdravih kontrola prikazana je na grafikonu 4.12. Srednje vrednosti nivoa serumskih IgA i IgG anti-kalretikulinskih antitela bile su najveće u grupi bolesnica sa malignim promenama ($51 \pm 47,6$ AU, srednja vrednost \pm s.d.), a ove vrednosti su bile povećane i kod bolesnica sa benignim promenama dojke ($42,8 \pm 27,6$ AU). Nivoi IgA anti-kalretikulinskih antitela bili su značajno povišeni kod bolesnica sa malignim promenama ($P < 0.01$), kao i kod bolesnica sa benignim promenama ($P < 0.05$), u komparaciji sa zdravim kontrolama ($24,9 \pm 15,3$ AU). Nasuprot, nije ustanovljen značajan porast serumskih nivoa IgG anti-kalretikulinskih antitela kod ovih bolesnica. Nivoi IgG anti-kalretikulinskih antitela bili su $32,8 \pm 35,9$ AU u grupi bolesnica sa malignim promenama, $45,8 \pm 44,6$ AU u bolesnica sa benignim promenama i $24 \pm 26,3$ AU kod zdravih kontrola. Takođe, nije konstatovana značajna razlika u nivoima IgA and IgG anti-kalretikulinskih antitela između dve ispitivane grupe bolesnica.

U bolesnica sa benignim promenama, 7 od 23 analizirane bolesnice su imale povišen serumski nivo IgA antitela. Povišen serumski nivo IgG antitela takođe je imalo 7 bolesnica iz ove grupe.

Analize seruma bolesnica sa malignim promenama dojke potvrdile su povišena IgA antitela na kalretikulin u 17 od 56 bolesnica. Među bolesnicama sa povišenim nivoom IgA antikalretikulinskih antitela, 9 od 17 su imale metastaze u regionalnim limfnim nodusima. Povišeni serumski nivoi IgG imunoglobulina na kalretikulin ustanovljeni su kod 6 od 56 bolesnica sa malignim promenama dojke. Samo jedna od ovih 6 bolesnica imala je metastatsku bolest u regionalnim limfaticima.

U zdravim kontrolama, povišeni serumski nivoi IgA antitela na kalretikulin ustanovljeni su kod 2 od 38 osoba, a takođe i povišeni serumski nivoi IgG antitela na kalretikulin konstatovani su kod 2 osobe.

Analizom odnosa overekspresije kalretikulina i humoralne imunosti na kalretikulin, potvrđeno je da se u 17 od 55 bolesnica sa intenzivnim kalretikulin-pozitivnim bojenjem ($\geq 1+$) malignih ćelija, ispoljava značajno viši nivo IgA i/ili IgG antikalretikulinskih antitela: 14 bolesnica je imalo povišen nivo IgA, 5 bolesnica je imalo povišen nivo IgG, a 2 bolesnice su imale povišene nivoe i IgA i IgG antitela (tabela 4.5). Sa druge strane, 7 od 17 bolesnica sa benignim promenama koje su pokazale intenzivo kalretikulin-pozitivno bojenje ($\geq 1+$) ćelija imalo je povišene nivoe IgA i/ili IgG anti-kalretikulinskih antitela: 5 je imalo povišen nivo IgA, 5 povišen nivo IgG, dok su 3 od ovih bolesnica imale povišene nivoe i IgA i IgG antitela.



Grafikon 4.12. Serumski nivoi IgA i IgG anti-kalretikulinskih antitela kod zdravih kontrola (C), benignih promena dojke (BBD) i malignih tumora (CaM). Serumski nivoi anti-kalretikulinskih antitela su izraženi u arbitrarnim jedinicama (AU). Pune linije označavaju srednju vrednost. *Cut-off* vrednosti su 55 AU za IgA i 76 AU za IgG antitela. ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$

Tabela 4.5. Bolesnice sa povišenom serumskom IgA i/ili IgG imunoreaktivnošću na kalretikulin zavisno od lokalizacije overekspresije kalretikulina (citoplazmatska i/ili membranska) u njihovim tkivnim isečcima

bolesnice	maligna promena (mg) vs. benigna promena (bg)	IgA imunoreaktivnost	IgG imunoreaktivnost	citoplazmatsko prebojavanje kalretikulina	membransko prebojavanje kalretikulina
1.	mg	+	-	1+	0
2.	mg	+	-	2+	2+
3.	mg	-	+	0	0
4.	mg	-	+	1+	0
5.	mg	+	-	2+	0
6.	mg	+	-	1+	0
7.	mg	-	+	2+	0
8.	mg	+	-	1+	0
9.*	mg	+	-	1+	0
10.*	mg	+	-	1+	0
11.*	mg	+	-	2+	0
12.	mg	+	-	2+	0
13.*	mg	+	-	1+	0
14.*	mg	+	-	2+	0
15.*	mg	+	-	2+	0
16.*	mg	+	+	2+	0
17.	mg	-	+	3+	0
18.	mg	+	+	1+	0
19.*	mg	+	-	nd	nd
20.	bg	+	-	2+	3+
21.	bg	-	+	1+	0
22.	bg	+	+	2+	0
23.	bg	+	+	1+	0
24.	bg	+	+	2+	0
25.	bg	+	-	2+	2+
26.	bg	+	-	0	0
27.	bg	-	+	2+	1+
28.	bg	-	+	nd	nd

* N+: bolesnice sa metastazama u regionalnim limfaticima nd: nije određeno

4.6 Ispitivanje relativne učestalosti određenih subpopulacija mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnica i zdravih osoba

Relativna učestalost (procentualna zastupljenost) CD16⁺ ("gejtovanih"-g i totalnih-t) i CD56⁺ mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC), izražena kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom, ispitivana je kod 65 bolesnica sa malignim promenama dojke, kod 32 bolesnice sa benignim promenama dojke i kod 33 zdrave kontrole.

Ispitivanjem relativne učestalosti gCD16^{dim+}/56^{dim+} i tCD16^{dim+}/56^{dim+} subpopulacija imunokompetentnih ćelija, nije evidentirana statistički značajna razlika u ispitivanim grupama. Ispitivanjem relativne učestalosti gCD16^{dim+}/56^{bright+} subpopulacija imunskih ćelija evidentirana je statistički značajna razlika kako između bolesnica sa malignim promenama i zdravih kontrola, tako i između bolesnica sa benignim promenama dojke i zdravih kontrola (tabela 4.6 i grafikon 4.13a), dok je u slučaju tCD16^{dim+}/56^{bright+} ćelija potvrđena statistički značajna razlika između bolesnica sa malignim promenama dojke i zdravih kontrola (tabela 4.6 i grafikon 4.13b).

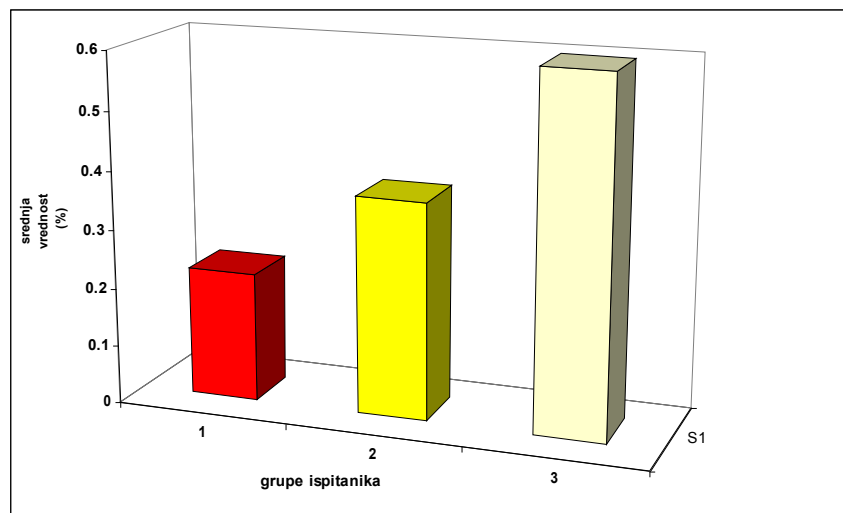
Statistički značajna razlika ustanovljena je i u relativnoj učestalosti gCD16^{bright+}/56^{dim+}, kako između bolesnica sa malignim promenama i zdravih kontrola, tako i između bolesnica sa benignim promenama dojke i zdravih kontrola (tabela 4.6 i grafikon 4.14).

Tabela 4.6. Prikaz relativne učestalosti CD16⁺/CD56⁺ imunokompetentnih ćelija i njegove statističke značajnosti po grupama

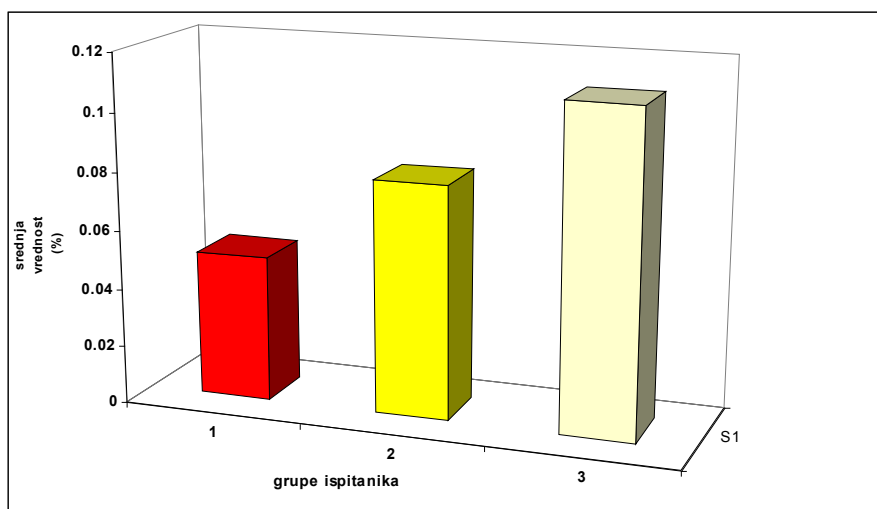
*subpopulacije PBMC (%)	**grupe ispitanika	broj ispitanika	relativna učestalost (%)	standardna devijacija (SD)	testiranje između grupe 1 i grupe 2	testiranje između grupe 1 i grupe 3	testiranje između grupe 2 i grupe 3
gCD16 ^{dim+} /56 ^{dim+}	1	65	2.7	2.99	W=1044	W=1154	W=568.5
	2	32	3.13	4.94	p=0.98	p=0.54	p=0.6
	3	33	1.89	1.63			
tCD16 ^{dim+} /56 ^{dim+}	1	65	0.49	0.56	W=1026	W=1294.5	W=643.5
	2	32	0.58	0.81	p=0.91	p=0.09	p 0.13
	3	33	0.3	0.26			
gCD16 ^{dim+} /56 ^{bright+}	1	65	0.22	0.38	W=959	W=606	W=371
	2	32	0.37	0.67	p 0.51	p=0.0003	p 0.03
	3	33	0.6	0.6			
tCD16 ^{dim+} /56 ^{bright+}	1	65	0.05	0.08	W=973.5	W=688.5	W=388
	2	32	0.08	0.14	p=0.59	p=0.003	p=0.06
	3	33	0.11	0.14			
gCD16 ^{bright+} /56 ^{dim+}	1	65	5.78	6.08	W=1015.5	W= 695.5	W=324
	2	32	5.72	6.18	p=0.85	p=0.005	p=0.007
	3	33	8.46	4.61			
tCD16 ^{bright+} /56 ^{dim+}	1	65	1.29	1.5	W=1033.5	W=875	W=417.5
	2	32	1.29	1.63	p=0.96	p=0.14	p=0.15
	3	33	1.42	1.11			
gCD16 ^{bright+} /56 ^{bright+}	1	65	0	0.02	W=1006	W=1003.5	W=510
	2	32	0.01	0.02	p=0.56	p=0.27	p=0.62
	3	33	0.02	0.07			
tCD16 ^{bright+} /56 ^{bright+}	1	65	0	0.01	W=1006.5	W=1008	W=513.5
	2	32	0	0	p=0.57	P=0.31	p=0.83
	3	33	0	0.02			
gCD16 ⁺ /56 ⁺ (ly)	1	65	8.7	6.11	W=1024	W=810	W=402
	2	32	9.24	7.35	p=0.9	p=0.05	p=0.09
	3	33	10.96	5.68			
tCD16 ⁺ /56 ⁺ (ly)	1	65	1.83	1.54	W=1036	W=1034	W=509
	2	32	1.94	1.74	p=0.98	p=0.77	p=0.81
	3	33	1.84	1.35			

Legenda:

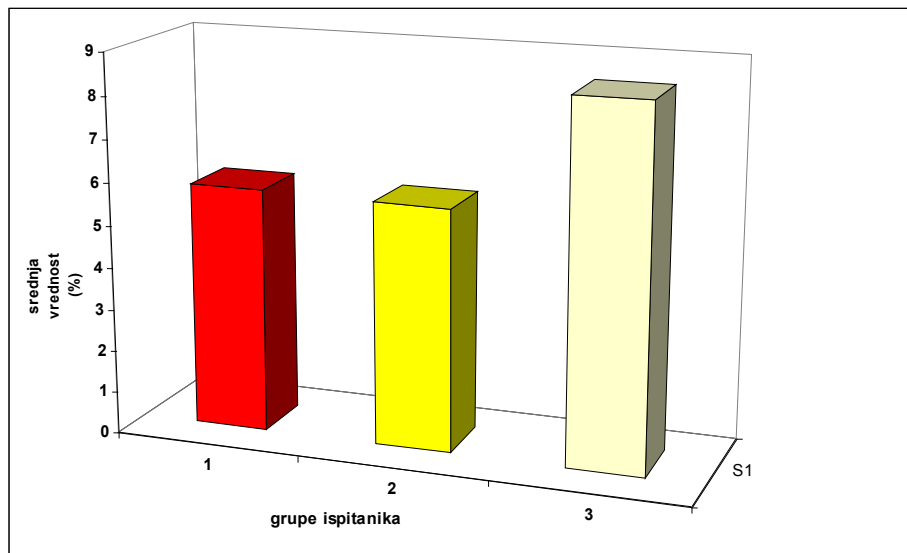
***PBMC:** mononuklearne ćelije periferne krvi
****grupe ispitanika:** 1. bolesnice sa malignim promenama dojke; 2. bolesnice sa benignim promenama dojke; 3. zdrave osobe (kontrole)



Grafikon 4.13a. Distribucija gCD16^{dim+}/56^{bright+} (%) po grupama (p<0,01 između 1. i 3. grupe; p<0,05 između 2. i 3. grupe)



Grafikon 4.13b. Distribucija tCD16^{dim+}/56^{bright+} (%) po grupama (p<0,01 između 1. i 3. grupe)



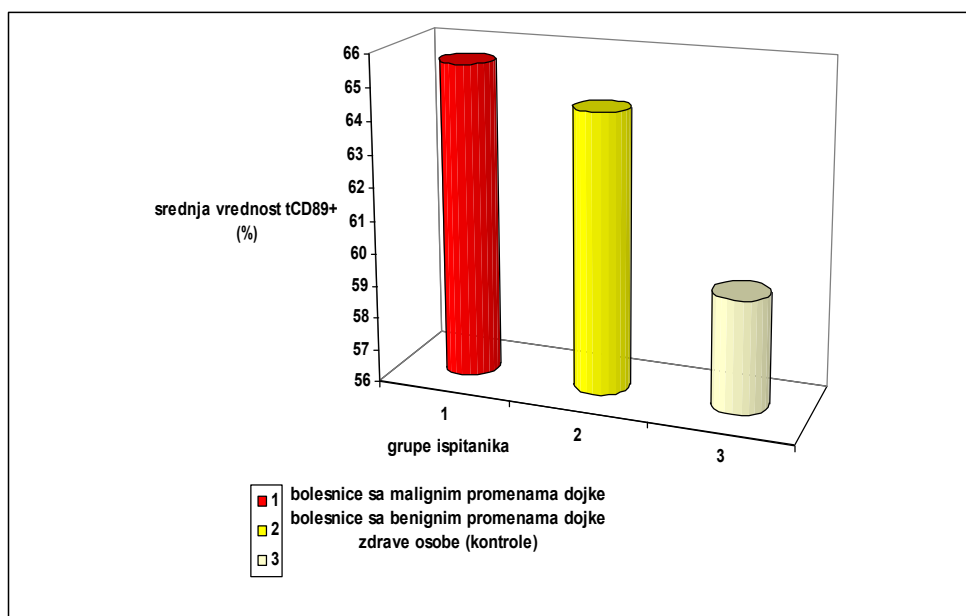
Grafikon 4.14. Distribucija $gCD16^{\text{bright+}}/56^{\text{dim+}}$ (%) po grupama ($p < 0,01$ između 1. i 3. grupe; $p < 0,01$ između 2. i 3. grupe)

Ispitivanjem relativne učestalosti ostalih subpopulacija PBMC: $tCD16^{\text{bright+}}/56^{\text{dim+}}$, $gCD16^{\text{bright+}}/56^{\text{bright+}}$, $tCD16^{\text{bright+}}/56^{\text{bright+}}$ na granulocitnoj, kao i $gCD16^+/56^+$ i $tCD16^+/56^+$ na limfocitnoj subpopulaciji, nije evidentirana statistički značajna razlika među ispitivanim grupama (tabela 4.6).

