

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena R. Milovanović

**Interleukin 8 i matriksne metaloproteinaze 2 i  
9 kao markeri invazivnosti u hormonski  
zavisnom karcinomu dojke**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena R. Milovanović

**Interleukin 8 and matrix metalloproteinases 2  
and 9 as markers of invasiveness in hormone  
dependent breast cancer**

doctoral dissertation

Belgrade, 2014

**INFORMACIJE O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE**

**mentori:**

***dr Katarina Zeljić, docent, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet***

***dr Nataša Todorović-Raković, naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije***

**član komisije:**

***dr Marina Stamenković-Radak, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet***

**datum odbrane:\_\_\_\_\_**

## **ZAHVALNICA**

*Ova disertacija urađena je u Laboratoriji za receptore i biologiju malignih tumora Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije u okviru projekta 'Molekularni biomarkeri karcinoma dojke i promena njihovog značaja u zavisnosti od perioda praćenja toka bolesti'.*

*Zahvaljujem se rukovodiocu projekta dr Dragici Nikolić-Vukosavljević na ukazanom poverenju.*

*Zahvaljujem se dr Nataši Todorović-Raković na pruženoj stručnoj pomoći, kao i na podršci u svakom smislu tokom izrade disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Katarini Zeljić i dr Marini Stamenković-Radak na veoma korisnim sugestijama i ekspeditivnosti.*

*Zahvaljujem se kolegama i prijateljima na razumevanju i velikoj podršci.*

*Ovu disertaciju posvećujem Jovanu i Milici...*

# ***Interleukin 8 i matriksne metaloproteinaze 2 i 9 kao markeri invazivnosti u hormonski zavisnom karcinomu dojke***

## ***Rezime***

### ***Polazne osnove:***

Ekspresija receptora za estrogen (ER) i receptora za progesteron (PR) je preduslov hormonske zavisnosti karcinoma dojke. Hormonski receptori su još uvek jedni od najpouzdanijih parametara prognoze i predikcije ovog karcinoma, mada su klinički ishod pacijentkinja i odgovor na hormonsku terapiju varijabilni. Uključivanje receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2) u klasifikaciju karcinoma dojke zajedno sa hormonskim receptorima, samo je donekle doprinelo utvrđivanju preciznijeg prognostičkog profila, što je ukazalo na potrebu za traženjem dodatnih, selektivnijih markera prognoze i predikcije. Prognostički značaj potencijalnih biomarkera se najbolje sagledava praćenjem prirodnog toka bolesti tj. toka bolesti koji nije bio prekidan adjuvantnom (postoperativnom) terapijom. O prirodnom toku bolesti karcinoma dojke ima vrlo malo literaturnih podataka s obzirom da se u savremenoj kliničkoj praksi svim pacijentkinjama daje neki oblik adjuvantne terapije. Literaturni podaci ukazuju na značaj interleukina 8 (IL8) i matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 (MMP2, MMP9) kao potencijalnih biomarkera prognoze i predikcije u različitim tipovima humanih kancera. Studije koje se odnose na hormonsku regulaciju ekspresije ovih potencijalnih biomarkera u karcinomu dojke su kontroverzne. Više studija je ukazalo da bi ovi biomarkeri mogli biti potencijalni indikatori rezistencije na hormonsku terapiju.

### ***Ciljevi:***

Ciljevi istraživanja su bili: da se ispita prognostički i prediktivni značaj kliničko-patoloških parametara i odabranih biomarkera (IL8, MMP2, MMP9); da se proceni da li i na koji način interakcije između ER, PR i HER2 kao glavnih determinanti karcinoma dojke, imaju uticaja na ekspresiju odabranih biomarkera; da se proceni eventualno postojanje sprege između odabranih biomarkera, što bi moglo doprineti razumevanju progresije hormonski zavisnog karcinoma dojke i objašnjenju rezistencije na hormonsku terapiju.

### ***Materijal i metode:***

U studiju je bilo uključeno 150 postmenopausalnih pacijentkinja sa primarnim karcinomom dojke i poznatim kliničko-patološkim parametrima. Detektibilni nivoi hormonskih receptora bi trebalo da ukazuju na hormonski zavisni karcinom dojke. Nakon operacije histološki uzorci tumora su pregledani i klasifikovani po kriterijumima AJCC (American Joint Committee on Cancer) za TNM status i histopatološki tip, i deo tumora je postoperativno zamrznut. Pacijentkinje sa povoljnim kliničko-patološkim parametrima (negativni nodalni status) nisu primale adjuvantnu terapiju, prema u to vreme važećem protokolu. Ostale pacijentkinje, pretežno sa pozitivnim nodalnim statusom, su primale adjuvantnu hormonsku terapiju (tamoksifen). Tok bolesti pacijentkinja je praćen od hirurške intervencije do pojave relapsa, što je definisano kao vreme preživljavanja do pojave relapsa (engl. relapse-free survival, RFS). Status HER2 gena (odsustvo ili prisustvo amplifikacije) je određivan na tkivnim presecima tumora iz parafinskih kalupa hromogenom *in situ* hibridizacijom (CISH metoda). Koncentracije odabranih biomarkera (IL8, MMP2, MMP9) su određivane u homogenatima tkiva tumora ELISA esejem. Neparametrijski statistički testovi su korišćeni za analizu dobijenih podataka.

### ***Rezultati:***

Nije bilo statistički značajnih razlika u ekspresiji odabranih biomarkera (IL8, MMP2, MMP9) između podgrupa pacijentkinja formiranih na osnovu ER/PR/HER2 statusa (Mann-Whitney Rank Sum test,  $p > 0,05$ ). Dobijena je statistički značajna razlika u ekspresiji IL8 između podgrupa pacijentkinja formiranih na osnovu medijalne vrednosti MMP9 ( $M = 1,87$  ng/mg). Ekspresija IL8 je bila značajno povišena kod pacijentkinja sa koncentracijama MMP9 većim od medijane u poređenju sa pacijentkinjama sa koncentracijama MMP9 manjim od medijane ( $p = 0,008$ ). Statistički značajna negativna korelacija je dobijena između koncentracija ER i IL8 kao i između koncentracija PR i IL8 (Spearman Rank Order Correlation test,  $p = 0,02$  i  $p = 0,006$ , redom). Nisu dobijene statistički značajne korelacije između koncentracija hormonskih receptora i matriksnih metaloproteinaza 2 i 9. Statistički značajna pozitivna korelacija je dobijena između koncentracija IL8 i MMP9 ( $p < 0,001$ ).

Pacijentkinje koje nisu primale adjuvantnu terapiju su imale značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama koje su primale hormonsku terapiju (Log Rank,  $p=0,008$ ). U grupi pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju, pacijentkinje sa manjim tumorima ( $T<2\text{cm}$ ) i invazivnim duktalnim karcinomom su imale značajno duže vreme preživljavanja u poređenju sa pacijentkinjama sa većim tumorima ( $T\geq 2\text{cm}$ ) i invazivnim lobularnim karcinomom ( $p=0,03$  i  $p=0,01$ , redom). U istoj grupi, pacijentkinje sa koncentracijama IL8 manjim od medijane ( $M=88,82$  pg/mg) su imale značajno duže vreme preživljavanja u poređenju sa pacijentkinjama sa koncentracijama IL8 većim od medijane ( $p=0,002$ ). Pored toga, pacijentkinje sa IL8–MMP2– i IL8–MMP2+ fenotipovima su imale značajno duže vreme preživljavanja u odnosu na pacijentkinje sa IL8+MMP2– fenotipom ( $p<0,001$  i  $p=0,02$ , redom). Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane IL8 ( $M=88,82$  pg/mg), u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa IL8– statusom su imale manji procenat relapsa i duže vreme preživljavanja u poređenju sa pacijentkinjama sa IL8+ statusom, i to bez obzira na ER/PR/HER2 status. Pri tom su pacijentkinje sa ER+IL8– fenotipom imale značajno duže vreme preživljavanja u odnosu na one sa ER+IL8+ i ER–IL8+ fenotipovima ( $p=0,04$  i  $p=0,02$ , redom); pacijentkinje sa PR–IL8– fenotipom su imale značajno duže vreme preživljavanja u odnosu na one sa PR–IL8+ i PR+IL8+ fenotipovima ( $p=0,003$  i  $p=0,02$ , redom); i pacijentkinje sa HER2–IL8– fenotipom su imale značajno duže vreme preživljavanja u odnosu na one sa HER2–IL8+ i HER2+IL8+ fenotipovima ( $p=0,01$  i  $p=0,02$ , redom). Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane MMP2/MMP9 ( $M=12,12$  ng/mg za MMP2,  $M=1,82$  ng/mg za MMP9), ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja.

U grupi pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju, pacijentkinje sa ER+ statusom su imale značajno duže vreme preživljavanja u poređenju sa pacijentkinjama sa ER– statusom (Log Rank test,  $p=0,04$ ). Nijedan od potencijalnih biomarkera, pojedinačno ili kombinovano, nije pokazao statistički značaj za predikciju odgovora (efikasnost ili

rezistencija) na hormonsku terapiju. Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu ER/PR/HER2 statusa i medijane IL8 ( $M=9,15$  pg/mg), pacijentkinje sa ER+IL8- i ER+IL8+ fenotipovima su imale značajno duže vreme preživljavanja u odnosu na pacijentkinje sa ER-IL8+ fenotipom ( $p=0,04$  i  $p=0,02$ , redom), dok u svim ostalim kombinacijama fenotipova nije bilo statistički značajnih razlika u dužini vremena preživljavanja. Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane MMP2/MMP9 ( $M=11,55$  ng/mg za MMP2,  $M=2,51$  ng/mg za MMP9), ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja.

#### **Zaključci:**

Od kliničko-patoloških parametara, veličina tumora i histopatološki tip tumora su pokazali prognostički značaj za praćenje prirodnog toka bolesti. Od potencijalnih biomarkera jedino je IL8 pokazao prognostički značaj za praćenje prirodnog toka bolesti, te bi IL8 iz tkiva tumora mogao biti marker loše prognoze. Dodatno, IL8 se pokazao kao pouzdaniji prognostički marker u odnosu na status receptora (ER, PR, HER2) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju. Nijedan od potencijalnih biomarkera, pojedinačno ili kombinovano, nije pokazao značaj za predikciju odgovora na hormonsku terapiju. Istovremeno, ER status se pokazao kao pouzdaniji prediktivni marker odgovora na hormonsku terapiju u odnosu na ispitivane biomarkere. Značajna negativna korelacija između koncentracija hormonskih receptora i interleukina 8 potvrđuje da bi ekspresija IL8 mogla biti hormonski regulisana. Odsustvo značajnih relacija i korelacija između koncentracija hormonskih receptora i matriksnih metaloproteinaza 2 i 9, ukazuje da ekspresija ovih enzima nije hormonski regulisana. Odsustvo značajnih relacija između koncentracija ispitivanih biomarkera i amplifikacije HER2 gena ukazuje da HER2 nema uticaja na ekspresiju odabranih biomarkera (IL8, MMP2, MMP9). Značajna pozitivna relacija i značajna pozitivna korelacija između koncentracija IL8 i MMP9 ukazuju da bi eventualno postojanje pozitivne sprege između IL8 i MMP9 moglo doprineti progresiji hormonski zavisnog karcinoma dojke.



*Ključne reči: karcinom dojke, hormonski receptori, HER2, interleukin 8, matriksne metaloproteinaze 2 i 9;*

Naučna oblast: Molekularna biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

UDK broj: 616 – 006.6

## ***Interleukin 8 and matrix metalloproteinases 2 and 9 as markers of invasiveness in hormone dependent breast cancer***

### ***Abstract***

#### ***Background:***

Expression of estrogen receptor (ER) as well as progesterone receptor (PR) is the prerequisite of hormonal dependence of breast cancer. Hormone receptors are still among the most reliable prognostic and predictive parameters of this cancer, although the clinical outcome of patients and the response to hormonal therapy are variable. Inclusion of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in the classification of breast cancer together with hormone receptors, only partly contributed to the determination of more precise prognostic profile, which pointed out the need for searching additional, more selective prognostic and predictive markers. The best way to evaluate the prognostic significance of potential biomarkers is by following the natural course of the disease – the course that hadn't been interrupted by adjuvant (postoperative) therapy. Very few literature data is available regarding this issue as some kind of adjuvant therapy is given to all breast cancer patients nowadays. Literature data have indicated the significance of interleukin 8 (IL8) and matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP2, MMP9) as potential prognostic and predictive biomarkers in different types of human cancers. Available data regarding hormonal regulation of expression of these potential biomarkers in breast cancer are controversial. Many studies have indicated that these biomarkers could be potential indicators of resistance to hormonal therapy.

#### ***Aims:***

The aims of this study were: to evaluate the prognostic and predictive significance of clinicopathological parameters and selected biomarkers (IL8, MMP2, MMP9); to examine if and how interactions among ER, PR and HER2 as the main determinants of breast cancer influence the expression of selected biomarkers; to examine the possible existence of feedback between selected biomarkers, which might contribute to

understanding of progression of hormone dependent breast cancer as well as to the explanation of resistance to hormonal therapy.

**Material and methods:**

The study included 150 postmenopausal primary breast cancer patients with known clinicopathological parameters. Detectable levels of hormone receptors should indicate hormone dependent breast cancer. After surgical removal of primary tumor, histological specimens were examined and classified according to the criteria of the AJCC (American Joint Committee on Cancer) for TNM stage and histological type and part of the tumor was frozen. Patients with favorable clinicopathological parameters (negative nodal status) did not receive adjuvant therapy according to valid protocol at that time. The rest of patients, predominantly with positive nodal status, received adjuvant hormonal therapy (tamoksifen). The course of the disease was followed from surgical intervention till relapse, so-called, relapse free survival (RFS). HER2 status (absence or presence of gene amplification) was determined on paraffin-embedded tumor tissue sections by chromogenic *in situ* hybridization (CISH). Concentrations of selected biomarkers (IL8, MMP2, MMP9) were determined in tumor tissue homogenates by ELISA. Nonparametric statistical tests were used for data analysis.

**Results:**

There were no statistically significant differences in the expression of selected biomarkers (IL8, MMP2, MMP9) between the subgroups of patients formed according to ER/PR/HER2 status (Mann-Whitney Rank Sum test,  $p > 0,05$ ). There was a statistically significant difference in the expression of IL8 between the subgroups of patients formed according to MMP9 median value ( $M = 1,87$  ng/mg). IL8 expression was significantly higher in patients with levels of MMP9 higher than the median value compared to patients with MMP9 levels lower than the median ( $p = 0,008$ ). A statistically significant negative correlation was found between ER and IL8 levels as well as between PR and IL8 levels (Spearman Rank Order Correlation test,  $p = 0,02$  and  $p = 0,006$ , respectively). There were no statistically significant correlations between levels of hormone receptors and matrix metalloproteinases 2 and 9. A statistically significant positive correlation was found between IL8 and MMP9 levels ( $p < 0,001$ ).

Untreated patients had significantly longer RFS compared to patients treated with hormonal therapy (Log Rank test,  $p=0,008$ ). In the group of untreated patients, patients with smaller tumors ( $T<2\text{cm}$ ) and invasive ductal carcinoma had significantly longer RFS compared to patients with larger tumors ( $T\geq 2\text{cm}$ ) and invasive lobular carcinoma ( $p=0,03$  and  $p=0,01$ , respectively). In the same group of untreated patients, patients with IL8 levels lower than the median value ( $M=88,82$  pg/mg) had significantly longer RFS compared to patients with IL8 levels higher than the median ( $p=0,002$ ). Furthermore, untreated patients with IL8–MMP2– and IL8–MMP2+ phenotypes had significantly longer RFS compared to patients with IL8+MMP2– phenotype ( $p<0,001$  and  $p=0,02$ , respectively). When comparing RFS of untreated patients stratified in different phenotypes according to receptor status and median IL8 value ( $M=88,82$  pg/mg), in all combinations of phenotypes patients with IL8– status had lower percentage of relapses as well as longer RFS compared to patients with IL8+ status, irrespective of ER/PR/HER2 status. Furthermore, patients with ER+IL8– phenotype had significantly longer RFS compared to those with ER+IL8+ and ER–IL8+ phenotypes ( $p=0,04$  and  $p=0,02$ , respectively); patients with PR–IL8– phenotype had significantly longer RFS compared to those with PR–IL8+ and PR+IL8+ phenotypes ( $p=0,003$  and  $p=0,02$ , respectively); and patients with HER2–IL8– phenotype had significantly longer RFS compared to those with HER2–IL8+ and HER2+IL8+ phenotypes ( $p=0,01$  and  $p=0,02$ , respectively). When comparing RFS of untreated patients stratified in different phenotypes according to receptor status and median MMP2/MMP9 value ( $M=12,12$  ng/mg for MMP2,  $M=1,82$  ng/mg for MMP9), there were no statistically significant differences in terms of RFS in any combination of phenotypes.

In the group of patients treated with hormonal therapy, patients with ER+ status had significantly longer RFS compared to those with ER– status (Log Rank test,  $p=0,04$ ). None of the potential biomarkers, neither individually nor in combination, showed statistical significance for prediction of response (efficacy or resistance) to hormonal therapy. When comparing RFS of patients treated with hormonal therapy, stratified in different phenotypes according to ER/PR/HER2 status and median IL8 value ( $M=9,15$  pg/mg), patients with ER+IL8– and ER+IL8+ phenotypes had significantly longer RFS compared to patients with ER–IL8+ phenotype ( $p=0,04$  and  $p=0,02$ , respectively), but in all other combinations of

phenotypes there were no statistically significant differences in terms of RFS. When comparing RFS of patients treated with hormonal therapy, stratified in different phenotypes according to receptor status and median MMP2/MMP9 value (M=11,55 ng/mg for MMP2, M=2,51 ng/mg for MMP9), there were no statistically significant differences in terms of RFS in any combination of phenotypes.

**Conclusions:**

Among clinicopathological parameters, tumor size and histopathological type showed prognostic significance in following the natural course of the disease. Among potential biomarkers only IL8 showed prognostic significance in following the natural course of the disease, and IL8 from tumor tissue could be a marker of unfavorable prognosis. In addition, IL8 proved as more reliable prognostic marker than receptor status (ER, PR, HER2) in untreated patients. None of the potential biomarkers, neither individually nor in combination, did not show significance for prediction of response to hormonal therapy. Concurrently, ER status proved as more reliable predictor of response to hormonal therapy compared to examined biomarkers. A significant negative correlation between levels of hormone receptors and IL8 confirmed that IL8 expression could be hormonally regulated. The absence of significant relations and correlations between levels of hormone receptors and matrix metalloproteinases 2 and 9, indicated that the expression of these enzymes was not hormonally regulated. The absence of significant relations between levels of examined biomarkers and amplification of HER2 gene indicated that HER2 did not influence the expression of selected biomarkers (IL8, MMP2, MMP9). A significant positive relation as well as correlation between IL8 and MMP9 levels indicated that the possible existence of positive feedback between IL8 and MMP9 might contribute to progression of hormone dependent breast cancer.

*Keywords: breast cancer, hormone receptors, HER2, interleukin 8, matrix metalloproteinases 2 and 9*

Academic expertise: Molecular biology

Field of academic expertise: Molecular biology of eukaryotes

UDK number: 616 – 006.6

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. Karcinom dojke	2
<b>1.2. Prognoza i predikcija karcinoma dojke</b>	<b>3</b>
1.2.1. Kliničko-patološki parametri prognoze i predikcije	3
1.2.2. Molekularni biomarkeri prognoze i predikcije	5
1.2.2.1. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke	5
1.2.2.2. Steroidni receptori: receptori za estrogen i progesteron (ER, PR)	7
1.2.2.3. Receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2)	10
<b>1.3. Hormonska zavisnost karcinoma dojke</b>	<b>11</b>
1.3.1. Hormonska terapija	13
1.3.2. Mehanizmi rezistencije na hormonsku terapiju (tamoksifen)	14
<b>1.4. Potencijalni molekularni biomarkeri prognoze i predikcije</b>	<b>16</b>
1.4.1. Interleukin 8 (IL8/CXCL8)	16
1.4.2. Matriksne metaloproteinaze 2 i 9 (MMP2, MMP9)	20
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>27</b>
3.1. STUDIJSKA GRUPA	28
<b>3.2. METODE</b>	<b>30</b>
3.2.1. Homogenizacija tkiva tumora i izdvajanje citosolne frakcije	30
3.2.2. Određivanje koncentracije interleukina 8 u citosolnoj frakciji homogenata tkiva tumora ELISA esejem	30
3.2.2.1. Priprema reagenasa, standarda i uzoraka za ELISA esej	31
3.2.2.2. Procedura ELISA esaja	31
3.2.3. Određivanje koncentracije matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u citosolnoj frakciji homogenata tkiva tumora ELISA esejem	32
3.2.4. Detekcija amplifikacije HER2 gena na presecima tkiva tumora hromogenom <i>in situ</i> hibridizacijom (CISH metoda)	33
3.2.4.1. Procedura hromogene <i>in situ</i> hibridizacije	33
3.2.5. Statistička analiza	35
<b>4. REZULTATI</b>	<b>37</b>
<b>4.1. Raspodela koncentracija biomarkera u odnosu na kliničko-patološke parametre i analiza uzajamnih odnosa koncentracija biomarkera</b>	<b>38</b>
4.1.1. Raspodela koncentracija biomarkera u odnosu na kliničko-patološke parametre	38
4.1.2. Analiza uzajamnih odnosa koncentracija biomarkera	42