Relativna učestalost $CD89^+$ subpopulacija ("gejtovanih"-g i totalnih-t) imunskih ćelija, izražena kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom, ispitivana je kod 64 bolesnice sa malignim promenama dojke, kod 34 bolesnice sa benignim promenama dojke i kod 37 zdravih kontrola. Evidentirana je statistički značajna razlika u relativnoj učestalosti $tCD89^+$ subpopulacija između bolesnica sa malignim promenama i zdravih kontrola, kao i između bolesnica sa benignim promenama i zdravih kontrola (tabela 4.7 i grafikon 4.15).

Tabela 4.7. Prikaz relativne učestalosti gCD89⁺ i tCD89⁺ imunokomponentnih ćelija i njegove statističke značajnosti po grupama

subpopulacije PBMC (%)	grupe ispitanika	broj ispitanika	relativna učestalost (%)	standardna devijacija (SD)	testiranje između grupe 1 i grupe 2	testiranje između grupe 1 i grupe 3	testiranje između grupe 2 i grupe 3
gCD89 ⁺	grupa 1	64	97.63	4.47	W=1322.5 p=0.08	W=1329.5 p 0.31	W=566.5 p=0.48
	grupa 2	34	95.82	6.27			
	grupa 3	37	97.06	7.03			
tCD89 ⁺	grupa 1	64	65.57	10.09	W=1050.5 p=0.78	W=1585 p=0.005	W=857 p=0.008
	grupa 2	34	64.48	14.8			
	grupa 3	37	59.44	10.17			



Grafikon 4.15. Distribucija tCD89⁺ (%) po grupama (p<0,01, između 1 i 3 i između 2 i 3)

Relativna učestalost gCD16/89⁺ i tCD16/89⁺ subpopulacija imunokomponentnih ćelija, izražena kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom, ispitivana je kod 64 bolesnice sa malignim promenama dojke, kod 34 bolesnice sa benignim promenama

dojke i kod 37 zdravih kontrola. Nije evidentirana statistički značajna razlika u relativnoj učestalosti ovih parametra između testiranih grupa. (tabela 4.8).

Tabela 4.8. Prikaz relativne učestalosti CD16/89⁺ PBMC i njegove statističke značajnosti po grupama

subpopulacije PBMC (%)	grupe ispitanika	broj ispitanika	relativna učestalost (%)	standardna devijacija (SD)	testiranje između grupe 1 i grupe 2	testiranje između grupe 1 i grupe 3	testiranje između grupe 2 i grupe 3
gCD16/89 ⁺	grupa 1	64	90.4	14.53	W=	W=	W=
	grupa 2	34	88.16	16.84	1172	1031	497.5
	grupa 3	37	93.42	13	p= 0.53	p= 0.28	p= 0.13
tCD16/89 ⁺	grupa 1	64	60.64	12.43	W=	W=	W=
	grupa 2	34	58.31	14.42	1158.5	1120.5	553.5
	grupa 3	37	62.47	8	p= 0.60	p= 0.65	p= 0.39

Legenda:

- ***PBMC:** mononuklearne ćelije periferne krvi
- ****grupe ispitanika:** 1. bolesnice sa malignim promenama dojke; 2. bolesnice sa benignim promenama dojke; 3. zdrave osobe (kontrola)
- *****W:** Wilcoxon-ov test sume rangova
- ******p:** statistički značajna razlika

5. DISKUSIJA

5.1 Epidemiološke karakteristike uzorka

U ovom istraživanju učestvovalo je 105 bolesnica sa benignim ili malignim promenama dojke, predviđenih za primarnu hiruršku terapiju, jednom od poštenih hirurških intervencija ili modifikovanom radikalnom mastektomijom (klinički stadijumi 0, I, IIA i IIB), od kojih 68 sa malignim i 37 sa benignim promenama dojke (prosečna starost bolesnica je 54,4 godine). U istraživanju je učestvovalo i 37 zdravih kontrola. Primarni cilj istraživanja je bio da se ispita aktivnost serumske dipeptidil-peptidaze IV (DPPIV) i ekspresije CD26 antigena na imunokompetentnim ćelijama periferne krvi kod bolesnica sa malignim i benignim promenama dojke, kao i kod zdravih kontrola. Osim pomenutih parametara ćelijskog imunskog odgovora, u navedenim grupama dodatno su analizirani i neki aspekti humoralnog imunskog odgovora, koji se odnose na ispitivanje serumskih nivoa antikalretikulinskih IgA i IgG antitela; ispitivana je i povezanost između intenziteta i lokalizacije ćelijske (membranska ili citoplazmatska) ekspresije kalretikulina u tkivnim isečcima tumorskog tkiva dojke i prisustva povišenih nivoa serumskih IgA i IgG antikalretikulinskih antitela. Istraživanje je dopunjeno ispitivanjem relativne učestalosti (procentualne zastupljenosti) određenih limfocitnih subpopulacija: CD16⁺/56⁺ i CD16⁺/89⁺ kod bolesnica sa malignim i benignim promenama dojke, kao i kod zdravih kontrola.

5.2 Serumska aktivnost DPPIV i ekspresija CD26 na mononuklearnim ćelijama periferne krvi

Dipeptidil-peptidaza IV (DPPIV) ili glikoprotein CD26, prvobitno je opisan 1966. god., na osnovu aktivnosti DPPIV u humanojoj jetri.¹³⁸ Ekspimiran je kako na površini normalnih epitelijelnih ćelija različitih organa (pankreas, jetra, creva, bubrezi, prostata,

lakrimalne, salivarne, znojne žlezde, endotel krvnih sudova, pretežno kapilara, uterus, placenta, pluća), tako i na ćelijama imunskog sistema (T i B limfociti, ćelije prirodne ubice-NK ćelije, makrofagi), zbog čega je ovaj molekul uključen u različite fiziološke funkcije i imunsku regulaciju. Osim pomenute fiziološke i regulatorne uloge DPPIV, brojna istraživanja tokom protekle dve decenije su potvrdila značaj ovog molekula i u autoimunskim oboljenjima, kao i metaboličkim poremećajima, a novija istraživanja sve češće apostrofiraju njegovu ulogu u biologiji karcinoma.^{60-63, 67}

Prethodna istraživanja koja se odnose na ispitivanje uloge DPPIV i ekspresije CD26 na ćelijama imunskog sistema u različitim tumorima, pružaju često kontradiktorne informacije. U hepatocelularnom karcinomu i u melanomu, na primer, potvrđen je gubitak ekspresije ili aktivnosti DPPIV.^{75, 76} Takođe, gubitak ekspresije DPPIV, kao i smanjenje njene enzimske aktivnosti potvrđeni su u nekim karcinomima pluća, mada je ustanovljena i supresija rasta tih tumora.⁷⁷ U nekim tumorima odsustvo CD26 dovodi se u vezu sa njihovim razvojem, dok je u nekim drugim tumorima prisustvo ovog enzima povezano sa agresivnim ponašanjem tumora.⁶⁷ U našem istraživanju, relativna učestalost (%) ukupnih ćelija bele krvne loze koje ekspimiraju CD26 bila je značajno niža u ispitivanim grupama bolesnica, u komparaciji sa zdravim kontrolama. Nije bilo statistički značajne razlike u procentu CD26⁺ limfocita ispitivanih bolesnica sa benignim ili malignim promenama, u odnosu na zdrave kontrole. Sa druge strane, statistički značajno smanjenje srednje vrednosti intenziteta fluorescencije ekspresije CD26 na limfocitima ustanovljena je samo u grupi bolesnica sa malignim promenama dojke u komparaciji sa zdravim kontrolama. Objašnjenje ove činjenice, u svetlu rezultata našeg istraživanja, može ležati u tome da procenat limfocita opada u bolesnica sa malignim promenama, u komparaciji sa zdravim kontrolama, što može biti rezultat tumor-zavisne imunosupresije, ali su potrebna dalja ispitivanja da bi se to potvrdilo.

U brojnim studijama su, metodama imunodetekcije, analizirani nivoi sCD26 u serumu pacijenata sa malignitetima i potvrđeno je postojanje izmenjenih serumskih nivoa sCD26 molekula i DPPIV aktivnosti.⁶³ Kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom ustanovljeni su sniženi nivoi sCD26 u serumu u komparaciji sa zdravim kontrolama, posebno u ranim stadijumima bolesti, što može sugerisati potencijalnu ulogu solubilne forme ovog molekula u ranoj dijagnozi ovog karcinoma.^{89, 139} Druga grupa autora je, međutim, na maloj kohorti pacijenata sa kolorektalnim karcinomom ustanovila,

testovima enzimske aktivnosti, porast DPPIV aktivnosti.¹⁴⁰ Studije često mogu pokazati kontradiktorne rezultate, u zavisnosti od definicije specifične aktivnosti, ali i od stadijuma bolesti ispitivane grupe pacijenata.^{89, 139, 141} U prethodnim studijama je pokazano, ELISA metodom, da količina sCD26 antigena u serumu zdravih osoba korelira sa vrednostima dobijenim merenjem specifične serumske aktivnosti DPPIV.^{61, 142} U našem istraživanju, granične referentne ("cut-off") vrednosti za serumku aktivnost DPPIV, dobijene na osnovu vrednosti za zdrave kontrole, poklapaju se sa podacima publikovanim u prethodnim istraživanjima, mada su u nekim publikacijama prikazani kako viši, tako i niži nivoi aktivnosti serumske DPPIV za manje grupe zdravih kontrola.^{63,143-148} Podaci iz našeg istraživanja po prvi put ukazuju da nema statistički značajne razlike u nivou serumske aktivnosti DPPIV bolesnica sa karcinomom dojke, kao ni u grupi bolesnica sa benignim promenama dojke, u komparaciji sa zdravim kontrolama. Povišena enzimska aktivnost DPPIV je potvrđena kako kod pacijenata sa zloćudnim bolestima (npr. T-ćelijski maligniteti, non-Hodgkin limfomi, gde je ekspresija DPPIV prisutna u agresivnim tipovima tumora i obično je povezana sa lošom prognozom),^{82, 149, 150} tako i u sklopu mnogih drugih, nemalignih bolesti (hepatitis, holestaza, osteoporoza),^{142, 151} sistemskih bolesti (reumatoidni artritis, lupus erythematosus, Sjögren-ov sindrom),^{152, 153} dok je u nekim psihičkim poremećajima vezanim za ishranu (anoreksija i bulimija) snižena.¹⁴³ U našem istraživanju, učestalost bolesnica sa povišenom serumskom aktivnošću DPPIV bila je veća u grupi bolesnica sa karcinomom dojke (v. Rezultate, tabela 2), što govori u prilog potencijalne involviranosti ovog molekula u razvoj tog karcinoma. Ipak, treba naglasiti da neki drugi serumski proteini ispoljavaju aktivnost sličnu DPPIV i da njihova aktivnost doprinosi oko 10% vrednostima normalnih nivoa DPPIV. Pored toga, pokazano je da se ovi nivoi mogu menjati u nekim bolestima,^{63, 154} zbog čega je potrebno uraditi dalje protein-specifične testove. Ipak, rezultati iz ovog rada doprinose porastu informacija o aktivnosti serumske DPPIV u bolesnica sa malignim promenama dojke. Činjenica da su neke bolesnice u našem istraživanju sa povišenom serumskom aktivnošću DPPIV imale sniženu relativnu učestalost CD26⁺ ćelija bele krvne loze i/ili sniženu relativnu učestalost limfocita, ukazuju na neke populacije PBMC kao na izvorište, makar delimično, solubilne forme CD26/DPPIV, nastale proteolitičkim cepanjem i/ili sekrecijom CD26 antigena, što je pokazano u nekim prethodnim istraživanjima.^{61, 63}

Na proonkogene aktivnosti ovog molekula ukazuje i formiranje kompleksa CD26-ADA (v. Uvod) sa plazminogenom. Naime, vezivanje plazminogena za receptore ćelijske površine dovodi do njegove konverzije u plazmin, što je potrebno za proteolizu ekstraćelijskog matriksa u brojnim procesima, uključujući ćelijsku migraciju, tumorsku ćelijsku invaziju i metastaziranje.¹⁵⁵

Sa druge strane, snižene vrednosti DPPIV aktivnosti zabeležene su, takođe, kod pacijenata sa malignitetima (karcinom štitaste žlezde, usne duplje),^{156, 157} zatim u sklopu nekih inflamatornih oboljenja i infekcija (hepatitis C, inflamatorna bolest creva),^{158, 159} metaboličkih poremećaja (tip II dijabetes),¹⁶⁰ kao i u nekih pacijenata sa psihičkim poremećajima (depresija, anksioznost).^{161, 162} Budući da su ranija istraživanja ukazala na mogući prognostički značaj određivanja enzimske aktivnosti DPPIV kod pacijenata sa različitim malignitetima,^{61, 163} povišene vrednosti ovog parametra kod pacijenata sa navedenim nemaligim bolestima mogle bi, posredno, usmeriti razmišljanje i dalje laboratorijske i kliničke procedure ka dijagnostici malignih bolesti, uključujući i karcinom dojke.

Metastaziranje tumora se odvija u nekoliko faza: adhezija, migracija i invazija karcinomskih ćelija, a uloga DPPIV posebno je istaknuta u fazi adhezije. Dve osnovne karakteristike DPPIV mogu se smatrati odgovornim za njegovu ulogu adhezivnog molekula za ćelije karcinoma. Prva osobina se odnosi na njegovu enzimsku funkciju – DPPIV koristi svoj supstrat-vezujući domen za formiranje adhezivnog spoja sa supstratom na površini tumorske ćelije. Druga osobina se odnosi na sposobnost DPPIV da se vezuje za fibronektin (FN), komponentu ekstraćelijskog matriksa, domenom različitim od mesta kojim prepoznaje supstrat.¹⁶⁴

Kada je u pitanju karcinom dojke, dostupne baze podataka ukazuju da su istraživanja rađena pretežno na animalnim modelima, uglavnom pacova. U opštem procesu metastaziranja, pa tako i u slučaju karcinoma dojke, maligne ćelije ulaze u cirkulaciju, nakon čega dolazi do adhezije površinskih molekula tumorskih ćelija za komponente endotela sekundarnih organa. U animalnom modelu karcinoma dojke kod pacova, pokazano je da DPPIV na plućnim kapilarima ima ulogu adhezivnog molekula za ćelije metastatskog karcinoma dojke,¹⁶⁵ što je objašnjeno ulogom fibronektina na površini metastatskih ćelija dojke, koji posreduje u vezivanju tih ćelija za DPPIV koji je eksprimiran na endotelu plućnih kapilara.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ Zapravo, potvrđeno je da je DPPIV

endotelijelni adhezioni molekul za ćelije karcinoma dojke pacova i da posreduje u nastanku plućnih metastaza.¹⁶⁵ Studija koja se odnosi na DPPIV-posredovane plućne metastaze karcinoma dojke potvrdila je da nedostatak ekspresije DPPIV na endotelu Fischer 344/CRJ pacova u samo 33% slučajeva dovodi do metastaza u plućima, za razliku od DPPIV-pozitivnih pacova. Nasuprot tome, eksperimenti sa solubilnim DPPIV pokazuju da kod DPPIV-pozitivnih pacova postoji redukcija metastaza za čak 80%,¹⁶⁸ za razliku od rezultata u našem radu, gde je pokazano da postoji povećana učestalost bolesnica sa malignim promenama koje imaju povišenu serumsku aktivnost DPPIV. Sa druge strane, većina bolesnica sa malignim promenama dojke iz našeg rada imala je histološki gradus 2 (G2) i nuklearni gradus 2 (NG2) i bila je bez metastaza u regionalnim limfaticima, tako da izgleda da neujednačeno prisustvo CD26/DPPIV, solubilne ili transmembranske forme, ne korelira sa stadijumom bolesti. Pad relativne učestalosti (%) CD26⁺ ćelija bele krvne loze, odnosno snižena ekspresija CD26 na limfocitima, takođe su karakteristika ove grupe bolesnica. U ranijim istraživanjima, ustanovljeno je da su u metastatskoj bolesti kostiju nivoi serumske aktivnosti DPPIV neizmenjeni.⁶³ U našem istraživanju dve bolesnice su imale dijagnostikovanu metastatsku bolest kostiju na prvoj kontroli. Kod obe su konstatovane normalne vrednosti serumske aktivnosti DPPIV, što je u saglasnosti sa dosadašnjim publikovanim rezultatima.

Budući da je kao ligand za DPPIV identifikovan fibronektin na površini tumorskih ćelija, sledstveno tome, ustanovljena je korelacija između nivoa ekspresije fibronektina i sposobnosti tumorskih ćelija da se vežu za DPPIV i metastaziraju u pluća. Pokazano je da su DPPIV/FN-posredovana adhezija i metastaziranje blokirani ako su tumorske ćelije prethodno inkubirane sa sDPPIV. Adhezija takođe može biti blokirana anti-DPPIV monoklonskim antitelima, kao i anti-FN antiserumom, ali ne i solubilnim fibronektinom iz plazme, što je verovatno slučaj kod hematogenog širenja karcinoma *in vivo*. Interakcija između fibronektina na površini tumorske ćelije i DPPIV odvija se nezavisno od supstrat domena na DPPIV, ali verovatno zavisi od konformacije FN supstrata.¹⁶⁵

Imunohistohemijske analize su pokazale da i ćelije ovarijalnog karcinoma ekspimiraju DPPIV.¹⁶⁹ Međutim, za razliku od DPPIV ekspimiranog na endotelu kapilara pluća pacova koji funkcioniše kao adhezioni molekul za ćelije karcinoma dojke, eksperimenti

na ćelijskim linijama karcinoma ovarijuma, nisu potvrdile njegovu adhezivnu funkciju. Sa druge strane, pokazano je da humane peritonealne mezotelijelne ćelije ekspimiraju visoke nivoe DPPIV. S obzirom da je peritonealna diseminacija glavni metastatski put širenja ovarijalnog karcinoma, DPPIV na mezotelijelnim ćelijama bi mogao biti vrlo važan u procesu njegove diseminacije. Na primeru karcinoma ovarijuma je pokazano da je adhezija karcinomskih ćelija linije SKOV3 za mezotelijelne ćelije u blagom porastu nakon transfekcije DPPIV u ćelije linije SKOV3.^{78, 169} Na ćelijskim linijama karcinoma ovarijuma je takođe potvrđeno, kao i u brojnim prethodnim istraživanjima, da su kolagen i fibronektin neophodni za adheziju za DPPIV.^{170, 171} Naime, ustanovljeno je da je fibronektin ključan protein za adheziju ćelija ovarijalnog karcinoma za mezotelijelne ćelije, kao i u procesu invazije i proliferacije kada ćelije karcinoma ekspimiraju DPPIV.¹⁶⁹ Evaluirajući ekspresiju DPPIV u različitim ćelijskim linijama ovarijalnog karcinoma, određivan je intenzitet fluorescencije za DPPIV u njima. Tri od pet analiziranih ćelijskih linija su pokazale pozitivnost na DPPIV, dok su dve bile skoro negativne, što je bilo u saglasnosti sa podacima dobijenim analizom enzimske aktivnosti. Potvrđeno je i da je ekspresija DPPIV bila u negativnoj korelaciji sa invazivnim potencijalom. Pored toga, analizom ćelijske morfologije, utvrđeno je da DPPIV-ekspimirajuće ćelijske linije imaju tendenciju ka epiteloidnom izgledu, za razliku od onih koje ne ekspimiraju DPPIV, koje su nalik fibroblastima. Potvrđeno je, takođe, na animalnim modelima, da dolazi do značajno manje diseminacije tumora nakon inokulacije DPPIV-ekspimirajućih ćelija nego u slučaju inokulacije ćelija koje ne ekspimiraju DPPIV, što ukazuje da većina adherentnih ćelija ne može da raste ili biva eliminisana zbog gubitka invazivnog ili migracionog potencijala, za šta je odgovoran DPPIV.¹⁶³ Transfekcija DPPIV u ćelije karcinoma dovodi do porasta ćelijske adhezije i smanjenja migracionog i invazivnog potencijala.¹⁶³ Međutim, budući da nakon dodatka DPPIV inhibitora nije došlo do promene invazivnosti, pretpostavlja se da enzimska aktivnost DPPIV nije uključena u sam proces invazije.⁷⁸ Rezultati ovog istraživanja su pokazali da overekspresija u ćelijama karcinoma ovarijuma dovodi do redukcije kako (intraperitonealne) diseminacije karcinoma, tako i do prolongiranja vremena preživljavanja *in vivo*.¹⁶⁹ Metastatski potencijal ćelijskih linija ovarijalnog karcinoma ispitan je i inokulacijom u abdominalnu duplju miševa ćelijskih linija koje ekspimiraju DPPIV. Svi miševi su razvili karcinomatozu peritoneuma i egzitirali.

Potvrđeno je da su karcinomske ćelijske linije sa višom ekspresijom DPPIV imale značajno niži metastatski potencijal *in vivo*.¹⁶³

Ustanovljeno je da je u karcinomu endometrijuma nivo ekspresije DPPIV u negativnoj korelaciji sa gradusom tumora, što implicira da ćelije karcinoma koje poseduju visok invazivni potencijal, ispoljavaju nižu ekspresiju DPPIV. Može se pretpostaviti da visok nivo ekspresije DPPIV dovodi do čvrste međućelijske adhezije, zbog čega se maligne ćelije prvobitno teže odvajaju od samog tumora, da bi, kada se jednom odvoje, njihovo pripajanje za peritoneum bilo olakšano dejstvom DPPIV.¹⁶⁹ U endometrijalnom adenokarcinomu, imunohistohemijski je utvrđeno da je DPPIV lokalizovan u samim ćelijama karcinoma, dok je u ćelijama strome odsutan. U gradusu I tumora, DPPIV imunoreaktivnost je bila izrazita ili srednje izražena, dok je u gradusu II i III ekspresija bila slaba ili odsutna. Ova inverzna korelacija između DPPIV imunoreaktivnosti i gradusa tumora je statistički značajna.⁸⁰

U tkivnim uzorcima hirurški tretiranih karcinoma ovarijuma, kao i u slučaju adenokarcinoma endometrijuma, DPPIV imunoreaktivnost je potvrđena u ćelijama karcinoma, dok u ćelijama strome nije. Intenzitet imunohistohemijskog bojenja bio je izraženiji u dobro diferentovanim ili neinfiltrativnim karcinomima ovarijuma, u komparaciji sa slabo diferentovanim karcinomima. Ovi podaci ukazuju da nishodna regulacija ekspresije DPPIV korelira sa neoplastičnom transformacijom i tumorskom progresijom.⁷⁸ Slični rezultati su potvrđeni i kod karcinoma kože. Naime, prekancerozne dermatoze i bazocelularni karcinom pokazali su viši nivo DPPIV aktivnosti u odnosu na benigne lezije i normalnu kožu, dok kod slabo diferentovanog skvamoznog karcinoma nije detektovana DPPIV aktivnost.¹⁷²

Nasuprot ovim rezultatima, povišena ekspresija DPPIV ustanovljena je kod karcinoma prostate i tiroidne žlezde.^{87, 173} U karcinomu prostate, ali i u benignoj hipertrofiji, detektovana je DPPIV aktivnost u epitelijelnim ćelijama, ali ne i u stromalnim ćelijama i aktivnost je bila viša u karcinomima nego u benignim lezijama.⁸⁷ U tkivima malignih lezija štitaste žlezde (papilarni i folikularni karcinom) potvrđeno je postojanje aktivnosti DPPIV, dok u benignim lezijama nije.¹⁷³ Značajno niži nivoi mRNA DPPIV su potvrđeni u biološki agresivnijoj formi - nediferentovanom anaplastičnom tiroidnom karcinomu u odnosu na papilarni i folikularni karcinom.¹⁷⁴

Smatra se da CD26 ima važnu ulogu i u hematološkim malignitetima, osobito u agresivnim podtipovima T-ćelijskog non-Hodgkin limfoma (NHL), gde postoji njegova visoka ekspresija na malignim ćelijama, dok je u kutanim T-ćelijskim limfomima odsutan ili slabo eksprimiran.^{81, 175} U B-ćelijskim neoplazijama ekspresija CD26 antigena je nešto manje istražena, ali je potvrđena njegova konstitutivna ekspresija na B-ćelijama periferne krvi kod pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom (B-CLL), gde interferoni i retinoična kiselina mogu uticati na ushodnu regulaciju njegove *in vitro* ekspresije.^{176, 177} U T-ćelijama DPPIV/CD26 je uključen u transdukciju signala posredovanih CD3/T-ćelijskim receptorom (TcR), što rezultuje ćelijskom aktivacijom i sekrecijom IL-2.¹⁷⁸

Opisana je ekspresija DPPIV tokom maligne transformacije i u melanocitima. DPPIV je eksprimiran *in vitro* i *in vivo* u normalnim melanocitima, ali ne i u melanomu.^{76, 179} Ipak, ustanovljeno je da u ćelijama melanoma DPPIV ima antiinvazivni efekat, što nije utvrđeno kod mutiranih ćelija sa delecijom enzimskog aktivnog mesta DPPIV, što implicira da upravo enzimska aktivnost utiče na progresiju i invaziju karcinomskih ćelija. Naime, gubitak ekspresije DPPIV u pozitivnoj je korelaciji sa progresijom melanoma, a na modelu miševa je pokazano da transfekcija DPPIV u ćelije melanoma dovodi do smanjenja malignog potencijala, što rezultira redukcijom tumorskog rasta i smanjenjem veličine tumora.^{180, 181}

Analiza kliničkog odgovora ispitivanih bolesnika nakon jedne ili dve godine posle hirurške intervencije, mogla bi rasvetliti potencijalni klinički značaj ispitivanih parametara.

5.3 Perspektiva CD26/DPPIV kao prognostičkog markera

Uzimajući u obzir čitav vek poznatu činjenicu o interakcijama imunskog sistema i tumora, kao i novije podatke o sniženim nivoima CD26 u serumu pacijenata sa nekim malignitetima, pojedini autori sugerišu detaljnije ispitivanje uloge CD26 u sprezi imunskog sistema i karcinogeneze.⁶³ Nadalje, brojni podaci impliciraju ulogu T-ćelija kao jednog od glavnih izvora cirkulišućeg CD26 i ukazuju na značaj CD26 kao pomoćnog molekula u procesu aktivacije i proliferacije humanih limfocita.¹⁸²⁻¹⁸⁴ Ako bi

se potvrdio mogući immunosupresivni mehanizam (razvoj imunološke tolerancije T-ćelija, kao izvora CD26 i sniženje nivoa CD26) posredovan tumorskim ćelijama, onda bi mogle biti identifikovane nove mete koje bi se koristile za prevazilaženje imunološke tolerancije i podsticanje regresije tumora (u kombinaciji sa konvencionalnim metodama).⁶³ Neki klinički trajali usmereni na podsticanje imunskog sistema na eliminaciju tumora, uključuju imunomodulatorne agense koji podržavaju T_H1 odgovor, kao što je sekrecija IL-2, -12, -18, -21 i IFN- γ , koji mogu povećati nivoe sCD26.^{185, 186} Sa druge strane, pokazano je da neki lekovi koji inhibišu DPPIV aktivnost mogu ubrzati razvoj tumora i/ili oboljenje imunskog sistema.⁶³ Iako fiziološka uloga solubilne forme, sCD26, ostaje nedovoljno razjašnjena,⁶³ pretpostavljena je uloga sCD26 i izmena normalnog peptidaznog kapaciteta u kompleksnoj sprezi između limfoidne loze i nekih malignih tumora. S obzirom da je u našem istraživanju većina bolesnica sa malignim promenama dojke bila bez metastaza u regionalnim limfaticima, izgleda da prisustvo solubilne ili transmembranske forme CD26/DPPIV ne korelira nužno sa stadijumom bolesti.