<b>4.2. Analiza prognostičkog i prediktivnog značaja potencijalnih biomarkera</b> .....	<b>45</b>
4.2.1. Analiza prognostičkog značaja kliničko-patoloških parametara i biomarkera .....	47
4.2.1.1. Analiza prognostičkog značaja kliničko-patoloških parametara .....	47
4.2.1.2. Analiza prognostičkog značaja biomarkera .....	49
4.2.1.2.1. Analiza prognostičkog značaja različitih fenotipskih kombinacija na osnovu statusa biomarkera .....	51
4.2.1.2.2. Analiza prognostičkog značaja različitih fenotipskih kombinacija na osnovu statusa receptora i biomarkera .....	56
4.2.2. Analiza prediktivnog značaja kliničko-patoloških parametara i biomarkera .....	68
4.2.2.1. Analiza prediktivnog značaja kliničko-patoloških parametara .....	68
4.2.2.2. Analiza prediktivnog značaja biomarkera .....	70
4.2.2.2.1. Analiza prediktivnog značaja različitih fenotipskih kombinacija na osnovu statusa biomarkera .....	71
4.2.2.2.2. Analiza prediktivnog značaja različitih fenotipskih kombinacija na osnovu statusa receptora i biomarkera .....	75
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	<b>85</b>
<b>5.1. Raspodela koncentracija biomarkera u odnosu na kliničko-patološke parametre i analiza uzajamnih odnosa koncentracija biomarkera</b> .....	<b>86</b>
<b>5.2. Analiza prognostičkog i prediktivnog značaja potencijalnih biomarkera</b> .....	<b>90</b>
5.2.1. Analiza prognostičkog i prediktivnog značaja kliničko-patoloških parametara .....	91
5.2.2. Analiza prognostičkog i prediktivnog značaja interleukina 8 .....	93
5.2.2.1. Odnos interleukina 8 i receptora (ER/HER2) .....	96
5.2.3. Analiza prognostičkog i prediktivnog značaja matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 .....	100
5.2.3.1. Odnos matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 i receptora (ER/HER2) .....	104
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>107</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>110</b>
<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b> .....	<b>128</b>
<b>PRILOZI</b> .....	<b>129</b>

# **1.UVOD**



## **1.1. Karcinom dojke**

Karcinom dojke je maligno oboljenje epitelnog tkiva mlečnih žlezda. Nedavno je objavljena sistematska analiza obolevanja i umiranja od karcinoma dojke, koja se zasnivala na podacima iz registara za karcinom iz 187 zemalja uključujući i Srbiju. Ova analiza je pokazala da učestalost karcinoma dojke na globalnom nivou kontinuirano raste već 30 godina i da taj porast iznosi oko 3% godišnje, dok mortalitet varira (Forouzanfar i sar., 2011). Pri tom treba imati u vidu činjenicu da trend napretka dijagnostike prati i trend povećane učestalosti karcinoma dojke. Danas u Srbiji 26% žena obolelih i 17,5% žena umrlih od malignih tumora imaju dijagnozu karcinoma dojke, dok kumulativna verovatnoća obolevanja od karcinoma dojke iznosi 12,5%, odnosno jedna od 8 žena će tokom života oboleti (Pekmezović, 2012).

Iako je primarni tumor heterogeni tj. poliklonalni, monoklonalnog je porekla i posledica je inicijacije, promocije (proliferacija) i progresije (akumulacija mutacija u toku promocije) jednog klona ćelija (Weinberg, 2007). Do progresije odnosno akumulacije mutacija dolazi usled povećane mutabilnosti datog ćelijskog klona, što je posledica aktivacije protoonkogeno i/ili inhibicije tumor supresor gena. Stem ćelije dojke imaju vrlo visok replikativni potencijal i sposobnost samoobnavljanja, što im omogućava da tokom vremena akumuliraju mutacije i čini ih ćelijama kandidatima za poreklo kancera (Smalley i Ashworth, 2003).

Invazivni karcinom dojke karakteriše infiltracija malignih ćelija u okolno tkivo, što može biti praćeno formiranjem mikro-/makro- metastaza u ciljnim organima. Metastaze predstavljaju depozite metastatskih klonova primarnog tumora u sekundarnim ciljnim organima u kojima im pogoduje mikrosredina. Lokoregionalno širenje karcinoma dojke zahvata regionalne limfne čvorove (pazušna jama i limfni čvorovi duž grudne kosti), dok su dominantna mesta hematogenih metastaza kosti, mozak, pluća, jetra i koža (Muller i sar., 2001).

## **1.2. Prognoza i predikcija karcinoma dojke**

Prognostički markeri bi trebalo da ukazuju na klinički ishod bolesti pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu (postoperativnu) terapiju. S obzirom da je savremena klinička praksa takva da se svim pacijentkinjama sa karcinomom dojke daje neki oblik adjuvantne terapije, sama definicija prognostičkih markera je prilagođena ovoj praksi, odnosno prognostički markeri ukazuju na klinički ishod bolesti u trenutku dijagnoze, nezavisno od vrste terapije. To su uglavnom indikatori rasta, invazivnosti i metastatskog potencijala. Prediktivni markeri ukazuju na odgovor (senzitivnost ili rezistencija) na određenu vrstu terapije (Hayes i sar., 1998).

### **1.2.1. Kliničko-patološki parametri prognoze i predikcije**

Osnovna klasifikacija karcinoma dojke izvršena je na osnovu kliničko-patoloških parametara: godina i statusa menopauze, veličine tumora, nodalnog statusa, histopatološkog tipa tumora i gradusa tumora.

#### **godine i status menopauze**

U najvećem broju studija korišćena je podela pacijentkinja na mlađe od 50 godina i starije od 50 godina. Starost pacijentkinja je usko povezana sa statusom menopauze. Mnoge studije su se bavile procenom uticaja godina i statusa menopauze na klinički ishod bolesti i rezultati su kontradiktorni. Kao poseban entitet izdvaja se starosna grupa pacijentkinja mlađih od 35 godina koje imaju veoma agresivan oblik karcinoma dojke (Walker i sar., 1996).

#### **veličina tumora**

Na osnovu veličine, tumori se mogu svrstati u sledeće kategorije: pT1 ( $\leq 2$  cm), pT2 (2–5 cm), pT3 ( $> 5$  cm) i pT4 (tumor bilo koje veličine koji je zahvatio grudni koš ili kožu, inflamatorni karcinom) (Singletary i sar., 2002). Prema konsenzusu pT1 veličina tumora se uzima kao jedan od kriterijuma za definisanje niskorizične grupe pacijentkinja, mada je poznato da i vrlo mali tumori ( $\leq 0,1$  cm) mogu imati visok metastatski potencijal.

**nodalni status**

Prema konsenzusu status regionalnih limfnih čvorova je najznačajniji nezavisni parametar prognoze. Odsustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (N0) ukazuje na dobru prognozu, dok prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (N+) ukazuje na tumor sa metastatskim potencijalom. Kod 20-30% pacijentkinja sa N0 statusom dolazi do ponovnog javljanja bolesti tj. relapsa tokom perioda od 10 godina od trenutka dijagnoze, dok kod 70% pacijentkinja sa N+ statusom dolazi do relapsa u istom periodu (Fitzgibbons i sar., 2000).

**histološki gradus tumora**

Gradus tumora se određuje na osnovu (Bloom i Richardson, 1957):

1. morfoloških svojstava malignih ćelija (oblik i veličina ćelija i jedara, izgled hromatina, prisustvo jedaraca) i zastupljenosti tubularnog aranžmana malignih ćelija što ukazuje na stepen diferentovanosti tumora;
2. broja patoloških mitozna na 10 mikroskopskih polja najvećeg uveličanja što ukazuje na proliferativni potencijal tumora.

Gradus obuhvata tri stepena; gradus 3 ukazuje na morfološku sliku slabo diferentovanog i izrazito proliferativnog tumora, za razliku od gradusa 1 koji odgovara dobro diferentovanim i nisko proliferativnim tumorima. Ostali slučajevi, između ove dve kategorije, su najzastupljeniji i svrstavaju se u gradus 2. Pacijentkinje sa tumorima gradusa 1 imaju bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa tumorima gradusa 2 i 3 (Elston i Ellis, 1991).

**histopatološki tip tumora**

Karcinom dojke čine *in situ* i invazivne lezije. Na osnovu arhitektonike rasta i morfoloških svojstava malignih ćelija kao i karakteristika stromalne komponente tumora, invazivni karcinomi su svrstani u različite histopatološke tipove i subtipove. Invazivni duktalni karcinom – *NST* (engl. no special type) koji nema svojstva specifičnih histopatoloških tipova je najzastupljeniji i čini 50-70% karcinoma dojke (Scarff i Torloni, 1981).

## 1.2.2. Molekularni biomarkeri prognoze i predikcije

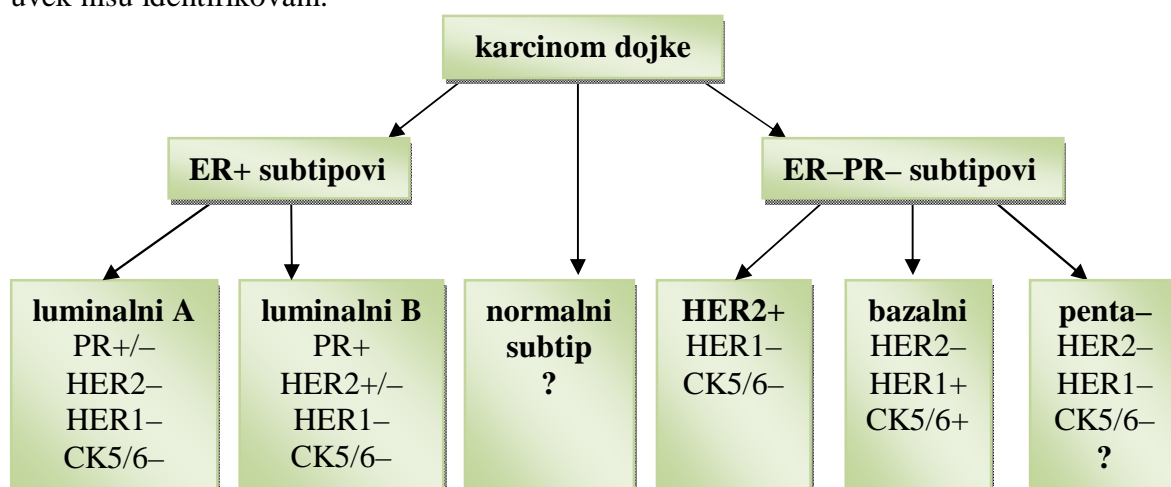
### 1.2.2.1. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke

U novije vreme klasifikacija karcinoma dojke se zasniva na ekspresiji receptora za estrogen (ER), receptora za progesteron (PR) i receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2) koji se mogu razmatrati i kao molekularni biomarkeri i kao kliničko-patološki parametri (tzv. triple receptor status). Analize genskih ekspresionih profila su pokazale da postoje razlike u ekspresiji drugih molekularnih biomarkera u zavisnosti od statusa ER, PR i HER2. Na osnovu genskih ekspresionih profila identifikovani su osnovni molekularni subtipovi karcinoma dojke koji imaju različite kliničke ishode: luminalni A, luminalni B, HER2 amplifikovani (HER2+), bazalni i normalni subtip (Sorlie i sar., 2001). Novije studije su pokazale da imunohistohemija (IHC) kao ekonomična, jednostavnija i reproducibilna metoda, može pouzdano da identifikuje ove subtipove na osnovu 5 IHC markera: ER, PR, HER2, EGFR/HER1 i citokeratina 5 i 6 (CK5/6) (slika 1) (Tamimi i sar., 2008).