U kontekstu enzimske funkcije DPPIV, obrada peptida od strane DPPIV podrazumeva da administracija njegovih inhibitora može uticati na pojedine "targete". Poznato je da proteini i peptidi ne funkcionišu samostalno, već unutar kompleksne mreže interakcija. Imajući u vidu ubikvitarno prisustvo ovog enzima (ćelije brojnih organa, krvni sudovi, telesne tečnosti), kao i brojna protein-vezujuća mesta na DPPIV i njegovo učešće u brojnim fiziološkim i patološkim procesima, kao što su T-ćelijska aktivacija, ćelijska migracija i invazivnost, razumljivo je da je i DPPIV uključen u tu kompleksnu mrežu bioaktivnih peptida. Imajući ovo u vidu, osnovni izazov u daljim istraživanjima vezanim za DPPIV jeste dalje rasvetljavanje i što preciznije određivanje njegovih svojstava uključenih u prepoznavanje supstrata, kao i brojnih funkcija u fiziološkim i patološkim procesima, u kompleksnoj mreži proteinskih i peptidnih interakcija.⁶¹

Premda je u prethodnim studijama ukazano na potencijalni značaj DPPIV kao dijagnostičkog i prognostičkog markera maligne bolesti, nije decidno utvrđeno da li indukcija ili supresija DPPIV ekspresije može imati značaja u terapijskom pristupu bolesti.⁶¹ Istraživanja mnogih inhibitora DPPIV su u toku, mada su mnogi od njih neselektivni dipeptidil-peptidazni inhibitori, testirani kod pacijenata sa karcinomom pluća, pankreasa, kolona, hroničnom limfocitnom leukemijom, melanomom.^{63, 187}

Ekspresija DPPIV može se sagledavati i u relaciji sa stepenom diferentvanosti karcinoma. Iako izgleda da ekspresija DPPIV varira zavisno od tipa karcinoma, neka dosadašnja istraživanja ukazuju da je najverovatnije u negativnoj korelaciji sa diferentovanošću ćelija karcinoma.¹⁶³ Ukazano je da reekspresija DPPIV može olakšati kontrolu invazije, metastaze i rasta ćelija karcinoma. U skladu sa tim, DPPIV poseduje potencijal da postane značajan prognostički marker i važan faktor u tretmanu karcinoma putem genske terapije. Ipak, neophodna su dalje studije koje bi rasvetlile molekularne mehanizme dejstva ovog molekula.¹⁶³

5.4 Ekspresija kalretikulina u benignim i malignim promenama dojke

Analiza lokalizacije overekspresije kalretikulina u isečcima tumorskog tkiva ukazuje da, u nekim analiziranim uzorcima, overekspresija kalretikulina može imati, nezavisno od svoje citoplazmatske, i membransku lokalizaciju. Povišena ekspresija kalretikulina u većini tkivnih isečaka dojke (intenzitet bojenja 2+ i 3+) ustanovljena u ovom radu u saglasnosti je sa podacima prikazanim u prethodnim publikacijama. Takođe, ovo istraživanje potvrđuje i ranije ustanovljenu overekspresiju kalretikulina u duktalnim karcinomima dojke.¹⁸⁸⁻¹⁹¹ Rezultati u ovom radu pokazuju da je overekspresija kalretikulina prisutna i u lobularnom karcinomu, mada u manjoj meri. Takođe, pokazano je da postoji citoplazmatska overekspresija kalretikulina u tkivu benignih promena dojke.

U nekim tumorima kalretikulin je prisutan i kao deo plazma-membrane. Membranska lokalizacija kalretikulina je učestalija u grupi bolesnica sa benignim nego sa malignim promenama dojke. Podaci proistekli iz ovih eksperimenata pokazuju da se intenzitet i lokalizacija ćelijske overekspresije kalretikulina ne mogu koristiti za razlikovanje benignih od malignih tkiva. Shodno našem prethodnom istraživanju¹³², kao i novijim publikacijama¹⁸⁹, ćelijska overekspresija kalretikulina nekad može ukazati na mogućnost loše prognoze neležene bolesti.

Prisustvo statistički značajnog porasta nivoa serumskog IgA i IgG na kalretikulin u bolesnica sa malignim i benignim promenama dojke nije potvrđeno u novijim istraživanjima. Ovi podaci proistekli iz naših istraživanja su u saglasnosti sa nekim

ranijim podacima koji ukazuju da je humoralna imunost na kalretikulin izraženija u nekim malignitetima, kao i nemaliglnim bolestima.¹⁹²⁻¹⁹⁵ U ovom istraživanju je po prvi put pokazano i da je humoralna imunost, pretežno IgA i/ili IgG antitela, razvijena na citoplazmatski kalretikulin često u odsustvu njegove membranske overekspresije. Rezultati ovog istraživanja podržavaju ranije publikovane podatke da humoralna imunost na kalretikulin nije specifična za primarnu lokalizaciju tumora, kao i da se ne može koristiti za razlikovanje malignih od benignih tkiva. Humoralna imunost na citoplazmatski kalretikulin nije rezultat intenziteta njegove overekspresije i postojala je čak i u odsustvu membranske lokalizacije.

Bitno je napomenuti da pravo značenje povišenog nivoa serumskih IgA ili IgG anti-kalretikulinskih autoantitela za prognozu maligne bolesti još nije sasvim razjašnjeno. Ipak, treba naglasiti da su povišeni nivoi anti-kalretikulinskih IgA antitela prisutni češće u bolesnicima sa pozitivnim lokoregionalnim limfnim nodusima (9/17), u odnosu na samo jednu od 6 bolesnica sa povišenim nivoom anti-kalretikulinskim IgG antitelima koja je imala pozitivne lokoregionalne limfne noduse. U pogledu citoplazmatske overekspresije kalretikulina i sposobnosti indukcije humoralne imunosti nezavisno od njegove membranske lokalizacije, treba naglasiti da mnogi autoantigeni koji indukuju humoralni odgovor u autoimunskim bolestima imaju citoplazmatsku lokalizaciju.^{196, 197} Treba naglasiti da dve bolesnice nisu ispoljile ni citoplazmatsko ni membransko prebojavanje kalretikulina, ali su imale povišene nivoe antikalretikulinskih antitela; jedna bolesnica sa malignom promenom je imala IgG, a druga sa benignom promenom dojke je imala IgA antikalretikulinska antitela. Uvidom u istorije bolesti, utvrđeno je da bolesnica sa karcinomom nije imala progresiju bolesti na prvoj kontroli, ali ima hroničnu reumatsku bolest, čime se delimično može objasniti prisustvo IgG antitela. Moguće objašnjenje za odsustvo kalretikulin- pozitivnih tumorskih ćelija kod ove bolesnice bilo bi to da su ove ćelije uništene antitumorskim dejstvom anti-kalretikulinske IgG-zavisne ćelijske citotoksičnosti, koja je bila ispoljena specifično na kalretikulin-pozitivne tumorske ćelije.

Prisustvo IgA anti-kalretikulinskih autoantitela u bolesnicima sa malignim promenama može uticati na lošiju prognozu ovih bolesnica i u saglasnosti je sa već ranije iznetom hipotezom da ova autoantitela mogu imati blokirajući efekat u nekim tumorima. Prisustvo serumskih IgG antitela koja se vezuju za tumorske antigene moglo bi biti

veoma značajno za antitumorski imunski odgovor, putem aktivacije od antitela zavisne ćelijske citotoksičnosti (ADCC), uključujući subpopulaciju mononuklearnih ćelija periferne krvi sa RIII gama receptorima za Fc-gama lanac.¹⁹⁸

Ipak, značaj fenomena “imunogene ćelijske smrti” otvara nove mogućnosti za razmatranje tretmana malignih bolesti. Nadalje, konstatovan je bolji klinički ishod kod pacijenata sa indolentnim B-ćelijskim limfomom koji su vakcinisani autologim tumorskim ćelijama (mehanizam imunogene smrti).¹⁹⁹ U skladu sa ovim podacima, rezultati našeg istraživanja ukazuju na potrebu za novim studijama koje bi utvrdile da li je nastanak pojačanog ćelijskog, pre nego humoralnog anti-kalretikulinskog imunskog odgovora značajan za poboljšanje kliničkog odgovora bolesnica sa malignom bolešću.

Podaci dobijeni u ovom istraživanju pokazuju da intenzitet, kao ni lokalizacija ćelijske overekspresije kalretikulina ne mogu poslužiti za razlikovanje malignih od benignih tkiva. Takođe, pokazano je da humoralna imunost koja se razvila na citoplazmatski kalretikulin ne korelira sa intenzitetom njegove ekspresije i postoji čak i u odsustvu njegove membranske lokalizacije. Ipak, potvrđeno je da je stepen overekspresije kalretikulina u lobularnom niži nego u duktalnom karcinomu dojke. Membranska lokalizacija kalretikulina je češća u bolesnica sa benignim nego sa malignim promenama. Povišene koncentracije anti-kalretikulinskih IgA antitela prisutne su češće u bolesnica sa pozitivnim lokoregionalnim limfnim nodusima (9/17), u odnosu na samo jednu od 6 bolesnica sa povišenim nivoom anti-kalretikulinskim IgG antitelima koja je imala pozitivne lokoregionalne limfne noduse.

5.5 Relativna učestalost određenih subpopulacija mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnica i zdravih osoba

Široko prihvaćena, tzv. CD (“cluster of differentiation”) klasifikacija NK ćelija, uključuje koekspresiju Fc γ receptora III (CD16) i izoformu molekula humane neuralne ćelijske adhezije (CD56).²⁰⁰ Većinu NK ćelija periferne krvi ($\geq 95\%$) čini subpopulacija CD56^{dim}CD16⁺ NK ćelija sa obiljem citolitičkih granula.^{201, 202} Preostale NK ćelije periferne krvi ($\leq 5\%$) čine CD56^{bright}CD16⁻ ćelije koje ispoljavaju nizak nivo citolitičkih

granula, ali sekretuju veću količinu IFN- γ i TNF.^{200, 202} Zapravo, na osnovu relativne ekspresije markera CD16 i CD56, može se definisati pet NK ćelijskih subpopulacija: 1. CD56^{bright}CD16⁻ (50–70% CD56^{bright}), 2. CD56^{bright}CD16^{dim} (30–50% CD56^{bright}), 3. CD56^{dim}CD16⁻, 4. CD56^{dim}CD16^{bright} i 5. CD56⁻CD16^{bright}.^{200, 203, 204} U zdravoj populaciji najmanje su zastupljene CD56^{dim}CD16⁻ i CD56⁻CD16^{bright}, dok je subpopulacija CD56^{dim}CD16^{bright} predstavlja najbrojniju subpopulaciju cirkulišućih NK ćelija, budući da je prisutna na preko 90% NK ćelija periferne krvi.^{200, 204}

Fc γ RIII receptor (CD16) prisutan je na NK ćelijama i na maloj subpopulaciji T-limfocita. CD16^{bright+} limfociti predstavljaju tipičnu populaciju CD3⁻ NK ćelija periferne krvi, a CD16^{dim+} je prisutan na citotoksičnim T-limfocitima. Dok CD16^{dim+} T ćelije ispoljavaju višu ADCC (od antitela zavisna ćelijska citotoksičnost) aktivnost, CD16^{bright+} NK ćelije ispoljavaju višu NK aktivnost.²⁰⁵

U ovom istraživanju ispitivana je relativna učestalost (procentualna zastupljenost) CD16⁺/CD56⁺ subpopulacija ("gejtovanih"-g i totalnih-t) subpopulacija mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC), izražena kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom, ispitivana je kod 65 bolesnica sa malignim promenama dojke, kod 32 bolesnice sa benignim promenama dojke i kod 33 zdrave kontrole. Evidentirana je statistički značajna razlika u relativnoj učestalosti gCD16^{dim+}/56^{bright+} subpopulacija, kako između bolesnica sa malignim promenama i zdravih kontrola, tako i između bolesnica sa benignim promenama dojke i zdravih kontrola, a u slučaju tCD16^{dim+}/56^{bright+} potvrđena je statistički značajna razlika između bolesnica sa malignim promenama dojke i zdravih kontrola. Takođe, statistički značajna razlika ustanovljena je i u relativnoj učestalosti gCD16^{bright+}/56^{dim+}, kako između bolesnica sa malignim promenama i zdravih kontrola, tako i između bolesnica sa benignim promenama dojke i zdravih kontrola., što se uslovno može dovesti u vezu sa mogućom izraženijom NK citotoksičnom aktivnošću kod bolesnica sa promenama dojke u odnosu na zdrave kontrole.^{200, 201} U slučaju karcinoma dojke, potvrđena je statistički značajna korelacija između nivoa CD16 sa jedne strane i veličine tumora dojke i metastaza u limfnim nodusima sa druge strane, dok za nivo CD56 nije ustanovljena takva korelacija.²⁰⁶

Potvrđeno je da CD56⁺ limfociti imaju glavnu ulogu u imunskom nadzoru i antitumorskom odgovoru.^{53, 207, 208} Prekursori NK ćelija napuštaju kostnu srž, prolaze

perifernom krvlju i dolaze do limfnih nodusa, gde se diferencijuju u CD56^{bright} NK ćelije, pod uticajem citokina, koje produkuju stromalne i dendritične ćelije.²⁰⁴ Osim genotipskih, fenotipskih i funkcionalnih razlika CD56^{bright} i CD56^{dim} NK ćelija, koje ukazuju na nezavisno dejstvo ove dve NK ćelijske subpopulacije²⁰⁹, potencijalno važna razlika među njima je i nivo ekspresije adhezionih molekula.²¹⁰ CD56^{dim} NK ćelije, sa niskom ekspresijom CD56, predstavljaju klasičnu citotoksičnu NK ćelijsku subpopulaciju. NK ćelije sa 5-10 puta većom ekspresijom CD56 su označene kao CD56^{bright}, sa neznatnim citotoksičnim kapacitetom, ali većom produkcijom citokina, kao što su: INF γ i TNF α , u komparaciji sa CD56^{dim} NK ćelijama.²⁰⁹ U prethodnim istraživanjima je ukazano da se citokinima može stimulisati diferencijacija CD56^{dim} NK ćelija u CD56^{bright} ćelije^{210, 211}, što može implicirati mogućnost da i na mestu inflamacije (ili tumora) može doći do lokalne diferencijacije CD56^{dim} u CD56^{bright} NK ćelije²¹², što je delom u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja, gde je ustanovljeno da su i CD56^{dim} i CD56^{bright} ćelije značajno učestalije u bolesnicima sa promenama dojke (kako malignim, tako i benignim) u odnosu na zdrave kontrole. U zdravoj populaciji, oko 10% NK ćelija pripada CD56^{bright} subpopulaciji. Ekspanzija u procentu ovih ćelija registruje se nakon transplantacije kostne srži, kao i nakon administracije IL-2.²¹³ Citotoksična aktivnost CD56^{dim} NK ćelija je značajno viša nego CD56^{bright} i sadrže mnogo više perforina, granzima i citolitičkih granula.^{200, 201} U našem istraživanju je evidentirano da postoji značajno veća relativna učestalost CD56^{dim} ćelija u bolesnicima sa malignim i benignim promenama dojke u odnosu na zdrave kontrole, implicirajući potencijalni uticaj ovih citotoksičnih mehanizama svojstvenih NK ćelijama. Visok nivo ekspresije CD16 čini ih veoma efikasnim medijatorima ADCC reakcije, dok CD56^{bright}/CD16^{dim} ispoljavaju veoma slabu ADCC reakciju.²⁰⁰ U našem istraživanju statistički značajna razlika ustanovljena je u relativnoj učestalosti gCD16^{dim+}/56^{bright+}, kako između bolesnicima sa malignim promenama i zdravih kontrola, tako i između bolesnicima sa benignim promenama dojke i zdravih kontrola, čime se implicira pitanje eventualnog slabijeg uticaja ADCC reakcije. Većina NK ćelija u perifernoj krvi pripada CD56^{dim} populaciji, dok u zapaljenskom infiltratu dominiraju CD56^{bright} ćelije. Značajno je da je povećana učestalost CD56^{bright} ćelija registrovana kako u nemalignim, tako i u malignim i zapaljenskim procesima.²¹²