Luminalni tumori imaju genske ekspresione profile slične onom u luminalnom epitelu dojke. Luminalni tumori tipično ekspimiraju luminalne citokeratine 8 i 18, ER i gene povezane sa aktivacijom ER. Luminalni A subtip je najučestaliji od svih subtipova (>40%), odlikuje se visokom ekspresijom ER, niskom ekspresijom HER2 genskog klastera (HER2-) i niskom ekspresijom proliferativnog genskog klastera (Malhotra i sar., 2010, Shawarby i sar., 2013). Pacijentkinje sa luminalnim A tumorima imaju najbolju prognozu i dobro odgovaraju na hormonsku terapiju. Identifikacija luminalnog B subtipa na proteinskom nivou je kontroverzna. Neki autori su koristili koekspresiju hormonskih receptora i HER2 za definisanje luminalnog B subtipa, a na osnovu činjenice da se HER2 eksprimira u 30-50% luminalnih tumora. Pacijentkinje sa HER2+ luminalnim tumorima imaju lošiju prognozu i rezistentne su na hormonsku terapiju. Stoga je prema drugim autorima svrstavanje ovih tumora u luminalne tumore neosnovano i HER2+ luminalne tumore bi trebalo svrstati u zasebnu kategoriju (tzv. luminalni-HER2 hibridi) (Bhargava i sar., 2009). Luminalni B subtip se razlikuje od luminalnog A subtipa po nižoj (ali pozitivnoj) ekspresiji ER, varijabilnoj ekspresiji HER2 genskog klastera (HER2+/-) i višoj

ekspresiji proliferativnog klastera (Malhotra i sar., 2010, Shawarby i sar., 2013). Javlja se sa učestalošću 10-20%. Pacijentkinje sa luminalnim B tumorom imaju lošiju prognozu.

U ER– tumore dojke spadaju sledeći subtipovi: HER2+, bazalni i penta– (slika 1). HER2+ subtip se odlikuje visokom ekspresijom HER2 genskog klastera, visokom ekspresijom proliferativnog klastera i niskom ekspresijom luminalnog klastera (Malhotra i sar., 2010, Shawarby i sar., 2013). Javlja se sa učestalošću 10-15% i pacijentkinje sa HER2+ subtipom karcinoma imaju lošu prognozu. HER2+ subtip obuhvata oko 50% HER2+ tumora, dok se druga polovina HER2+ tumora odlikuje visokom ekspresijom luminalnog klastera i pripada luminalnom B subtipu. Bazalni subtip ima genske ekspresione profile slične onom u bazalnom epitelu dojke (HER1+CK5/6+) (Malhotra i sar., 2010, Shawarby i sar., 2013). Javlja se sa učestalošću 15-20%. Pacijentkinje sa bazalnim tumorima imaju najlošiju prognozu. Često se dijagnostikuje kod mladih žena sa BRCA mutacijama. Još uvek nije jasno da li je loša prognoza posledica nedostatka terapijskih opcija ili je posledica inherentne agresivnosti bazalnih tumora. Penta– tumori odgovaraju triple– tumorima koji ne ekspimiraju bazalne markere (HER1–CK5/6–). Normalni subtip karcinoma dojke ima genske ekspresione profile slične onima u vezivnom tkivu dojke i bazalnom epitelu, dok je ekspresija luminalnog klastera niska (Malhotra i sar., 2010, Shawarby i sar., 2013). Javlja se sa učestalošću 10-15%. Pacijentkinje sa normalnim subtipom karcinoma imaju dobru prognozu. IHC markeri za penta– i normalni subtip još uvek nisu identifikovani.



Slika 1. Molekularni subtipovi karcinoma dojke

### 1.2.2.2. Steroidni receptori: receptori za estrogen i progesteron (ER, PR)

Poznato je da steroidni hormoni – estrogeni i progesteron, imaju primarnu ulogu u normalnom i neoplastičnom razvoju dojke. Steroidni hormoni indukuju proliferaciju epitela mlečnih žlezda i deluju kao faktori preživljavanja. Histološki, parenhim zrele mlečne žlezde se sastoji iz epitela alveola i epitela izvodnih kanala. Estradiol je odgovoran za duktalnu morfogenezu, dok je progesteron odgovoran za alveolarni razvoj (Lamote i sar., 2004). Estrogen i progesteron ostvaruju svoje efekte na ciljne ćelije tako što difunduju kroz plazma membranu i vezuju se za odgovarajuće receptore. Receptori za estrogen i progesteron pripadaju superfamiliji jedarnih receptora koji funkcionišu kao hormonski regulisani transkripcioni faktori, i poseduju dva aktivaciona domena (funkcije) – AF1 domen koji je ligand nezavisni i AF2 domen koji je ligand zavisni. Postoje dva tipa receptora za estrogen – ER $\alpha$  i ER $\beta$ , koji su kodirani različitim genima i koji imaju približno isti afinitet za estradiol, dok im se razlikuje afinitet za druge ligande kao što su fitoestrogeni i antiestrogeni (Le Romancer i sar., 2011). Smatra se da ER $\beta$  negativno reguliše signalne puteve ER $\alpha$ , verovatno formiranjem heterodimera. U daljem tekstu kada govorimo o estrogenom receptoru mislimo na ER $\alpha$ . Gen koji kodira PR je regulisan estrogenim receptorom i ekspresija PR je indikator funkcionalnosti estrogenog receptora.

Poznato je da u epitelu dojke ekspresija ER raste sa godinama i dostiže plato posle menopauze. Iako broj proliferišućih ćelija opada sa godinama, procentualna zastupljenost ER+ ćelija raste (Shoker i sar., 1999), i povećana ekspresija ER predstavlja faktor rizika za nastanak karcinoma dojke. U okviru epitela dojke, proliferišuće ćelije (Ki67+) su po pravilu ER- i stoga je predložen model parakrine stimulacije proliferacije ER- ćelija faktorima rasta koje sintetišu i sekretuju ER+ ćelije u odgovoru na estrogen (Clarke i sar., 2004). Smatra se da rano u tumorigenezi dolazi do disregulacije signalizacije preko ER i mogu se detektovati proliferišuće Ki67+ER+ ćelije tumora (Shoker i sar., 1999). Izmene u signalizaciji preko ER mogu povećati osetljivost ćelija tumora na estrogene i time se može objasniti zašto estrogen-zavisni tumori nastaju u postmenopauzi, kada epitel dojke involuira (Clarke i sar., 2004).

Estrogen i progesteron imaju značajne uloge ne samo u tumorigenezi već i u progresiji tumora. Tako estrogen indukuje aktivaciju, proliferaciju i migraciju ER+

endotelnih ćelija, i stimuliše ekspresiju faktora angiogeneze i proteaza u ER+ ćelijama tumora (Losordo i Isner, 2001). Progesteron stimuliše ekspresiju faktora angiogeneze npr. vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) u PR+ ćelijama tumora, koji delujući autokrino i parakrino stimuliše proliferaciju i preživljavanje endotelnih ćelija i ćelija tumora (Liang i Hyder, 2005).

Mehanizmi delovanja hormonskih receptora su kompleksni i mogu se podeliti u genomske i negenomske. Genomski mehanizmi delovanja mogu biti ligand-zavisni (klasični i neklasični) i ligand-nezavisni (slika 2).

Prema klasičnom modelu ligand-zavisne aktivacije receptora, vezivanjem liganda za receptor dolazi do dimerizacije receptora, disocijacije šaperona (Hsp70/90), vezivanja koregulatornih proteina (koaktivatora, korepresora) i fosforilacije receptora. Ligandom aktivirani receptor se vezuje direktno za regulatorne DNK sekvence u okviru promotora ciljnih gena, tzv. ERE elemente (engl. estrogen response elements), i određene komponente vezanog kompleksa interaguju sa bazalnom transkripcionom mašinerijom, stimulišući ili inhibirajući transkripciju (Osborne i Schiff, 2005).

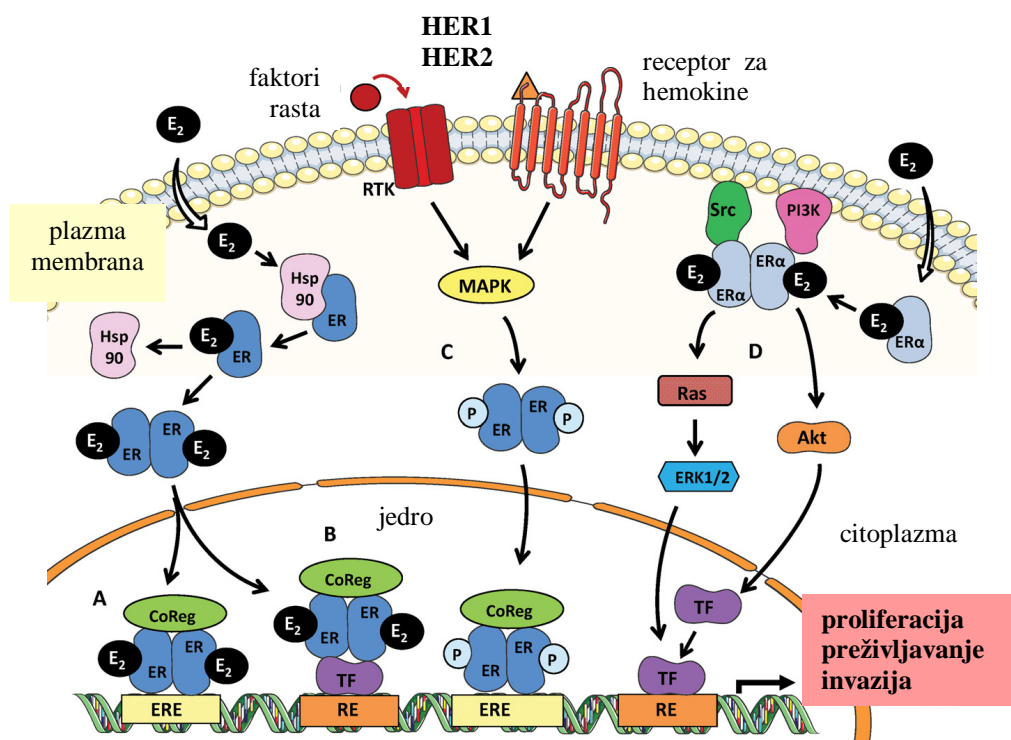
Prema neklasičnom modelu ligand-zavisne aktivacije receptora, ligandom aktivirani receptor se ne vezuje direktno za ERE elemente, već interaguje sa drugim transkripcionim faktorima: Sp1 (engl. Specificity protein 1), AP1 (engl. Activator protein 1) i NFκB (engl. nuclear factor kappa B), koji se direktno vezuju za regulatorne sekvence ciljnih gena (Le Romancer i sar., 2011). Na ovaj način hormonski receptori deluju kao koregulatori (koaktivatori, korepresori) transkripcije, stabilizujući vezivanje drugih kompleksa transkripcionih faktora za odgovarajuće regulatorne sekvence.

Ligand-nezavisna aktivacija receptora podrazumeva aktivaciju receptora i njegovih koregulatora fosforilacijom. Vezivanjem faktora rasta za odgovarajuće membranske receptore tirozinskih kinaza (RTK) kao što su receptori za epidermalne faktore rasta HER1 i HER2, dolazi do aktivacije intraćelijskih kinaznih kaskada od kojih su najznačajnije PI3K/Akt i Ras/MAPK (Clarke i sar., 2004). Aktivirane kinazne kaskade fosforilišu više serinskih i treoninskih ostataka u okviru ligand-nezavisnog (AF1) domena ER. Fosforilisani ER dimerizuje, vezuje se direktno za ERE elemente, regrutuje koaktivatore i stimuliše

transkripciju ciljnih gena. Direktnom fosforilacijom od strane MAPK povećava se aktivnost nekih koaktivatora ER, kao što su p160 i CBP.

Poznati su i tzv. 'brzi' negenomski mehanizmi delovanja koji su posredovani malom frakcijom membranskih steroidnih receptora. Estrogeni preko membranskih receptora ostvaruju brze stimulatorne efekte na veliki broj signalnih proteina. Ligandom aktivirani membranski ER direktno se vezuje za kinaze Src i PI3K i aktivira intraćelijske kinazne kaskade (Src/Ras/MAPK i PI3K/Akt) (slika 2) (Le Romancer i sar., 2011). Estrogenom aktivirani membranski ER interaguje sa receptorima tirozinskih kinaza HER1 i HER2. Ova interakcija, slično aktivaciji receptora tirozinskih kinaza faktorima rasta, aktivira brojne kinazne kaskade. Aktivirane kinazne kaskade indukuju biološke odgovore zavisne/nezavisne od transkripcije (Osborne i Schiff, 2011).

Genomski i negenomski mehanizmi delovanja hormonskih receptora nisu uzajamno isključivi već su komplementarni, sa brojnim uzajamnim interakcijama i konvergiraju ka ćelijskoj proliferaciji i preživljavanju (Le Romancer i sar., 2011).

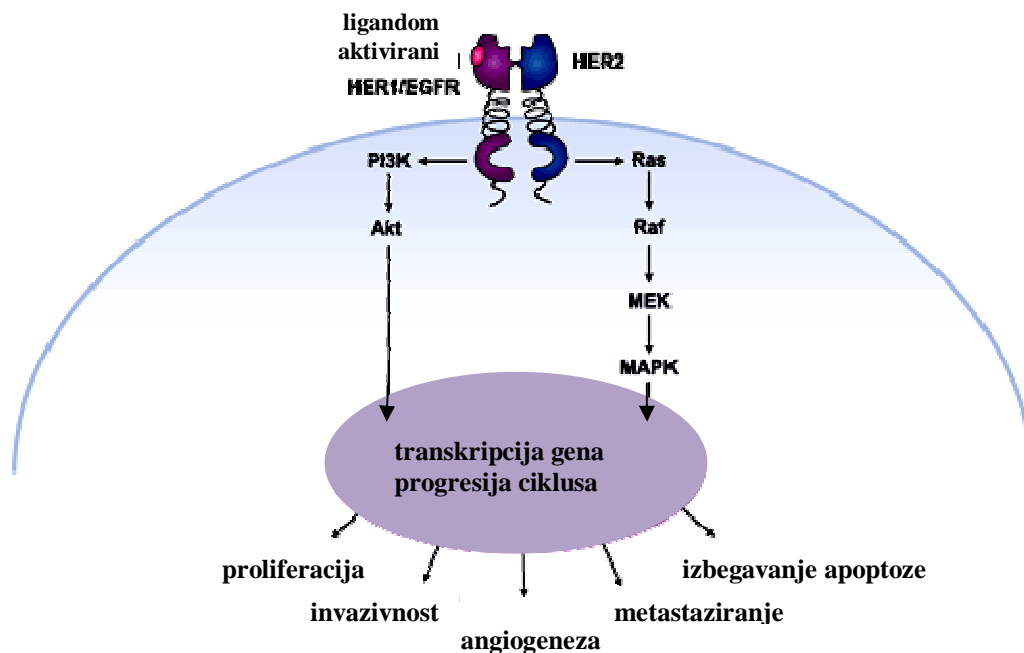


Slika 2. Mehanizmi delovanja hormonskih receptora (preuzeto: Le Romancer i sar., 2011, modifikovano)



### 1.2.2.3. Receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2)

HER2 je transmembranski glikoprotein od 185 kDa koji pripada familiji receptora za epidermalne faktore rasta – EGFR (engl. epidermal growth factor receptor) ili HER (engl. human EGFR related). Kod sisara HER familiju čine 4 receptora: ErbB1 (EGFR/HER1), ErbB2 (HER2/Neu), ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER4), koja su nastala serijom genskih duplikacija rano u evoluciji vertebrata i koji su homologni 40-45% (Stein i Staros, 2000). HER familija pripada klasi receptora tirozinskih kinaza čiji monomeri poseduju N-terminalni ektodomen koji vezuje ligand, transmembranski domen, citoplazmatski katalitički domen (tirozin kinaza) i C-terminalni regulatorni domen (Weinberg, 2007). Aktivacija receptora zahteva prisustvo liganda i dimerizacionog partnera. Familija HER receptora obično vezuje ligande u formi heterodimera. HER2 je jedini receptor iz HER familije za koji ligand nije poznat (Tan i Yu, 2007) što se može objasniti jedinstvenom strukturom ektodomena HER2 koja nije pogodna za vezivanje liganda (Cho i sar., 2003). S obzirom da je ektodomen HER2 uvek u otvorenoj konformaciji, svi receptori iz HER familije preferiraju HER2 kao dimerizacionog partnera (Cho i sar., 2003, Garrett i sar., 2003). HER2 ima jaku tirozin kinaznu aktivnost. Ligandom aktivirani heterodimer aktivira nishodne kinazne kaskade od kojih su najznačajnije PI3K/Akt i Ras/MAPK (Weinberg, 2007). Aktivacija HER2 ima sledeće efekte na ćelije tumora: stimuliše proliferaciju i preživljavanje, povećava ćelijsku pokretljivost i invazivnost, indukuje angiogenezu (slika 3). Ekspresija receptora iz HER familije je povišena kod mnogih tipova humanih tumora. HER2 je prekomerno ekspimiran, uglavnom kao posledica genske amplifikacije, u 20-30% karcinoma dojke (Dowsett i sar., 2000, Weinberg, 2007). Prisustvo amplifikacije HER2 gena (HER2+ status) je generalno povezan sa većom agresivnošću tumora i lošom prognozom pacijentkinja. HER2+ status je prediktor rezistencije na neke vrste konvencionalnih terapija kao što je hormonska terapija (tamoksifen) (Dowsett i sar., 2000).

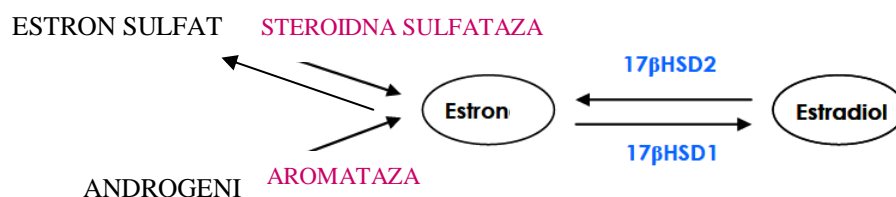


Slika 3. Efekti aktivacije HER2 na ćelije tumora

### 1.3. Hormonska zavisnost karcinoma dojke

Epidemiološke studije su pokazale da rani pubertet, kasna menopauza i hormonska terapija povećavaju rizik od pojave karcinoma dojke, dok rana menopauza i dojenje deluju zaštitno (Beral, 2003). To ukazuje da kumulativno izlaganje steroidnim hormonima, endogenim i egzogenim, povećava rizik za nastanak karcinoma dojke. Primarni estrogen je  $17\beta$ -estradiol koji se kod premenopauzalnih žena sintetishe najvećim delom u jajnicima, a manjim delom u perifernim tkivima (masno tkivo, jetra, mišići, dojka) konverzijom androgena koji su poreklom od jajnika i/ili kore adrenalne žlezde (Vermeulen i sar., 1986). Posle menopauze periferna tkiva postaju predominantna mesta sinteze estrogena. Lokalna sinteza estrogena vrši se konverzijom androgena poreklom od kore adrenalne žlezde u estron aktivnošću enzima aromataze i konverzijom estrona u  $17\beta$ -estradiol aktivnošću enzima  $17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze ( $17\beta$ HSD) (slika 4). Estrogeni se deponuju u formi estron sulfata aktivnošću enzima estron sulfataze. Iako posle menopauze dolazi do drastičnog smanjenja nivoa estradiola u cirkulaciji, nivo estradiola u tkivu dojke se održava na približno istom nivou kao i pre menopauze, i kod postmenopauzalnih žena nivo estrogena u tkivu dojke je 10-20 puta viši nego u cirkulaciji (Vermeulen i sar., 1986). S

obzirom da su neki autori pokazali da je nivo progesterona u cirkulaciji u pozitivnoj korelaciji sa nivoom estradiola u tkivu dojke, progesteron bi mogao regulisati lokalnu sintezu estradiola u tkivu dojke (Dabrosin, 2005). Činjenica da su nivoi estradiola u tumorima dojke viši u odnosu na tkivo dojke, ukazuje da lokalna sinteza estrogena ima ulogu u nastanku i progresiji tumora dojke (Pasqualini i Chetrite, 2005). Pokazano je da aromatizacija *in situ* povećava nivo estradiola i proliferaciju ćelija u tumorima dojke (Yue i sar., 1998), kao i da bi enzim  $17\beta$ HSD mogao biti prognostički marker karcinoma dojke (Gunnarsson i sar., 2005, Jansson i sar., 2006).



Slika 4. Sinteza estrogena u perifernim tkivima

S obzirom da steroidni hormoni imaju primarnu ulogu u normalnom i neoplastičnom razvoju dojke, izvršena je primarna selekcija karcinoma dojke na hormonski zavisne i hormonski nezavisne. Pacijentkinje sa hormonski zavisnim karcinomom dojke bi trebalo da efikasno odgovore na adjuvantnu (postoperativnu) hormonsku terapiju. Ekspresija receptora za estrogen i receptora za progesteron je preduslov hormonske zavisnosti i oko 70% tumora dojke je zavisno od estrogena (ER+) dok je oko 60% ER+ tumora dojke zavisno od progesterona (PR+). Hormonski receptori su do danas ostali jedni od najpouzdanijih parametara prognoze i predikcije ovog karcinoma. Pacijentkinje sa ER+PR+ karcinomom dojke generalno imaju dobru prognozu usled manje agresivnog toka bolesti (Clark i sar., 1983, Dunnwald i sar., 2007), s obzirom da ekspresija hormonskih receptora ukazuje na tumor sa sporijim rastom i manjim metastatskim potencijalom. Istovremeno, hormonski receptori su glavni indikatori predikcije odgovora na hormonsku terapiju. Hormonska terapija je efikasna kod oko 60% pacijentkinja sa ER+ karcinomom dojke, a ako su prisutna oba receptora (ER+PR+) 70-75% pacijentkinja će biti senzitivno na hormonsku terapiju (Brooks i sar., 1980). Sa druge strane, hormonska terapija je efikasna kod samo 10% pacijentkinja sa ER– karcinomom dojke.

### 1.3.1. Hormonska terapija

Hormonska terapija je najefikasniji oblik adjuvantne terapije kod pacijentkinja sa ER+ karcinomom dojke. Hormonska terapija se bazira na antiestrogenima koji se na osnovu hemijske strukture i efekata na ciljna tkiva, mogu podeliti u dve klase – steroidne i nesteroidne antiestrogene. Tamoksifen (Nolvadex) pripada klasi nesteroidnih antiestrogena koji su derivati trifeniletilena. Tamoksifen je selektivni modulator estrogenog receptora (SERM) odnosno ima ulogu estrogena (agonist) u jednim tkivima, dok u drugim tkivima deluje kao antiestrogen (antagonist). Dejstvo tamoksifena se zasniva na kompetitivnoj inhibiciji vezivanja estrogena za ER odnosno inhibiciji ligand zavisne (AF2) funkcije estrogenog receptora. Tamoksifen deluje predominantno kao antagonist u tkivima u kojima dominira AF2 funkcija estrogenog receptora, dok deluje kao agonist u tkivima u kojima dominira AF1 funkcija estrogenog receptora. Tako tamoksifen ima predominantno inhibitorne efekte u tkivu dojke i centralnom nervnom sistemu, dok ima stimulatorne efekte u većini drugih tkiva, npr. uterusu, kardio-vaskularnom sistemu, kostima (Osborne i sar., 2000).