Citotoksična aktivnost NK ćelija ispitivana je u različitim malignitetima. Kod karcinoma grlića materice je potvrđeno da kod bolesnica sa udaljenim metastazama bolesti NK aktivnost značajno opada u poređenju sa zdravim kontrolama, kao i kod bolesnica sa nižim stadijumima bolesti.²¹⁴ Kod pacijenata sa skvamoznim karcinomom larinksa i farinka, pokazano je da ne postoji korelacija između litičke aktivnosti NK ćelija i stadijuma bolesti, kao i da je NK citotoksičnost značajno niža u limfnim nodusima, nego u perifernoj krvi.²¹⁵ U prethodnim istraživanjima evidentiran je porast u procentu CD56⁺ ćelija u bolesnica sa cervikalnim karcinomom, ali ovaj porast nije bio značajan.^{216, 217}

Prethodne analize učestalosti NK ćelija u limfocitima periferne krvi bolesnica sa karcinomom dojke, potvrđuju značajan porast u procentu ukupnih NK ćelija u invazivnom duktalnom karcinomu u odnosu na grupu zdravih,⁵⁵ dok je kod ostalih tipova karcinoma dojke uočen pad u procentu ukupnih NK ćelija, u poređenju sa zdravom grupom. Naime, u karcinomu dojke ustanovljen je porast u procentu CD56⁺ NK ćelija u poređenju sa zdravom grupom⁵⁵, dok je ispitivanjem relativne učestalosti CD56⁺ subpopulacija u našem istraživanju, kako CD56^{dim}, tako i CD56^{bright}, evidentirana statistički značajna razlika u relativnoj učestalosti ovog parametra između bolesnica sa malignim promenama i zdravih kontrola, kao i između bolesnica sa benignim promenama dojke i zdravih kontrola.

Mamessier i sar. su potvrdili da se fenotip NK ćelija razlikuje u tkivu tumora dojke u odnosu na zdravo tkivo, što se posebno odnosi na CD56^{bright} subpopulaciju ćelija, koje imaju slabiji citotoksični potencijal i povezane su sa lošijom prognozom za karcinom dojke.²⁰⁷ Analizom relativne učestalosti CD56^{bright+} subpopulacija PBMC u našem ispitivanju, ustanovljena je značajna korelacija između bolesnica sa karcinomom i zdravih kontrola, kao i između bolesnica sa benignim promenama i zdravih kontrola, što je delom u korelaciji sa prethodnim istraživanjima, a delom u korelaciji sa podacima iz brojnih istraživanja gde je evidentiran porast u procentu CD56^{bright} NK ćelija i u sklopu različitih nemalignih oboljenja: multipla skleroza,²¹⁸ bradavice izazvane humanim papiloma virusom,²¹⁹ infekcije herpes virusom 6,²²⁰ hepatitis C virus,²²¹ u sklopu teške kombinovane imunodeficijencije,²²² sistemski lupus eritematodes,²²³ kao i u sklopu HIV i citomagalovirusnih infekcija.^{224, 225} Sa druge strane, brojne studije ukazuju na

smanjenje procenta CD56^{bright} NK ćelija u sklopu nekih nemalignih oboljenja, kao što su: koronarna bolest,²²⁶ astma,²²⁷ juvenilni reumatoidni artritis.²²⁸

U prethodnim istraživanjima CD16 i CD56 su korišćeni kao fenotipski markeri u nekim hematološkim malignitetima, posebno u limfoproliferativnim bolestima. CD56 je eksprimiran i u retkim slučajevima akutne mijeloidne leukemije, nazalnim limfomima (povezanim sa Epstein-Barr virusnom infekcijom), u multiplom mijelomu, itd.^{229, 230} Naime, pokazano je da CD56 može biti nezavistan prognostički faktor za kompletan odgovor na tretman T-ALL (T-ćelijske akutne limfoblastne leukemije); takođe, ukazano je i na mogućnost da se pomoću CD16/CD56 mogu izdvojiti specifični subtipovi T-ALL. Potvrđeno je da pacijenti sa T-ALL koji eksprimiraju CD56 i/ili CD16 imaju lošiju prognozu²³⁰, dok je u našem istraživanju, analizom relativne učestalosti gCD16⁺/56⁺ i tCD16⁺/56⁺ limfocitnih subpopulacija ("gejtovanih"-g i totalnih-t) PBMC, nije potvrđena statistički značajna razlika u procentu ovih parametara u bolesnicima sa karcinomom u odnosu na kontrole, kao ni u bolesnicima sa benignim promenama i zdravih kontrola.

FcαRI ili CD89 je transmembranski glikoprotein, konstitutivno eksprimiran primarno na citotoksičnim imunskim efektorskim ćelijama, uključujući polimorfonuklearne leukocite, monocite, makrofage, neutrofile i eozinofile.^{231, 232} Predstavlja imunoreceptor koji se vezuje za Fc fragment IgA antitela.⁵⁷ Veza FcαRI sa IgA imunskim kompleksima, stimuliše degranulaciju, sekreciju inflamatornih citokina, endocitozu i fagocitozu, zbog čega bi FcαRI mogao biti klinički relevantan triger-receptor na citotoksičnim imunskim efektorskim ćelijama, usled čega bi ove citotoksične funkcije posredovane putem CD89 mogle biti od posebnog značaja i u razvoju imunoterapije.²³² Fagocitoza tumorskih ćelija putem FcαRI može, dakle, dovesti do aktivacije i humoralnog i celularnog imenskog odgovora.²³² Naime, subpopulacija imunskih ćelija sa CD89 receptorom za Fc fragment IgA imunoglobulina, može omogućiti uništavanje ćelija ADCC mehanizmom, gde bi IgA mogao biti aktivno antitelo, čime se omogućava veza između ćelijskog i humoralnog imenskog sistema, koja dovodi do brojnih imunoloških efektorskih funkcija, uključujući, osim ADCC reakcije, fagocitozu, kao i otpuštanje inflamatornih medijatora i citokina.⁵⁸ Posebno je ukazano na značaj humanih IgA antitela u pokretanju neutrofila za ADCC. Eksperimentalno je potvrđeno da je FcαRI receptor efikasan triger-molekul u citolizi posredovanoj neutrofilima, kao i

da neutrofilima imaju citolitičko dejstvo na širok spektar tumorskih ćelija, kao i da Fc α RI antitela (IgA) indukuju pojačano uništavanje Her2/neu+ ćelije karcinoma dojke⁵⁹, u čemu značajnu ulogu ima CD89. U našem istraživanju relativne učestalosti CD89⁺ subpopulacija PBMC kod 64 bolesnice sa malignim promenama dojke, 34 bolesnice sa benignim promenama dojke i kod 37 zdravih kontrola, evidentirana je statistički značajna razlika u relativnoj učestalosti tCD89⁺ subpopulacija između bolesnica sa malignim promenama i zdravih kontrola, kao i između bolesnica sa benignim promenama i zdravih kontrola. U relativnoj učestalosti gCD16/89⁺ i tCD16/89⁺ subpopulacija PBMC, nije ustanovljena statistički značajna razlika unutar ispitivanih grupa. Podaci na našem uzorku ispitanica pokazuju da kod bolesnica sa promenama dojke postoji veća učestalost imunokompetentnih ćelija sa CD89 receptorom u odnosu na zdrave kontrole. Ovi rezultati bi se mogli uzeti u obzir u ispitivanjima Fc α RI, kao klinički relevantnog trigger-receptora na citotoksičnim imunskim efektorima ćelijama kod karcinoma dojke, što bi potom moglo imati eventualne implikacije i u domenu imunoterapije.

6. ZAKLJUČCI

1. Aktivnost serumske DPPIV nije pokazala statistički značajnu razliku između bolesnica sa benignim ili malignim promenama dojke u poređenju sa kontrolama.
2. Postoji statistički značajan pad u procentu ukupnih CD26⁺ ćelija u bolesnica sa benignim i malignim promenama dojke u komparaciji sa zdravim kontrolama.
3. Postoji statistički značajan pad intenziteta fluorescencije (MFI) u ekspresiji CD26 molekula na limfocitima u grupi bolesnica sa malignim promenama dojke u komparaciji sa zdravim kontrolama.
4. Nije potvrđena statistički značajna razlika između nivoa serumske aktivnosti DPPIV, CD26 ćelijskog bojenja i kliničko-patoloških karakteristika bolesnica sa promenama dojke.
5. Intenzivna citoplazmatska overekspresija kalretikulina (2+ i 3+) češće je prisutna u tkivu dukalnog, nego lobularnog karcinoma dojke.
6. Nivoi IgA anti-kalretikulinskih antitela bili su značajno viši kod bolesnica sa malignim promenama, kao i kod bolesnica sa benignim promenama, u komparaciji sa zdravim kontrolama, dok za serumske nivoe IgG anti-kalretikulinskih antitela kod ovih bolesnica nisu ustanovljene značajano više vrednosti.
7. Relativna učestalost gCD16^{dim+}/56^{bright+} subpopulacije imunokompetentnih ćelija je statistički značajno niža u bolesnica sa malignim, ali i benignim promenama dojke u odnosu na zdrave kontrole; statistički značajno niže vrednosti su utvrđene i u relativnoj učestalosti tCD16^{dim+}/56^{bright+} ćelija u bolesnica sa malignim promenama dojke u odnosu na one u zdravim kontrolama; niže vrednosti procenta gCD16^{bright+}/56^{dim+} imunskih ćelija su takodje karakteristika bolesnica sa malignim ili benignim promenama u odnosu na zdrave kontrole.
8. Procenat CD89⁺ imunskih ćelija (uglavnom granulocita) značajno je povišen kako u bolesnica sa malignim promenama tako i u bolesnica sa benignim promenama u odnosu na zdrave kontrole.

7. LITERATURA

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase N°5, version 2.0 Lyon: IARC Press 2004.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(2):74-108.
3. Boyle P. and Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of Oncology* 2005; 16:481–488.
4. Kwan ML, Kushi LH, Weltzien E, Maring B, Kutner SE, Fulton RS, Lee MM, Ambrosone CB, Caan BJ. Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Res.* 2009; 11(3):R31.
5. Breast cancer epidemiology. Christopher I. Li, Editor, ISBN 978-1-4419-0684-7, e-ISBN 978-1-4419-0685-4. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. Library of Congress Control Number: 2009930938. Chapter 1: Global burden of breast cancer, Ferlay J, Hery C, Autier P. and Sankaranarayanan R. http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=fYrNhRpdmasC&oi=fnd&pg=PA1&dq=breast+cancer+epidemiology&ots=NLI8qvBh1v&sig=xwhu1N_ILtwilkARyGhff4bj_-Q#v=onepage&q&f=false
6. Henderson B.E., Ross R.K. and Bernstein L. 1988 Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res.* 1988; 48:246-253.
7. Registar za rak centralne Srbije. Incidenca i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2007. Institut za zaštitu zdravlja Srbije, Beograd, 2010. ISBN 86-7358-030-7, izveštaj br.9
8. Jatoi I, Kaufmann M, Petit J.Y. Atlas of Breast Surgery, Library of Congress Control Number: 2005924216, ISBN-10 3-540-24351-8 Springer Berlin Heidelberg New York, ISBN-13 978-3-540-24351-9 Springer Berlin Heidelberg New York

9. Bogdanović D. Anatomija grudnog koša. Savremena administracija, Beograd, 1992.
10. Holl J.A, Knaus J.V. The encyclopedia of visual medicine series, An atlas of breast disease. The parthenon publishing group, International publishers in medicine, science and technology, Taylor and Francis e-library, 2005.
11. www.en.wikipedia.org/wiki/File:Breast_anatomy_normal_scheme.png (pristupljeno 21.8.2011.)
12. www.aidforwomen.com/disorder.html (pristupljeno 21.8.2011.)
13. Blumgart E.I., Uren R.F., Nielsen P.M.F., Nash M.P., Reynolds H.M. Predicting lymphatic drainage patterns and primary tumour location in patients with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2011; 130(2):699-705.
14. Van der Sangen M.J.C., Coebergh J-W.W., Roumen R.M.H., Rutten H.J.T., Vreugdenhil G., Voogd A.C. Detection, treatment, and outcome of isolated supraclavicular recurrence in 42 patients with invasive breast carcinoma. *Cancer* 2003; 98(1):11-17.
15. Džodić R. Hirurgija raka dojke. Dosije, Beograd, 2005.
16. Morrow M. Is axillary dissection necessary after positive sentinel node biopsy? Yes!. *Ann Surg Oncol.* 2001; 8(9 Suppl):74S–6S.
17. http://www.ufrgs.br/favet/imunovet/molecular_immunology/organsimmune.html (pristupljeno 21.8.2011.)
18. Jančić-Zguricas M. Patologija endokrinog sistema i dojke. Medicinski fakultet, Beograd, 1994.
19. Renshaw AA, Cartagena N, Schenkman RH, Derhagopian RP, Gould EW. Atypical ductal hyperplasia in breast core needle biopsies. Correlation of size of the lesion, complete removal of the lesion, and the incidence of carcinoma in follow-up biopsies. *Am J Clin Pathol.* 2001; 116(1):92–6.
20. www.medi-info.com/fibrocystic-breast/ (pristupljeno 21.8.2011.)
21. Dupont W.D, Page D.L, Parl F.F, Vnencak-Jones C.L, Plummer W.D, Rados M.S and Schuyler P.A. Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. *N Engl J Med* 1994; 331:10-15.