Pozitivni efekti tamoksifena u lečenju karcinoma dojke dokazani su u mnogim studijama, a može se izdvojiti studija koja je obuhvatila 37 000 pacijentkinja sa dijagnozom ranog karcinoma dojke sa sledećim zaključcima (EBCTCG, 1998):

- adjuvantna terapija tamoksifenom je neefikasna kod pacijentkinja sa ER– karcinomom dojke;
- kod pacijentkinja sa ER+ karcinomom dojke terapija tamoksifenom u trajanju od 5 godina efikasno smanjuje rizik od relapsa do 50%;
- terapija tamoksifenom u trajanju od 5 godina mnogo je efikasnija od terapije u trajanju od 2 godine;
- terapija tamoksifenom je efektivnija kod pacijentkinja sa pozitivnim nodalnim statusom (N+).

Najozbiljniji neželjeni efekat terapije tamoksifenom u ovoj studiji bio je posledica njegove stimulatorne aktivnosti u endometrijumu, što je rezultiralo povećanjem stope hiperplazija i kancera endometrijuma (EBCTCG, 1998). Sa druge strane, druge studije su pokazale da adjuvantna terapija tamoksifenom efikasno smanjuje stopu smrtnosti od

koronarne bolesti srca u poznoj dobi (Nordenskjold i sar., 2005) i povećava gustinu kostiju kod postmenopauzalnih žena (Love i sar., 1992).

### 1.3.2. Mehanizmi rezistencije na hormonsku terapiju (tamoksifen)

Oko 70% tumora dojke je zavisno od estrogena (ER+) i selektivni modulatori estrogenog receptora kao što je tamoksifen su danas u širokoj upotrebi za lečenje hormonski zavisnog karcinoma dojke. Međutim efikasnost hormonske terapije je ograničena pojavom rane (*de novo*) i kasne (stečene) rezistencije i čak 50% pacijentkinja sa ER+ karcinomom dojke pokazuje rezistenciju na tamoksifen (Osborne i Schiff, 2011). Kada se govori o ranoj i kasnoj rezistenciji, pre svega ima se u vidu vremenska dimenzija njihove pojave. Rana rezistencija podrazumeva odsustvo inicijalnog odgovora na terapiju, dok se stečena rezistencija razvija u toku terapije nakon inicijalnog perioda odgovora. Stečena rezistencija se može definisati kao adaptivni odgovor ćelija tumora na terapiju (Kurebayashi, 2005).

Do rezistencije dolazi usled disregulacije različitih komponenti signalnih puteva estrogenog receptora i/ili aktivacije alternativnih signalnih puteva preživljavanja ćelija tumora. Primarni mehanizmi rezistencije su (Osborne i Schiff, 2011):

- smanjenje ili gubitak ekspresije estrogenog receptora, i
- prekomerna ekspresija ili hiperaktivacija receptora tirozinskih kinaza (HER1, HER2) i nishodnih kinaznih kaskada.

Poznato je da je ekspresija ER i HER2 u inverznoj relaciji, odnosno da ER negativno reguliše ekspresiju HER2 (Russel i Hung, 1992) i obrnuto. Prekliničke i kliničke studije su pokazale da tumori mogu da alteriraju između signalnih puteva ER i HER2 kao dominantnih i terapija usmerena protiv jednog od njih indukuje reaktivaciju drugog. Tako signalni putevi HER2 mogu da preuzmu dominantnu ulogu u progresiji tumora služeći kao alternativni putevi preživljavanja ćelija tumora, i istovremeno redukujući ekspresiju estrogenog receptora (Osborne i Schiff, 2011).

Do rezistencije dolazi i usled klonalne selekcije, odnosno terapija deluje na senzitivne (ER+) klonove ćelija tumora dok nesenzitivni (ER-) klonovi zaostaju i postaju dominantni (Kurebayashi, 2005, Osborne i Schiff, 2011).

Ligand-nezavisna aktivacija ER takođe ima uticaja na senzitivnost ćelija tumora na estrogene i antiestrogene. Aktivacija receptora tirozinskih kinaza i nishodnih kinaznih kaskada može da poveća agonistička svojstva tamoksifena, jer fosforilacijom ligand-nezavisnog (AF1) domena, ER zadržava transkripcionu aktivnost u prisustvu tamoksifena (Clarke i sar., 2004). Ako je povećana ekspresija koaktivatora ER, ovaj efekat može biti još više potenciran.

Kvantitativne promene kofaktora estrogenog receptora imaju bitan uticaj na razvoj rezistencije. Tako npr. povećana ekspresija i fosforilacija koaktivatora AIB1 (engl. amplified in breast 1) povećava agonističku aktivnost tamoksifena i dovodi do rezistencije (Osborne i sar., 2003). Novije studije su pokazale da ligandom aktivirani ER $\alpha$  može direktno da inhibira transkripciju HER2 gena (Hurtado i sar., 2008). Zapravo, estrogenim receptorom posredovana represija HER2 zavisi od kompeticije između faktora PAX2 i koaktivatora AIB1 za vezivanje za ER. Povećana ekspresija faktora PAX2 dovodi do represije HER2 i efikasnog odgovora na tamoksifen, dok povećana ekspresija koaktivatora AIB1 dovodi do gubitka estrogenim receptorom posredovane represije HER2 i rezistencije na tamoksifen (Hurtado i sar., 2008, Musgrove i Sutherland, 2009).

Tamoksifen inicira i negenomske mehanizme delovanja estrogenog receptora, što takođe može doprineti rezistenciji. S obzirom na interakcije između ligandom-aktiviranog membranskog ER sa receptorima tirozinskih kinaza (HER1, HER2), negenomska signalizacija aktivirana tamoksifenom je pojačana u prisustvu prekomerne ekspresije/hiperaktivacije HER1/2 (Osborne i Schiff, 2011).

Različiti faktori mikrosredine tumora aktiviraju tzv. stresom indukovane kinaze – p38 MAPK, JNK i FAK, koje mogu da modulišu različite komponente signalnih puteva estrogenog receptora, što može dovesti do rezistencije (Osborne i Schiff, 2011). Tako npr. neravnoteža između nekontrolisanog rasta tumora i formiranja krvnih sudova dovodi do smanjenja perfuzije tumora odnosno hipoksije i acidoze i hipoksijom indukovani faktor HIF1 dovodi do proteozomalno-zavisne degradacije ER (Stoner i sar., 2002).

Dakle, fenotipska ekspresija hormonskih receptora nije dovoljna da osigura efikasn timerapeutski odgovor, jer dodatne molekularne alteracije imaju uticaja na senzitivnost ćelija tumora na tamoksifen (Rudas i sar., 2008). Dalju selekciju pacijentkinja sa hormonski

zavisnim karcinomom dojke trebalo bi izvršiti na osnovu dodatnih, selektivnijih biomarkera.

#### **1.4. Potencijalni molekularni biomarkeri prognoze i predikcije**

Iako pacijentkinje sa ER+PR+ karcinomom dojke generalno imaju dobru prognozu usled manje invazivnog i agresivnog toka bolesti, i pored toga su klinički ishod pacijentkinja i odgovor na hormonsku terapiju varijabilni. Interleukin 8 i matriksne metaloproteinaze 2 i 9 su u novije vreme dosta ispitivani kao potencijalni biomarkeri prognoze i predikcije u različitim tipovima humanih kancera.

##### **1.4.1. Interleukin 8 (IL8/CXCL8)**

Citokini su solubilni polipeptidi koji deluju parakrino i autokrino na ćelije koje ekspimiraju receptore za citokine. Hemotaksični citokini (hemokini) se mogu podeliti u više klasa, od kojih su najvažnije klase CC hemokina i CXC hemokina. Kod CXC hemokina između prva dva cisteina na N-terminusu je umetnuta jedna, bilo koja, aminokiselina (AK). ELR+ CXC hemokini imaju Glu-Leu-Arg (ELR) motiv ispred CXC sekvence, odgovorni su za brzu hemoatrakciju neutrofila na mesta inflamacije (Van den Steen i sar., 2003), imaju angiogenezu aktivnost (Strieter i sar., 1995) i deluju kao mitogeni na različite tipove ćelija (Colletti i sar., 1998). Interleukin 8 (IL8) je najpotentniji ELR+ CXC hemokin kod ljudi, sa visokim potencijalom za hemoatrakciju i indukciju angiogeneze (Van den Steen i sar., 2003, Qazi i sar., 2011). ELR- CXC hemokini stimulišu limfocite (Luster, 1998) i imaju angiostatsku aktivnost (Maione i sar., 1990). Geni za CXC hemokine (interleukine) 1-8 locirani su u istom regionu hromozoma 4 dužine 360 Kb, smatra se da pripadaju istom genskom klasteru i da se koekspimiraju (Bieche i sar., 2007). Postoje dve predominantne forme IL8 – forma od 72 AK (6-77) poreklom iz imunoloških ćelija i forma sa 5 dodatnih amino-terminalnih AK (1-77) poreklom iz epitelnih i endotelih ćelija, fibroblasta (Qazi i sar., 2011). IL8 (6-77) forma ima višestruko veću aktivnost na stimulaciju neutrofila.

U odsustvu stimulusa ekspresija IL8 se aktivno održava niskom i u zdravom tkivu IL8 se praktično ne može detektovati (Hoffmann i sar., 2002). U prisustvu stimulusa

aktivirana je ekspresija IL8 na transkripcionom i posttranslacionom nivou. Ekspresija IL8 je stimulirana vrlo različitim faktorima: proinflamatornim citokinima kao što su faktor nekroze tumora (TNF), IL1 i drugi interleukini, bakterijama, virusima, hipoksijom, acidozom, azot oksidom (NO), ćelijskom gustinom, steroidnim hormonima (androgeni, estrogeni) (Xie, 2001, Waugh i Wilson, 2008). Neki stimuli kao što su TNF i IL1 povećavaju ekspresiju IL8 preko 100 puta (Hoffmann i sar., 2002). Do maksimalne ekspresije IL8 dolazi usled: derepresije promotora gena za IL8, aktivacije transkripcionih faktora koji indukuju transkripciju gena za IL8 i stabilizacije IL8 iRNK (Hoffmann i sar., 2002). Ekspresija IL8 je primarno regulisana transkripcionim faktorima NF $\kappa$ B, AP1 i NF-IL6, ali su u okviru promotora gena za IL8 prisutne i dodatne regulatorne sekvence, tzv. HRE elementi (engl. hormone response elements) (Waugh i Wilson, 2008).

Biološki efekti interleukina 8 i drugih ELR+ CXC hemokina su posredovani membranskim G protein-kuplovanim receptorima – CXCR1 i CXCR2. Vezivanjem liganda za CXCR1/CXCR2 moguća je aktivacija više signalnih kaskada (Waugh i Wilson, 2008):

- PI3K/Akt kinazne kaskade; fosfatidilinozitol 3 kinaza (PI3K) indukuje konverziju membranskog fosfatidilinozitol 4,5-bifosfata (PIP2) u fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP3) koji aktivira serin/treonin kinazu B (PKB/Akt);
- klasične MAPK (engl. mitogen-activated protein kinase) kinazne kaskade koja se sastoji od više serin/treonin kinaza a počinje RasGTPazom; može biti aktivirana direktno PI3K kinazom ili indirektno, preko transaktivacije receptora tirozinskih kinaza EGFR;
- aktivacija stresom indukovane p38 MAPK kinazne kaskade;
- aktivacija fosfolipaze C (PLC) koja indukuje konverziju PIP2 u inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG); IP3 mobilize kalcijum iz intraćelijskih depoa a DAG aktivira protein kinazu C (PKC);
- transaktivacija receptora tirozinskih kinaza EGFR i VEGFR preko G proteina;
- aktivacija tirozinskih kinaza Src i JAK (engl. Janus-activated kinase);
- aktivacija RhoGTPaza koje su važni regulatori aktinskog citoskeleta, često preko tirozinskih kinaza Src i FAK (engl. focal adhesion kinase).

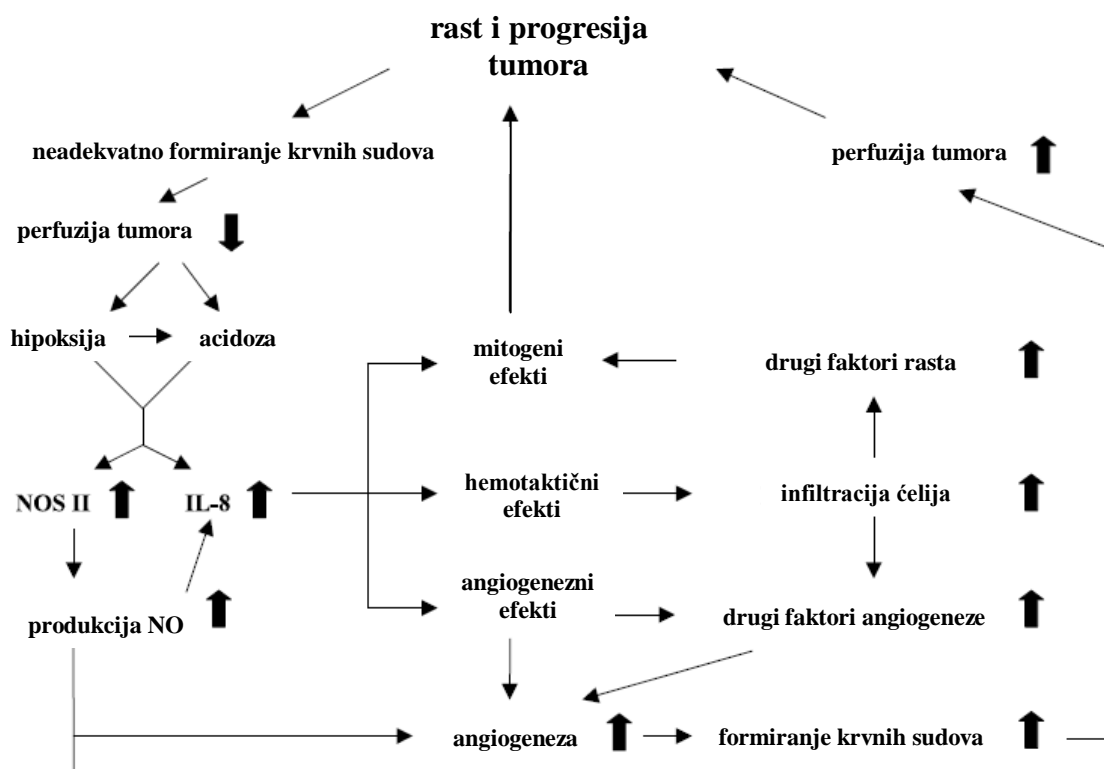


Aktivirane signalne kaskade dovode do aktivacije više transkripcionih faktora – AP1, NFκB, AR (engl. androgen receptor), HIF1, β-katenin i STAT3, što ima sledeće efekte na CXCR1+/CXCR2+ ćelije: stimuliše proliferaciju i preživljavanje, povećava ćelijsku pokretljivost i invazivnost, indukuje angiogenezu (Waugh i Wilson, 2008).

Poznato je da je IL8 medijator urođene imunosti. IL8 sekretuju imunološke ćelije koje kao komponente urođene imunosti obavljaju fagocitozu – neutrofili i monociti/makrofazi. Stimulisani fagociti sekretuju citokine, hemokine, enzime i druge antimikrobne molekule, faktore rasta, faktore angiogeneze i proteaze sa ciljem da se remodeluje oštećeno tkivo i zameni novim (Abbas, 2006). Povećana ekspresija IL8 je karakteristična za hronična inflamatorna stanja i različite tipove humanih kancera. Različiti faktori mikrosredine tumora kao i sami hemoterapeutski agensi, indukuju u ćelijama tumora povećanu sintezu i sekreciju IL8 (Waugh i Wilson, 2008). Sekretovani IL8 bitno utiče na mikrosredinu tumora posredstvom CXCR1/CXCR2 receptora eksprimiranih od strane ćelija tumora, endotelnih ćelija, neutrofila i monocita/makrofaga (slika 5). Delujući autokrino i parakrino, IL8 stimuliše proliferaciju, preživljavanje/hemorezistenciju, pokretljivost i invazivnost ćelija tumora. Dodatno, IL8 stimuliše proliferaciju, preživljavanje i migraciju endotelnih ćelija koje i same sintetišu i sekretuju IL8. Na taj način IL8 deluje kao vrlo potentan faktor angiogeneze. IL8 indukuje hemotaksičnu infiltraciju neutrofila i monocita/makrofaga na mesto tumora, koji sa svoje strane produkuju faktore rasta, faktore angiogeneze i proteaze, što takođe doprinosi angiogenezi, rastu i progresiji tumora (Xie, 2001, Waugh i Wilson, 2008).

Novija istraživanja su ukazala na važnost fenomena epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) u procesu progresije tumora. Više autora je ukazalo na važnost IL8 u inicijaciji i/ili održanju mezenhimalnih i invazivnih karakteristika ćelija tumora, koje bi mogle biti terapeutski eliminisane upravo blokiranjem IL8 i/ili CXCR1/CXCR2 (Fernando i sar., 2011, Mohamed, 2012). Novija istraživanja su takođe ukazala na važnost IL8/CXCR1 signalizacije u samoobnavljanju i održanju fenotipskih i funkcionalnih karakteristika kancerskih stem ćelija dojke. Analize genskih ekspresionih profila su pokazale da je CXCR1 marker kancerskih stem ćelija dojke (Charafe-Jauffret i sar., 2009). Na osnovu *in vitro* istraživanja i *in vivo* mišijih modela, Ginestier i saradnici su zaključili

da bi hemoterapija u kombinaciji sa inhibicijom CXCR1 receptora bila efikasnija u lečenju karcinoma dojke. Razvoj hemorezistencije podrazumeva izmene genskih ekspresionih profila ćelija tumora i one u odgovoru na hemoterapiju sekretuju brojne signalne molekule kao što su IL8 i proapoptotski faktori. Delujući parakrino preko CXCR1 na stem ćelijama, IL8 stimuliše ekspresiju gena uključenih u samoobnavljanje i preživljavanje stem ćelija i istovremeno blokira delovanje proapoptotskih faktora na stem ćelije, odnosno one postaju hemorezistentne. Inhibicijom CXCR1 antitelom ili repariksinom, onemogućeno je samoobnavljanje i preživljavanje stem ćelija, i u kombinaciji sa hemoterapijom onemogućena je hemorezistencija stem ćelija (Ginestier i sar., 2010).



Slika 5. Uloga IL8 u rastu i progresiji tumora (preuzeto: Xie, 2001, modifikovano). Neravnoteža između nekontrolisanog rasta tumora i formiranja krvnih sudova dovodi do smanjenja perfuzije tumora odnosno hipoksije, acidoze i hiperprodukcije azot oksida (NO). NO deluje kao vazodilatator i indukuje angiogenezu, čime se povećava perfuzija tumora. Hipoksija, acidoza i NO indukuju ekspresiju gena za IL8 u ćelijama tumora i endotelnim ćelijama. Delujući autokrino i parakrino, IL8 doprinosi rastu i progresiji tumora direktno – kao mitogeni i angiogenezni faktor i indirektno – preko hemotaksične infiltracije neutrofila i monocita/makrofaga na mesto tumora, koji i sami produkuju faktore rasta, faktore angiogeneze i proteaze.

### 1.4.2. Matriksne metaloproteinaze 2 i 9 (MMP2, MMP9)

Familija matriksnih metaloproteinaza se sastoji od najmanje 23 strukturno srodnih, zink-zavisnih endopeptidaza. Za ovu familiju su karakteristični specifični funkcionalni i strukturni domeni: N-terminalni signalni peptid za sekreciju, propeptid za latenciju enzima, katalitički domen sa visoko konzerviranim zink-vezujućim mestom i C-terminalni hemopeksinski domen (PEX) (Kessenbrock i sar., 2010, Klein i Bischoff, 2011). PEX domen vezuje endogene tkivne inhibitore matriksnih metaloproteinaza (TIMP) i neke supstrate i učestvuje u aktivaciji enzima. Za većinu matriksnih metaloproteinaza, supstratna specifičnost *in vivo* nije potpuno definisana. Matriksne metaloproteinaze mogu biti usidrene u membranu ili sekretovane u vanćelijski matriks u formi latentnih proenzima. Kolagenaze, gelatinaze, stromelizini, matrilizini i druge grupe matriksnih metaloproteinaza su sekretovane u vanćelijski matriks. Matriksne metaloproteinaze 2 i 9 pripadaju grupi gelatinaza za koju je karakterističan kolagen-vezujući domen u okviru katalitičkog domena. Kolagen-vezujući domen sadrži cisteinom bogate sekvence i vezuje različite supstrate, pre svega kolagene i gelatin (denaturisani kolagen). Aktivnost enzima je regulisana: na nivou transkripcije, na nivou proteolitičke aktivacije latentnog proenzima i na nivou inhibicije aktivnog enzima. MMP2 se konstitutivno eksprimira i proinflamatorni stimuli nemaju uticaja na ekspresiju MMP2 s obzirom da gen za MMP2 (za razliku od gena za MMP9) ne poseduje vezujuća mesta za proinflamatorne transkripcione faktore npr. AP1 (Templeton i Stetler-Stevenson, 1991). MMP9 se konstitutivno eksprimira samo u neutrofilima gde je deponovan u granulama, i nakon stimulacije neutrofila sadržaj granula se oslobađa u vanćelijski matriks (Devarajan i sar., 1992). U drugim tipovima ćelija kao što su epitelne i endotelne ćelije, ekspresija MMP9 je inducibilna i proinflamatorni i drugi stimuli indukuju ekspresiju gena za MMP9 (Opdenakker i sar., 1991). MMP9 iz neutrofila, za razliku od MMP9 iz drugih tipova ćelija, formira kovalentni kompleks sa lipokalinom (Kjeldsen i sar., 1993).