22. Cole-Beuglet C, Soriano RZ, Kurtz AB and Goldberg BB. Fibroadenoma of the breast: sonomammography correlated with pathology in 122 patients. *Am J Roentgenol* 1983; 140(2):369-375.
23. www.tgmouse.compmed.ucdavis.edu/preprint/hubrca/Fibroadenoma.html (pristupljeno 21.8.2011.)
24. Yoh Zen Y., Kasahara Y., Horita K., Miyayama S., Miura S., Kitagawa S., Nakanuma Y. Inflammatory pseudotumor of the breast in a patient with a high serum IgG4 level histologic similarity to sclerosing pancreatitis. *Am J Surg Pathol* 2005;29:275–278.
25. Jatoi I, Kaufmann M. Management of Breast Diseases, ISBN: 978-3-540-69742-8, Springer Heidelberg Dordrecht London New York, Library of Congress Control Number: 2009934509, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.
26. Schnitt SJ, Morrow M. Lobular carcinoma in situ: current concepts and controversies. *Semin Diagn Pathol.* 1999; 16(3):209–23.
27. Eichhorn JH. Medullary carcinoma, provocative now as then. *Semin Diagn Pathol.* 2004; 21(1):65–73.
28. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* 2004; 6(3):49–56.
29. Browder W, McQuitty JT, McDonald JC. Malignant cystosarcoma phylloides. Treatment and prognosis. *Am J Surg.* 1978; 136(2):239–41.
30. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phyllodes_tumour.jpg, (pristupljeno 15.8.2011.)
31. Monroe AT, Feigenberg SJ, Mendenhall NP. Angiosarcoma after breast-conserving therapy. *Cancer* 2003; 97(8):1832–40.
32. Gruber G, Ciriolo M, Altermatt HJ, Aebi S, Berclaz G, Greiner RH. Prognosis of dermal lymphatic invasion with or without clinical signs of inflammatory breast cancer. *Int J Cancer* 2004; 109(1):144–8.
33. Amparo RS, Angel CD, Ana LH, Antonio LC, Vicente MS, Carlos FM, Vicente GP. Inflammatory breast carcinoma: pathological or clinical entity? *Breast Cancer Res Treat.* 2000; 64(3):269–73.
34. Singletary S.E, Allred C, Ashley P, Bassett L.W, Berry D, Bland K.I, Borgen P.I, Clark G, Edge S.B, Hayes D.F, Hughes L.L, Hutter R.V.P, Morrow M, Page D.L,

- Recht A, Theriault R.L, Thor A, Weaver D.L, Wieand H.S, Greene F.L. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20(17):3628-3636.
35. AJCC American Joint Committee on Cancer 7th Edition. Edge S, Byrd D, Compton C, et al. Springer-Verlag, New York, NY. January 2010.
 36. <http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/DetailedGuide/breast-cancer-treating-by-stage>
 37. Malmberg KJ, Hans-Gustaf Ljunggren. Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance. *Sem Cancer Biol* 2006; 16(1):16-31.
 38. Disis ML, Lysterly HK. Global role of the immune system in identifying cancer initiation and limiting disease progression. *J Clin Oncol* 2005; 23(35):8923-5.
 39. Hrubisko M, Sanislo L, Zuzulova M, Michalickova J, Zeleznikova T, Sedlak J, Bella V. Immunity profile in breast cancer patients. *Bratisl Lek Listy*. 2010; 111(1):20-6.
 40. DeNardo D.G and Coussens L.M. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research* 2007, 9(4):212-22.
 41. Macchetti A.H, Cosiski Marana H.R, Silva J.S, Moreira de Andrade J, Ribeiro-Silva A, Bighetti S. Tumor-infiltrating CD4⁺ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. *Clinics* 2006; 61(3):203-8.
 42. Murray KP, Mathure S, Kaul R, Khan S, Carson LF, Twiggs LB, Martens MG. and Kaul A. Expression of complement regulatory proteins - CD 35, CD 46, CD 55, and CD 59 in benign and malignant endometrial tissue. *Gynecol Oncol* 2000; 76(2):176-82.
 43. Jančić-Zguricas M, Spužić I. Osnovi onkologije. Elit Medica, Beograd, 1995.
 44. Adam JK, Odhav B, Bhoola KD. Immune responses in cancer. *Pharmacol Ther* 2003; 99(1):113-32.
 45. De Visser K.E, Eichten A. and Coussens L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development *Nature Reviews Cancer* 2006; (6):24-37.
 46. Pitteri S.J, Kelly-Spratt K.S, Gurley K.E, Kennedy J, Busald Buson T, Chin A, Wang H, Zhang Q, Wong CH, Chodosh L.A, Nelson P.S, Hanash S.M. and Kemp C.J. Tumor microenvironment-derived proteins dominate the plasma proteome

- response during breast cancer induction and progression. *Cancer Res* 2011; 71(15):5090–100.
47. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:392–401.
 48. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes—bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:839–49.
 49. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald D.D, Jin D.K, Shido K, Kerns S.A, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port J.L, Altorki N, Port E.R, Ruggero D, Shmelkov S.V, Jensen K.K, Rafii S and Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438:820–7.
 50. Robertson M.J, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76(12):2421-38.
 51. Vaquer S, Jorda J, Lopez de la Osa E, Alvarez de los Heros J, Lopez-Garcia N, Alvarez de Mon M. Clinical implications of natural killer (NK) cytotoxicity in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1990; 36:90-2.
 52. Timmons B.W and Cieslak T. Human natural killer cell subsets and acute exercise: a brief review. *Exerc Immunol Rev.* 2008; 14:8-23.
 53. Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Martin R, Hodge MR, Wu L, Butcher EC. Unique subpopulations of CD56⁺ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* 2001; 166(11):6477–82.
 54. Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, Ratto G, Forte G, Carrega P, Lui G, Conte R, Strowig T, Moretta A, Münz C, Thiel A, Moretta L. and Ferlazzo G. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor-NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *The Journal of Immunology* 2007; 178:4947–4955.
 55. Farazmand S, Amani D, Hassan ZM. Investigation of NK cell population in peripheral blood and tumor lesions of patients with breast cancer. *Iranian journal of immunology* 2005; 2(3):152-157.
 56. Morton H.C. and Brandtzaeg P. CD89: the human myeloid IgA Fc receptor. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2001; 49:217-229.

57. Kanamaru Y, Blank U, Monteiro RC. IgA Fc receptor I is a molecular switch that determines IgA activating or inhibitory functions. *Contrib Nephrol.* 2007; 157:148-52.
58. Otten MA, Rudolph E, Dechant M, Tuk CW, Reijmers RM, Beelen RH, van de Winkel JG, van Egmond M. Immature neutrophils mediate tumor cell killing via IgA but not IgG Fc receptors. *J Immunol.* 2005; 174(9):5472-80.
59. Valerius T, Stockmeyer B, van Spruiel A.B, Graziano R.F, van den Herik-Oudijk I.E, Repp R, Deo Y.M, Lund J, Kalden J.R, Gramatzki M. and van de Winkel J.G.J. Fc α RI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood* 1997; 90(11): 4485-4492.
60. Dang N.H. and Morimoto C. CD26: An expanding role in immune regulation and cancer. *Histol Histopathol* 2002; 17:1213-1226.
61. Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Cl Lab Sci* 2003; 40:209-294.
62. Boonacker E, Van Noorden CJF. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol* 2003; 82:53-73.
63. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:1723-1747.
64. Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang N.H, Morimoto C. Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Frontiers in Bioscience* 2008; 13:2299-2310.
65. Gines S, Marinn M, Mallol J, Canela E.I, Morimoto C, Callebaut C, Hovanessian A, Casado V, Lluís C, Franco R. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase–CD26 interaction. *Biochem. J.* 2002; 361:203-209.
66. Ohnuma K., Munakata Y., Ishii T., Iwata S., Kobayashi S., Hosono O., Kawasaki H., Dang N.H. and Morimoto C. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV induces T cell proliferation through CD86 up-regulation on APCs. *J. Immunol.* 2001; 167:6745-6755.

67. Pro B. and Dang N.H. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol Histopathol* 2004; 19:1345-1351.
68. Morimoto C., Torimoto Y., Levinson G., Rudd C. E., Schrieber M., Dang N. H., Letvin N. L. and Schlossman S. F. 1F7, a novel cell surface molecule, involved in helper function of CD4 cells. *J. Immunol.* 1989; (143):3430-3439.
69. Hafler D. A., Chofflon M., Benjamin D., Dang N. H. and Breitmeyer, J. Mechanisms of immune memory-T cell activation and CD3 phosphorylation correlate with Ta1 (CDw26) expression. *J. Immunol.* 1989; (142):2590-2596.
70. Dang N.H., Torimoto Y., Shimamura K., Tanaka T., Daley J.F., Schlossman S. F. and Morimoto C. 1F7 (CD26): a marker of thymic maturation involved in the differential regulation of the CD3 and CD2 pathways of human thymocyte activation. *J. Immunol.* 1991; 147:2825-2832.
71. Tanaka T., Kameoka J., Yaron A., Schlossman S.F. and Morimoto C. The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; (90):4586-4590.
72. Tanaka T., Duke-Cohan J.S., Kameoka J., Yaron A., Lee I., Schlossman S.F. and Morimoto C. Enhancement of antigen-induced T cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; (91):3082-3086.
73. Reinhold D., Bank U., Buhling F., Lendeckel U., Faust J., Neubert K. and Ansorge S. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor- β 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology* 1997; (91): 354-360.
74. Von Bonin A., Huhn J. and Fleischer B. Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway. *Immunol. Rev.* 1998; (161):43-53.
75. Stecca B.A., Nardo B., Chieco P., Mazziotti A., Bolondi L. and Cavallari A. Aberrant dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) expression in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 1997; (27):337-345.
76. Houghton A. N., Albino A. P., Cordon-Cardo C., Davis L. J. and Eisinger M. Cell surface antigens of human melanocytes and melanoma-expression of adenosine deaminase binding protein is extinguished with melanocyte transformation. *J. Exp. Med.* 1988; (167):197-212.

77. Wesley U.V., Tiwari S. and Houghton A.N. Role of dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 2004 ; (109):855-66.
78. Kajiyama H., Kikkawa F., Suzuki T., Shibata K., Ino K. and Mizutani S. Prolonged survival and decreased invasive activity attributes to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2002; (62):2753-2757.
79. Kajiyama H., Kikkawa F., Khin E., Shibata K., Ino K. and Mizutani S. Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces upregulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 2003; (63):2278-2283.
80. Khin E.E., Kikkawa F., Ino K., Kajiyama H., Suzuki T., Shibata K., Tamakoshi K., Nagasaka T. and Mizutani S. Dipeptidyl peptidase IV expression in endometrial endometrioid adenocarcinoma and its inverse correlation with tumor grade. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; (188):670-676.
81. Carbone A., Cozzi M., Gloghini A. and Pinto A. CD26/dipeptidylpeptidase IV expression in human lymphomas is restricted to CD30-positive anaplastic large cell and a subset of Tcell non-Hodgkin's lymphomas. *Human Pathol.* 1994; (25):1360-1365.
82. Carbone A., Gloghini A., Zagonel V., Aldinucci D., Gattei V., Degan M., Improta S., Sorio R., Monfardini S. and Pinto A. The expression of CD26 and CD40 ligand is mutually exclusive in human T-cell non-Hodgkin's lymphomas/leukemias. *Blood* 1995; (86):4617-4626.
83. Dang N.H., Aytac U., Sato K., O'Brien S., Melenhorst J., Morimoto C., Barrett A.J. and Molldrem J.J. T-large granular lymphocyte lymphoproliferative disorder: expression of CD26 as a marker of clinically aggressive disease and characterization of marrow inhibition. *Br. J. Haematol.* 2003; (121):857-865.
84. Jones D., Dang N.H., Duvic M., Washington L.T. and Huh Y.O. Absence of CE26 expression is a useful marker for diagnosis of Tcell lymphoma in peripheral blood. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001; (115):885- 892.
85. Ho L., Aytac U., Stephens L.C., Ohnuma K., Mills G.B., McKee K.S., Neumann C., LaPushin R., Cabanillas F., Abbruzzese J.L., Morimoto C. and Dang N.H. In

- vitro and in vivo antitumor effect of the anti-CD26 monoclonal antibody 1F7 on human CD30+ anaplastic large cell T-cell lymphoma Karpas 299. *Clin. Cancer Res.* 2001; (7):2031-2040.
86. Sato K. and Dang N.H. CD26: a novel treatment target for T-cell lymphoid malignancies? *Int. J. Oncol.* 2003; (22): 481-497.
 87. Wilson M.J., Ruhland A.R., Quast B.J., Reddy P.K., Ewing S.L. and Sinha A.A. Dipeptidyl IV activities are elevated in prostate cancers and adjacent benign hyperplastic glands. *J. Androl.* 2000; (21):220-226.
 88. Hirai K., Kotani T., Aratake Y., Ohtaki S. and Kuma K. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) staining predicts distant metastasis of 'benign' thyroid tumor. *Pathol. Int.* 1999; (49):264-265.
 89. Cordero O.J., Ayude D., Nogueira M., Rodriguez-Berrocal F.J. and de la Cadena M.P. Preoperative serum CD26 levels: diagnostic efficiency and predictive value for colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 2000; (83):1139-1146.
 90. Dang N.H., Torimoto Y., Schlossman S.F. and Morimoto C. Human CD4 helper T cell activation: functional involvement of two distinct collagen receptors, 1F7 and VLA integrin family. *J. Exp. Med.* 1990; (172):649-652.
 91. Loster K., Zeilinger K., Schuppan D. and Reutter W. (1995). The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; (217):341-338.
 92. Masuyama J., Berman J.S., Cruikshank W.W., Morimoto C. and Center D.M. Evidence for recent as well as long term activation of T cells migrating through endothelial cell monolayers in vitro. *J. Immunol.* 1992; (148):1367-1374.
 93. Cheng H.C., Abdel-Ghany M. and Pauli B.U. A novel consensus motif in fibronectin mediates dipeptidyl peptidase IV adhesion and metastasis. *J. Biol. Chem.* 2003; (278):24600-24607.
 94. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold L.I. and Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 2009; (417):651–666.
 95. Ellgaard L. and Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003; 4(3):181–191.

96. Corbett E. F., Michalak K. M., Oikawa K., Johnson S., Campbell I. D., Eggleton P., Kay C. and Michalak M. The conformation of calreticulin is influenced by the endoplasmic reticulum luminal environment. *J. Biol. Chem.* 2000; (275):27177–27185.
97. Baksh S. and Michalak M. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *J. Biol. Chem.* 1991; (266):21458–21465.
98. Ashby M. C. and Tepikin A. V. ER calcium and the functions of intracellular organelles. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2001; (12):11–17.
99. Greber U. F. and Gerace L. Depletion of calcium from the lumen of endoplasmic reticulum reversibly inhibits passive diffusion and signal-mediated transport into the nucleus. *J. Cell Biol.* 1995; (128):5–14.
100. Stevens F. J. and Argon Y. Protein folding in the ER. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1999; (10):443–454.
101. Nakamura K., Zuppini A., Arnaudeau S., Lynch J., Ahsan I., Krause R., Papp S., De Smedt H., Parys J. B., Müller-Esterl W., Lew D.P., Krause K.H., Demaurex N., Opas M. and Michalak M. Functional specialization of calreticulin domains. *J. Cell Biol.* 2001; (154):961–972.
102. Bastianutto C., Clementi E., Codazzi F., Podini P., De Giorgi F., Rizzuto R., Meldolesi J. and Pozzan T. Overexpression of calreticulin increases the Ca²⁺ capacity of rapidly exchanging Ca²⁺ stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function. *J. Cell Biol.* 1995; (130):847–855.
103. Mery L., Mesaeli N., Michalak M., Opas M., Lew D. P. and Krause K.-H. Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca²⁺ storage and decreases store-operated Ca²⁺ influx. *J. Biol. Chem.* 1996; (271):9332–9339.
104. Shaffer K. L., Sharma A., Snapp E. L. and Hegde R. S. Regulation of protein compartmentalization expands the diversity of protein function. *Dev. Cell* 2005; (9):545-554.
105. Afshar N., Black B. E. and Paschal B. M. Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol. *Mol. Cell. Biol.* 2005; (25):8844–8853.
106. Krause K.-H. and Michalak M. Calreticulin. *Cell* 1997; (88):439–443.

107. Holaska J. M., Black B. E., Love D. C., Hanover J. A., Leszyk J. and Paschal B. M. Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J. Cell Biol.* 2001; (152):127–140.
108. Gardai S. J., McPhillips K. A., Frasca S. C., Janssen W. J., Starefeldt A., Murphy-Ullrich J. E., Bratton D. L., Oldenborg P. A., Michalak M. and Henson P. M. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 2005; (123): 321–334.
109. Gold L. I., Rahman M., Blechman K. M., Greives M. R., Churgin S., Michaels J., Callaghan M. J., Cardwell N. L., Pollins A. C., Michalak M., Siebert J.W., Levine J.P., Gurtner G.C., Nanney L.B., Galiano R.D. and Cadacio C.L. Overview of the role for calreticulin in the enhancement of wound healing through multiple biological effects. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2006; (11):57–65.
110. Nanney L. B., Woodrell C. D., Greives M. R., Cardwell N. L., Pollins A. C., Bancroft T. A., Chesser A., Michalak M., Rahman M., Siebert J. W. and Gold L. I. Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am. J. Pathol.* 2008; (173):610–630.
111. Kwon, M. S., Park, C. S., Choi, K., Ahnn, J., Kim, J. I., Eom, S. H., Kaufman, S. J. And Song, W. K. Calreticulin couples calcium release and calcium influx in integrin-mediated calcium signaling, *Mol. Biol. Cell* 2000; (11):1433–1443.
112. Yoon G. S., Lee H., Jung Y., Yu E., Moon H. B., Song K. and Lee I. Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2000; (60):1117–1120.
113. Kishore U., Sontheimer R. D., Sastry K. N., Zappi E. G., Hughes G. R., Khamashta M. A. and Eggleton P. The systemic lupus erythematosus (SLE) disease autoantigen-calreticulin can inhibit C1q association with immune complexes. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; (108):181–190.
114. Alaedini A. and Green P. H. Autoantibodies in celiac disease. *Autoimmunity* 2008; (41):19–26.
115. Jorgensen C. S., Hansen K. B., Jacobsen S., Halberg P., Ullman S., Hansen D., Mikkelsen T. L., Weile B., Madsen M. H., Wiik A. and Houen G. Absence of high affinity calreticulin autoantibodies in patients with systemic rheumatic diseases and coeliac disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2005; (65):403–412.

116. Nakhasi H. L., Pogue G. P., Duncan R. C., Joshi M., Atreya C. D., Lee N. S. and Dwyer D. M. Implications of calreticulin function in parasite biology. *Parasitol. Today* 1998; (14):157–160.
117. Sipione S., Ewen C., Shostak I., Michalak M. and Bleackley R. C. Impaired cytolytic activity in calreticulin-deficient CTLs. *J. Immunol.* 2005; (174):3212–3219.
118. Dupuis M., Schaerer E., Krause K.-H. and Tschopp J. The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1993; (177):1–7.
119. Obeid M., Tesniere A., Panaretakis T., Tufi R., Joza N., van Endert P., Ghiringhelli F., Apetoh L., Chaput N., Flament C., Ullrich E, de Botton S, Zitvogel L, Kroemer G. Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy. *Immunol. Rev.* 2007; (220):22–34.
120. Panaretakis T., Joza N., Modjtahedi N., Tesniere A., Vitale I., Durchschlag M., Fimia G. M., Kepp O., Piacentini M., Froehlich K. U. van Endert P, Zitvogel L, Madeo F, Kroemer G. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ.* 2008; (5):1499–1509.
121. Porcellini S., Traggiai E., Schenk U., Ferrera D., Matteoli M., Lanzavecchia A., Michalak M. and Grassi F. Regulation of peripheral T cell activation by calreticulin. *J. Exp. Med.* 2006; (203):461–471.
122. Tufi R., Panaretakis T., Bianchi K., Criollo A., Fazi B., Di Sano F., Tesniere A., Kepp O., Paterlini-Brechot P., Zitvogel L., Piacentini M, Szabadkai G, Kroemer G. Reduction of endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels favors plasma membrane surface exposure of calreticulin. *Cell Death Differ.* 2008; (15):274–282.
123. Hsieh C. J., Kim T. W., Hung C. F., Juang J., Moniz M., Boyd D. A., He L., Chen P. J., Chen C. H. and Wu T. C. Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin. *Vaccine* 2004; (22):3993–4001.
124. Cheng W. F., Lee C. N., Su Y. N., Chai C. Y., Chang M. C., Polo J. M., Hung C. F., Wu T. C., Hsieh C. Y. and Chen C. A. Sindbis virus replicon particles encoding calreticulin linked to a tumor antigen generate long-term tumor-specific immunity. *Cancer Gene Ther.* 2006; (13):873–885.

125. Nakamura K., Bossy-Wetzel E., Burns K., Fadel M., Lozyk M., Goping I. S., Opas M., Bleackley R. C., Green D. R. and Michalak M. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J. Cell Biol.* 2000; (150):731 -740.
126. Lowin B, Hahne M, Mattmann C. and Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 1994; (370):650-52.
127. Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994; (265):528-30.
128. Sipione S, Ewen C, Shostak I, Michalak M. and Bleackley R.C. Impaired Cytolytic Activity in Calreticulin-Deficient CTLs. *J Immunol* 2005; (174):3212-3219.
129. Lwin Z-M., Guo C., Salim A., Wai-Cheong Yip G., Chew F-T., Nan J., Thike A.A., Tan P-H. and Bay B-H. Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma *Modern Pathology* 2010; (23):1559-1566.
130. Panaretakis T., Joza N., Modjtahedi N., Tesniere A., Vitale I., Durchschlag M., Fimia G.M., Kepp O., Piacentini M., Froehlich K-U., van Endert P., Zitvogel L., Madeo F. and Kroemer G. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death and Differentiation* 2008; (15):1499–1509.
131. Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G.M., Apetoh L., Perfettini J-L., Castedo M., Mignot G., Panaretakis T., Casares N., Métivier D., Larochette N., van Endert P., Ciccosanti F., Piacentini M., Zitvogel L. and Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature Medicine* 2006; (13):54–61.
132. Erić A, Juranić Z, Milovanović Z, Marković I, Inić M, Stanojević-Bakić N, Vojinović-Golubović V. Effects of humoral immunity and calreticulin overexpression on postoperative course in breast cancer. *Pathol Oncol Res.* 2009; 15(1):89-90.
133. Apantaku L.M. Breast-Conserving Surgery for Breast Cancer. *Am Fam Physician.* 2002; 66(12):2271-2278.

134. Jarmołowska B, Bielikowicz K, Iwan M, Sidor K, Kostyra E, Kaczmarek M. Serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5) in breast-fed infants with symptoms of allergy. *Peptides* 2007; 28:678-82.
135. Sánchez, D., Palová-Jelínková, L., Felsberg, J., Šimšová, M., Pekáriková, A., Pecharová, B., Swoboda, I., Mothes, T., Mulder, C.J., Beneš, Z., Tlaskalová-Hogenová, H., Tučková, L. Anti-calreticulin immunoglobulin A (IgA) antibodies in refractory celiac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 153:351–359.
136. Sánchez, D., Tučková, L., Mothes, T., Kreisel, W., Beneš, Z., Tlaskalová-Hogenová, H. Epitopes of calreticulin recognised by IgA autoantibodies from patients with hepatic and coeliac disease. *J. Autoimmun.* 2003; 21:383–392.
137. Arranz, E., Ferguson, A. Intestinal antibody pattern of celiac disease: occurrence in patients with normal jejunal biopsy histology. *Gastroenterol.* 1993; 104: 1263–1272.
138. Hopsu-Havu VK, Glenner GG. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie* 1966; 7(3):197–201.
139. Ayude D, Páez de la Cadena M, Cordero OJ, Nogueira M, Ayude J, Fernández-Briera A, Rodríguez-Berrocal FJ. Clinical interest of the combined use of serum CD26 and alpha-L-fucosidase in the early detection diagnosis of colorectal cancer. *Dis Markers* 2004;19(6):267–272.
140. de la Haba-Rodríguez J, Macho A, Calzado MA, Blázquez MV, Gómez MA, Muñoz EE, Aranda E. Soluble dipeptidyl peptidase IV (CD-26) in serum of patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma* 2002; 49(5):307–311.
141. Cordero OJ, De Chiara L, Lemos-González Y, Páez de la Cadena M, Rodríguez-Berrocal FJ. How the measurements of a few serum markers can be combined to enhance their clinical values in the management of cancer. *Anticancer Res* 2008; 28(4):2333–2341.
142. Itou M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sumie S, Oriishi T, Mitsuyama K, Tsuruta O, Ueno T, Michio Sata M. Altered expression of glucagon-like peptide-1 and dipeptidyl peptidase IV in patients with HCV-related glucose intolerance. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23(2):244–251.
143. van West D, Monteleone P, Di Lieto A, De Meester I, Durinx C, Scharpe S, Lin A, Maj M, Maes M. Lowered serum dipeptidyl peptidase IV activity in patients with

- anorexia and bulimia nervosa. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2000; 250(2):86–92.
144. Maes M, Capuron L, Ravaut A, Gualde N, Bosmans E, Egyed B, Dantzer R, Neveu PJ. Lowered serum dipeptidyl peptidase IV activity is associated with depressive symptoms and cytokine production in cancer patients receiving interleukin-2-based immunotherapy. *Neuropsychopharmacol* 2001;24:130-140.
 145. Durinx C, Neels H, Van der Auwera JC, Naelaerts K, Scharpé S, De Meester I. Reference values for plasma dipeptidylpeptidase IV activity and their association with other laboratory parameters. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:155–159.
 146. Scharpé S, De Meester I, Vanhoof G, Hendriks D, Van Sande M, Van Camp K, Yaron A. Assay of dipeptidyl peptidase IV in serum by Fluorimetry of 4-methoxy-2-naphthylamine. *Clin Chem* 1988;34:2299–2301.
 147. Hino M, Nagatsu T, Kakumu S, Okuyama S, Yoshii Y, Nagatsu I. Glycylprolyl beta-naphthylamidase activity in human serum. *Clin Chim Acta* 1975;62:5–11.
 148. Mannucci E, Pala L, Ciani S, Bardini G, Pezzatini A, Sposato I, Cremasco S, Ognibene A, Rotella CM. Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2005;48:1168–1172.
 149. Verstovsek S, Cabanillas F, Dang NH. CD26 in T-cell lymphomas: a potential clinical role? *Oncology (Huntingt)* 2000; 14:17-23.
 150. Ruiz P, Mailhot S, Delgado P, Amador A, Viciano AL, Ferrer L, Zacharievich N. CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV activity in an aggressive hepatosplenic T-cell lymphoma. *Cytometry* 1998; 34:30-5.
 151. Gotoh H, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T. Activity of dipeptidyl peptidase IV and post-proline cleaving enzyme in sera from osteoporotic patients. *Clin Chem* 1988; 34(12):2499–2501.
 152. Ellingsen T, Hornung N, Møller BK, Hjelm-Poulsen J, Stengaard-Pedersen K. In active chronic rheumatoid arthritis, dipeptidyl peptidase IV density is increased on monocytes and CD4 (+) T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2007; 66(4):451–457.
 153. Stancíková M, Lojda Z, Lukác J, Ruzicková M. Dipeptidyl peptidase IV in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10(4):381–385.

154. Sedo A, Stremenova J, Busek P, Duke-Cohan S. Dipeptidyl peptidase-IV and related molecules: markers of malignancy? *Expert Opin Med Diagn* 2008; 2:1-13.
155. Gonzalez-Gronow M, Kaczowka S, Gawdi G, Pizzo SV. Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) is a cell-surface plasminogen receptor. *Front Biosci* 2008; 13:1610–1618.
156. Sedo A, Hátle K, Stolba P. Changes in dipeptidyl-peptidase IV activity in human serum in pathological conditions of the thyroid gland. *Cas Lek Cesk* 1985; 124(51):1579–1581.
157. Urade M, Komatsu M, Yamaoka M, Fukasawa K, Harada M, Mima T, Matsuya T. Serum dipeptidyl peptidase activities as a possible marker of oral cancer. *Cancer* 1989; 64(6):1274–1280.
158. Andrieu T, Thibault V, Malet I, Laporte J, Bauvois B, Agut H, Cahour A. Similar increased serum dipeptidyl peptidase IV activity in chronic hepatitis C and other viral infections. *J Clin Virol* 2003; 27(1):59–68.
159. Hildebrandt M, Rose M, Rüter J, Salama A, Mönnikes H, Klapp BF. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36(10):1067–1072.
160. Meneilly GS, Demuth HU, McIntosh CHS, Pederson RA. Effect of ageing and diabetes on glucose-dependent insulinotropic polypeptide and dipeptidyl peptidase IV responses to oral glucose. *Diabet Med* 2000; 17(5):346–350.
161. Elgün S, Keskiner A, Kumbasar H. Dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase activity decrease in depression. *Psychoneuroendocrinology* 1999; 24(8):823–832.
162. Maes M, Goossens F, Lin A, De Meester I, Van Gastel A, Scharpé S. Effects of psychological stress on serum prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity in humans: higher serum prolyl endopeptidase activity is related to stress-induced anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 1998; 23(5):485–495.
163. Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Nomura S, Mizutani S. Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1751: 45–51.

164. Piazza GA, Callanan HM, Mowery J, Hixson DC. Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix. *Biochem. J.* 1989; 262:327–334.
165. Cheng HC, Abdel-Ghany M, Elble RC, Pauli BU. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J Biol Chem* 1998; 273(37):24207–24215.
166. Johnson RC; Zhu D, Augustin-Voss HG, Pauli BU. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV is an adhesion molecule for lung-metastatic rat breast and prostate carcinoma cells. *J Cell Biol* 1993; 121:1423-32.
167. Cheng HC, Abdel-Ghany M, Elble RC, Bendicht U. Pauli BU. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J Biol Chem* 1998; 273:24207-15.
168. Cheng HC, Abdel-Ghany M, Zhang S, Pauli BU. Is the Fischer 344/CRJ rat a protein-knock-out model for dipeptidyl peptidase IV-mediated lung metastasis of breast cancer? *Clin Exp Metastasis* 1999; 17:609-15.
169. Kikkawa F, Kajiyama H, Ino K, Shibata K, Mizutani S. Increased adhesion potency of ovarian carcinoma cells to mesothelial cells by overexpression of dipeptidyl peptidase IV. *Int J Cancer* 2003; 105:779-783.
170. Bauvois B. A collagen-binding glycoprotein on the surface of mouse fibroblasts is identified as dipeptidyl peptidase IV. *Biochem J* 1988; 252:723–31.
171. Loster K, Zeilinger K, Schuppan D, Reutter W. The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217:341–8.
172. Moehrle MC, Schlagenhauff BE, Klessen C, Rassner G. Aminopeptidase M and dipeptidyl peptidase IV activity in epithelial skin tumors: a histochemical study. *J. Cutan. Pathol.* 1995; 22: 241–247.
173. Tanaka T, Umeki K, Yamamoto I, Sakamoto F, Noguchi S, S. Ohtaki. CD26 (dipeptidyl peptidase IV/DPP IV) as a novel molecular marker for differentiated thyroid carcinoma. *Int. J. Cancer* 1995; 64:326– 331.
174. Kehlen A, Lendeckel U, Dralle H, Langner J, Hoang-Vu C. Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 2003; 63:8500–8506.

175. Maria Grazia Narducci MG, Scala E, Bresin A, Caprini E, Picchio MC, Remotti D, Ragone G, Nasorri F, Frontani M, Arcelli D, Volinia S, Lombardo GA, Baliva G, Napolitano M, Russo G. Skin homing of Sezary cells involves SDF-1-CXCR4 signaling and down-regulation of CD26/dipeptidylpeptidase IV. *Blood* 2006; 107(3): 1108–1115.
176. Bauvois B, Meester ID, Dumont J, Rouillard D, Zhao HX, Bosmans E. Constitutive expression of CD26 dipeptidylpeptidase IV on peripheral blood B lymphocytes of patients with B chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 1999; 79: 1042–1048.
177. Bauvois B, Djavaheri-Mergny M, Rouillard D, Dumont J, Wietzerbin J. Regulation of CD26/DPPIV gene expression by interferons and retinoic acid in tumor B cells. *Oncogene* 2000; 19: 265–272.
178. Hegen M, Kameoka J, Dong RP, Schlossman SF, Morimoto C. Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. *Immunology* 1997; 90: 257–264.
179. Morrison ME, Vijayasaradhi S, Engelstein D, Albino AP, Houghton AN. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase, *J. Exp. Med.* 1993; 177: 1135– 1143.
180. Pethiyagoda CL, Welch DR, Fleming TP. Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibits cellular invasion of melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 2001; 18:391–400.
181. Wesley UV, Albino AP, Tiwari S, Houghton AN. A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J. Exp. Med.* 1999; 190: 311 – 322.
182. Kahne T, Lendeckel U, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S, Reinhold D. Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth. *Int J Mol Med* 1999; 4(1):3–15.
183. Wrenger S, Faust J, Mrestani-Klaus C, Fengler A, Stockel-Maschek A, Lorey S, Kahne T, Brandt W, Neubert K, Ansorge S, Reinhold D. Down-regulation of T cell activation following inhibition of dipeptidyl peptidase IV/CD26 by the N-terminal part of the thromboxane A2 receptor. *J Biol Chem* 2000; 275(29): 22180-22186.

184. Reinhold D, Kähne T, Steinbrecher A, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S, Brocke S. The role of dipeptidyl peptidase IV (DPIV) enzymatic activity in T cell activation and autoimmunity. *Biol Chem.* 2002; 383(7-8):1133-8.
185. Krakauer M, Sorensen PS, Sellebjerg F. CD4(+) memory T cells with high CD26 surface expression are enriched for Th1 markers and correlate with clinical severity of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006; 181(1–2):157–164.
186. Ma Y, Visser L, Blokzijl T, Harms G, Atayar C, Poppema S, van den Berg A. The CD4+ CD26^{hi} T-cell population in classical Hodgkin's lymphoma displays a distinctive regulatory T-cell profile. *Lab Invest* 2008; 88(5):482–490.
187. Narra K, Mullins SR, Lee HO, Strzemkowski-Brun B, Magalong K, Christiansen VJ, McKee PA, Egleston B, Cohen SJ, Weiner LM, Meropol NJ, Cheng JD. Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(11):1691–1699.
188. Bini L, Magi B, Marzocchi B, Arcuri F, Tripodi S, Cintorino M, Sanchez JC, Frutiger S, Hughes G, Pallini V, Hochstrasser DF, Tosi P: Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis* 1997; 18: 2832–2841.
189. Lwin ZM, Guo C, Salim A, Yip GW, Chew FT, Nan J, Thike AA, Tan PH, Bay BH: Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. *Mod Pathol* 2010; 23: 1559-1566.
190. Liang S, Singh M, Gam LH: The differential expression of aqueous soluble proteins in breast normal and cancerous tissues in relation to ethnicity of the patients; Chinese, Malay and Indian. *Dis Markers* 2010; 28: 149-65.
191. Baltatzis GE, Gaitanarou H, Arnogianaki N, Misitzis J, Voloudakis-Baltatzis IE: Biochemical and ultrastructural correlations of calreticulin and thioredoxin expression in breast mucinous carcinoma and infiltrating ductal carcinoma non-special type. *Ultrastruct Pathol* 2010; doi: 10.3109/01913123.2010.513804.
192. Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, Fimia GM, Kepp O, Piacentini M, Froehlich KU, Van Endert P, Zitvogel L, Madeo F, Kroemer G: The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1499-1509.

193. Hong SH, Misek DE, Wang H, Puravs E, Giordano TJ, Greenson JK, Brenner DE, Simeone DM, Logsdon CD, Hanash SM: An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 5504–5510.
194. Orth T, Dorner T, Meyer Zum Buschenfelde KH, Mayet WJ: Complete congenital heart block is associated with increased autoantibody titers against calreticulin. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 205–215.
195. Pekáriková A, Sánchez D, Palová-Jelínková L, Simsová M, Benes Z, Hoffmanová I, Drastich P, Janatková I, Mothes T, Tlaskalová-Hogenová H, Tucková L: Calreticulin is a B cell molecular target in some gastrointestinal malignancies. *Clin Exp Immunol* 2010; 160: 215-222.
196. Stinton LM, Swain M, Myers MP, Shaheen AA, Fritzler MJ: Autoantibodies to GW bodies and other autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2010; doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04288.x.
197. Routsias JG, Tzioufas AG: B-cell epitopes of the cytoplasmatic autoantigens Ro/SSA and La/SSB: Tools to study the regulation of the autoimmune response. *J Autoimmun* 2010; 35: 256-264.
198. Juranic ZD, Neskovic-Konstantinovic Z, Stanojkovic TP, Zizak Z, Srdic T, Stanojevic-Bakic N, Milosevic D, Jovanovic D: The antitumor immune response in HER-2 positive, metastatic breast cancer patients. *J Transl Med* 2005; 3: 13.
199. Zappasodi R, Pupa SM, Ghedini GC, Bongarzone I, Magni M, Cabras AD, Colombo MP, Carlo-Stella C, Gianni AM, Di Nicola M: Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death. *Cancer Res* 2010; 70: 9062-9072.
200. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001; 22: 633–640.
201. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora KW, Schmidt RE. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31:3121–3127.
202. Cooper MA, Fehniger A, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood* 2001; 97: 3146–3151.

203. Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J et al. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:2886–91.
204. Caligiuri M. Human natural killer cells. *Blood* 2008; 112:461–9.
205. Uciechowski P, Werfel T, Leo R, Gessner JE, Schubert J, Schmidt RE. Analysis of CD16^{dim} and CD16^{bright} lymphocytes--comparison of peripheral and clonal non MHC-restricted T cells and NK cells. *Immunobiology* 1992;185(1):28-40.
206. Ellinidi VN, Anikeeva NV, Goncharova OA, Krasnozhan DA. Natural killer cells (CD56, CD16) as a factor of local antitumor immunity in breast cancer. *Vopr Onkol.* 2005;51(4):447-9.
207. Mamessier E, Sylvain A, Thibult ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Gonçalves A, André P, Romagné F, Thibault G, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F, Moretta A, Olive D. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *Clin Invest.* 2011;121(9):3609–3622.
208. Schmidt-Wolf GD, Negrin RS, Schmidt-Wolf IG. Activated T cells and cytokine-induced CD31CD56¹ killer cells. *Ann. Hematol.* 1997; 74:51.
209. Wilk E, Kalippke K, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R. New aspects of NK cell subset identification and inference of NK cells' regulatory capacity by assessing functional and genomic profiles. *Immunobiology* 2008; 213: 271–283.
210. Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, Stewart CC, Caligiuri MA and Evans SS. Differential expression and function of L-selectin on CD56^{bright} and CD56^{dim} natural killer cell subsets. *J Immunol* 1998; 161: 400-408.
211. Loza MJ, Perussia B. 2004. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56^{bright} stage and effector functions. *J. Immunol.* 2004 172:88.
212. Dalbeth N, Gundle R, Davies RJO, Gary Lee YC, McMichael AJ, Callan MFC. CD56^{bright} NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *The Journal of Immunology* 2004; 173: 6418-6426.

213. Carson W, Caligiuri M. Natural killer cell subsets and development. *Methods* 1996; 9:327–43.
214. Vaquer S, Jordá J, López de la Osa E, Alvarez de los Heros J, López-García N, Alvarez de Mon M. Clinical implications of natural killer (NK) cytotoxicity in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 1990; 36(1):90-2.
215. Wustrow TP, Zenner HP. Natural killer cell activity in patients with carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope* 1985; 95(11):1391-400.
216. Das S, Karim S, Datta Ray C, Maiti AK, Ghosh SK, Chaudhury K. Peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with cervical cancer. *Int J Gynecol Obstet* 2007; 98: 143-6.
217. Pinel MI, Pires V, Harab RC, Rumjanek VM. Phenotypic analysis of PBMCs from uterine cervix cancer patients with high natural killer activity. *J Clin Lab Immunol* 1997; 49: 83-9.
218. Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci* 2007; 28:121–6.
219. Cac NC, Ballas ZK. Recalcitrant warts, associated with natural killer cell dysfunction, treated with systemic IFN- α . *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:526–8.
220. Kubo T, Sato K, Kobayashi D, Motegi A, Kobayashi O, Takeshita S, Nonoyama S. A case of HHV-6 associated acute necrotizing encephalopathy with increase of CD56bright NK cells. *Scand J Infect Dis* 2006; 38:1122–5.
221. Golden-Mason L, Madrigal-Estebas L, McGrath E, Conroy MJ, Ryan EJ, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut* 2008; 57:1121–8.
222. Shibata F, Toma T, Wada T, Inoue M, Tone Y, Ohta K, Kasahara Y, Sano F, Kimura M, Ikeno M, Koizumi S, Yachie A. Skin infiltration of CD56brightCD16) natural killer cells in a case of X-SCID with Omenn syndrome-like manifestations. *Eur J Haematol* 2007; 79:81–85.

223. Schepis D, Gunnarsson I, Eloranta MJ, Lampa J, Jacobson SH, Karre K, Berg L. Increased proportion of CD56bright natural killer cells in active and inactive systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2009; 126:140–6.
224. Guma´ M, Angulo A, Vilches C, Go´mez-Lozano N, Malats N, Lo´pez-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 2004; 104:3664–71.
225. Guma´ M, Cabrera C, Erkizia I, Bofill M, Clotet B, Ruiz L, Lo´pez-Botet M. Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *J Infect Dis* 2006; 194:38–41.
226. Hak L, Mysliwska J, Wieckiewicz J, Szyndler K, Trzonkowski P, Siebert J, Mysliwski A. NK cell compartment in patients with coronary heart disease. *Immun Ageing* 2007; 4:3.
227. Scordamaglia F, Balsamo M, Scordamaglia A, Moretta A, Mingari MC, Canonica GW, Moretta L, Vitale M. Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:479–85.
228. Villanueva J, Lee S, Giannini EH, Graham TB, Passo MH, Filipovich A, Grom AA. Natural killer cell dysfunction is a distinguishing feature of systemic onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:R30–7.
229. Suzuki R, Yamamoto K, Seto M, Kagami Y, Ogura M, Yatabe Y, Suchi T, Kodaera Y, Morishima Y, Takahashi T, Saito H, Ueda R, Nakamura S. (1997) CD7+ and CD56+ myeloid/natural killer cell precursor acute leukaemia: a distinct hematolymphoid disease entity. *Blood* 1997; 90: 2417–2428.
230. Dalmazzo LF, Jácomo RH, Marinato AF, Figueiredo-Pontes LL, Cunha RL, Garcia AB, Rego EM, Falcão RP. The presence of CD56/CD16 in T-cell acute lymphoblastic leukaemia correlates with the expression of cytotoxic molecules and is associated with worse response to treatment. *British Journal of Haematology* 2009; 144(2): 223–229.
231. Kerr, M. A. The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* 1990; 271: 285-296.

232. Deo Y.M, Sundarapandiyan K, Keler T, Wallace P.K, Graziano R.F. Bispecific molecules directed to the Fc receptor for IgA (FcaRI, CD89) and tumor antigens efficiently promote cell-mediated cytotoxicity of tumor targets in whole blood . *J Immunol* 1998;160;1677-1686.

BIOGRAFIJA

Dr Aleksandra Erić-Nikolić rođena je 23.5.1978. godine u Zenici (BiH). Osnovnu i srednju školu (Prva kragujevačka gimnazija) završila je u Kragujevcu sa odličnim uspehom.

Medicinski fakultet u Beogradu upisala je školske 1997/98. godine, a diplomirala 27. februara 2004. godine, sa prosečnom ocenom 8,34.

Magistraske studije upisala je školske 2004/05. godine. Magistarski rad pod nazivom: **"Ispitivanje uticaja terapije tumora jonizujućim zračenjem na autoantitumorsku imunoreaktivnost u bolesnica sa karcinomom grlića materice"** odbranila je 9. juna 2008. godine (mentor: Prof. dr Nenad Borojević, komentor: Dr sci. Zorica Juranić, naučni savetnik; članovi Komisije: Prof. dr Ivana Golubičić, predsednik Komisije, Doc. dr Dušan Popadić, dr sci Ljiljana Vučković-Dekić, naučni savetnik).

Zaposlena je u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije od 24. marta 2006. godine.

Specijalističke studije iz radiologije upisala 1. aprila 2009. godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Александра Ерић-Николит

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Активност серумске дилептидил-пептидазе IV и експресија CD26 антигена на имунокомпетентним ћелијама периферне крви код болесника са бенигним и малигним променама дојке“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 28.5.2012.

А. Ерић-Николит

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора АЛЕКСАНДРА ЕРИЋ-НИКОЛИЋ

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада »Активност серумске липопропротеина-липопротеина IV и експресија
CD26 антигена на имунокомпетентним ћелијама периферне крви
код болесника са беничним и малигнијим променама дојке«

Ментор проф. др РАДАН ЏОДИЋ

Потписани АЛЕКСАНДРА ЕРИЋ-НИКОЛИЋ

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 28.5.2012.

А. Ерић-Николић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Активност серумске дивалентил-пептидазе IV и експресија CD26 антигена на имунокомпетентним ћелијама периферне крви код болесница са бенивним и малигним променама дојке“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 28.5.2012.

A. E. H. H. H.