Predominantni put aktivacije proMMP2 (Mr 72 kDa) u slobodnu aktivnu MMP2 (Mr 64 kDa) podrazumeva formiranje kompleksa sa TIMP2 i taj kompleks je supstrat za membransku MMP14 koja proteolizom uklanja prodomen (Deryugina i sar., 2001). Proces je pomognut slobodnom aktivnom MMP2. Ako je koncentracija TIMP2 previsoka,

membranska MMP14 i slobodna aktivna MMP2 biće inaktivisani. ProMMP2 može biti aktivirana i drugim matriksnim metaloproteinazama i nekim serin proteazama plazme – trombinom i aktiviranim proteinom C (APC) (Nguyen i sar., 2000). Aktivacija proMMP9 (Mr 92 kDa) u slobodnu aktivnu MMP9 (Mr 83 kDa) podrazumeva uklanjanje prodomena drugim matriksnim metaloproteinazama (između ostalih i matriksnom metaloproteinazom 2) i nekim serin proteazama – plazminom i tripsinom (Klein i Bischoff, 2011). Aktivacija proMMP9 može biti i direktna posledica oksidativnog stresa (Maeda i sar., 1998). Aktivne matriksne metaloproteinaze inhibira više endogenih inhibitora, od kojih su najvažniji tkivni inhibitori matriksnih metaloproteinaza (TIMP) koji se vezuju za aktivni enzim u odnosu 1:1 i reverzibilno blokiraju aktivnost svih matriksnih metaloproteinaza. MMP2 primarno inhibira TIMP2, dok MMP9 primarno inhibira TIMP1.

U tabeli 1. su prikazani poznati supstrati matriksnih metaloproteinaza 2 i 9. S obzirom da degraduju različite komponente bazalnih membrana i vanćelijskog matriksa, matriksne metaloproteinaze 2 i 9 imaju važnu efektornu ulogu u migraciji različitih tipova ćelija. Matriksne metaloproteinaze 2 i 9 deluju stimulatorno na rast i invazivnost tumora, dok efekat na angiogenezu i inflamaciju može biti i stimulatoran i inhibitoran (slika 6). Matriksne metaloproteinaze 2 i 9 proteolitički aktiviraju/inaktiviraju (Bauvois, 2012):

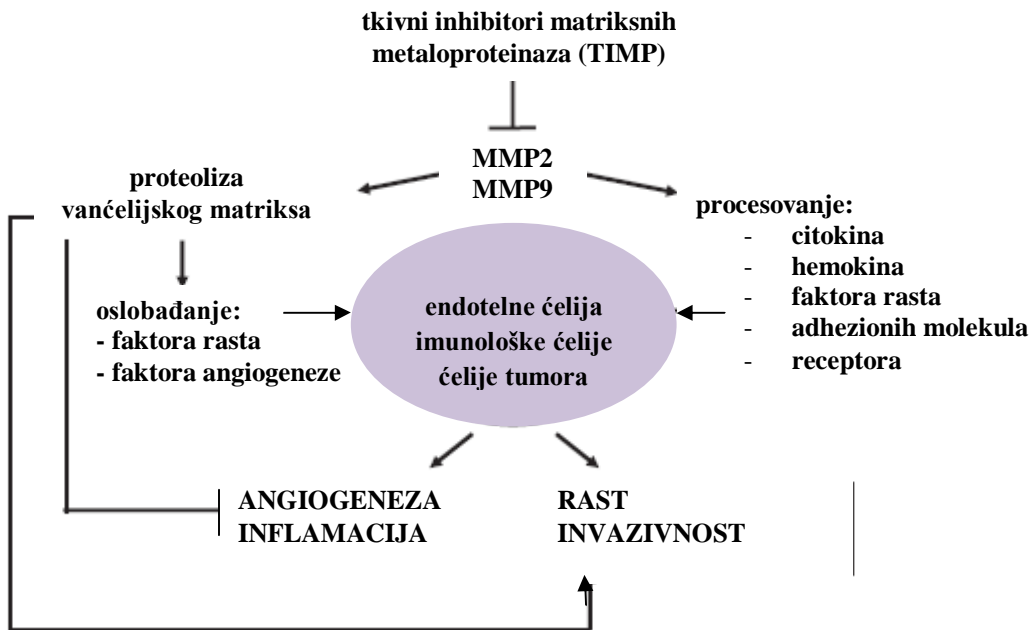
- signalne proteine – citokine, hemokine i faktore rasta, koji deluju autokrino i parakrino na različite tipove ćelija – epitelne i endotelne ćelije, imunološke ćelije;
- membranske proteine – receptore za citokine/faktore rasta i adhezione molekule na pomenutim tipovima ćelija.

Proteolizom različitih komponenti vanćelijskog matriksa, matriksne metaloproteinaze 2 i 9 oslobađaju iz matriksa aktivne forme: citokina, hemokina, faktora rasta, faktora angiogeneze, inhibitora angiogeneze, proinflamatornih i antiinflamatornih faktora (Bauvois, 2012). Tako npr. MMP9 degraduje komponente vaskularne bazalne membrane i oslobađa iz matriksa aktivne forme vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), transformišućeg faktora rasta (TGF $\beta$ ) i baznog faktora rasta fibroblasta (FGF2), koji stimulišu angiogenezu, rast i invazivnost tumora (Bergers i sar., 2000, Yu i Stamenkovic, 2000, Ardi i sar., 2009). Kao što je pomenuto, matriksne metaloproteinaze 2 i 9 mogu delovati i inhibitorno na angiogenezu tako što proteolizom različitih tipova kolagena oslobađaju iz matriksa

inhibitore angiogeneze – tumstatin i endostatin (Hamano i sar., 2003, Heljasvaara i sar., 2005). Novije *in vitro* studije su pokazale da različita aktivaciona stanja MMP2 imaju suprotne efekte na sudbinu endotelih ćelija. Potpuno aktivne forme MMP2 indukuju apoptozu endotelih ćelija što inhibira angiogenezu, dok intermedijarno aktivirane forme MMP2 u kompleksu sa membranskim MMP14 stimulišu preživljavanje endotelih ćelija i na taj način indukuju angiogenezu (Shapiro i sar., 2010). Matriksne metaloproteinaze 2 i 9 mogu delovati stimulatorno i inhibitorno na inflamaciju. Tako npr. MMP2 pospešuje inflamaciju tako što oslobađa iz matriksa aktivne forme proinflamatornih medijatora npr. IL1 $\beta$  (Schonbeck i sar., 1998), a inhibira inflamaciju tako što proteolizom inaktivira hemoatraktante kao što je hemokin CCL7 (McQuibban i sar., 2002).

Dakle, pored efektorne uloge matriksne metaloproteinaze 2 i 9 imaju i važne regulatorne uloge s obzirom da proteolizom regulišu aktivnost citokina i hemokina. MMP9 dovodi do povećane aktivnosti CXC hemokina 8 i 11, kao i do inaktivacije CXC hemokina 1, 4, 9 i 12 (Van den Steen i sar., 2000). MMP9 proteolizom citokina interferona  $\beta$  inhibira njegovu antiviralnu aktivnost, što ga čini pogodnom metom za imunoterapiju (Nelissen i sar., 2003). MMP9 suprimira proliferaciju T limfocita inhibicijom limfocitnog receptora IL2R $\alpha$  što može predstavljati mehanizam kancerom posredovane imunosupresije (Sheu i sar., 2001).

Dodatno, matriksne metaloproteinaze 2 i 9 asocirane na površini različitih tipova ćelija imaju i važne ne-enzimske uloge odnosno iniciraju transdukciju signala. Novija istraživanja na ćelijskim linijama karcinoma dojke su pokazala da se matriksne metaloproteinaze 2 i 9 vezuju za različite tipove membranskih integrina i CD44 adhezioni receptor preko katalitičkog i PEX domena i na taj način aktiviraju signalne puteve koji kontrolišu ćelijsko preživljavanje, ćelijsku pokretljivost i angiogenezu (Bauvois, 2012).



Slika 6. Uloge matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u rastu i progresiji tumora

(preuzeto: Bauvois, 2012, modifikovano)

stimulacija: → inhibicija: —|

**tabela 1. supstrati matriksnih metaloproteinaza 2 i 9**  
(preuzeto: Bauvois, 2012, modifikovano)

	<b>MMP2</b>	<b>MMP9</b>
<b>supstrati vanćelijskog matriksa</b>	kolageni I, IV, V, VII, X, XI gelatin tenascin elastin fibronektin laminin5	kolageni III, IV, V gelatin elastin vitronektin entaktin
<b>drugi supstrati</b>	proTGF $\beta$ proTNF $\alpha$ proIL1 $\beta$ proHB-EGF FGFR1 IGFBP 3,5,7 CXCL12 (SDF1) CCL7 (MCP3) CX3CL1 (fraktalin) KiSS1 tumor supresor	proTGF $\beta$ proTNF $\alpha$ IL-2R $\alpha$ ICAM1 EGFR1 Kit ligand CXCL1 (GRO $\alpha$ ) CXCL4 (PF4) CXCL8 (IL8) CXCL9 (MIG) CXCL11 (ITAC) CXCL12 (SDF1) CCL7 (MCP3) inhibitor proteinaze $\alpha$ 1 plazminogen KiSS1 tumor supresor IFN $\beta$

Legenda: TGF, transformišući faktor rasta; TNF, faktor nekroze tumora; IL, interleukin; IL-R, interleukinski receptor; HB-EGF, heparin-vezujući epidermalni faktor rasta; FGFR, receptor za faktor rasta fibroblasta; IGFBP, insulinski faktor rasta-vezujući protein; SDF, stromalni faktor (engl. stromal cell derived factor); MCP, monocitni hemotaksični protein (engl. monocyte chemoattractant protein); ICAM, intercelularni adhezioni molekul; EGFR, receptor za epidermalni faktor rasta; GRO, onkogen rasta (engl. growth related oncogene); PF, trombocitni faktor (engl. platelet factor); MIG, interferonom  $\gamma$ -indukovan monokin (engl. monokine induced by interferon  $\gamma$ ); ITAC, interferonom  $\gamma$ -indukovan T-ćelijski hemokin (engl. IFN $\gamma$ -induced T cell-activated chemokine); IFN, interferon.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**



Ciljevi istraživanja su bili:

- da se ispita prognostički značaj kliničko-patoloških parametara karcinoma dojke i odabranih biomarkera (IL8, MMP2, MMP9) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju;
- da se ispita prediktivni značaj (efikasnost ili rezistencija) kliničko-patoloških parametara karcinoma dojke i odabranih biomarkera (IL8, MMP2, MMP9) kod pacijentkinja koje su primale adjuvantnu hormonsku terapiju tj. tamoksifen;
- da se proceni da li i na koji način interakcije između ER, PR i HER2 kao glavnih determinanti karcinoma dojke, imaju uticaja na ekspresiju odabranih biomarkera (IL8, MMP2, MMP9);
- da se proceni eventualno postojanje sprege između odabranih biomarkera (IL8, MMP2, MMP9), što bi moglo doprineti razumevanju progresije hormonski zavisnog karcinoma dojke i objašnjenju rezistencije na hormonsku terapiju.

### **3. MATERIYAL I METODE**

### **3.1. STUDIJSKA GRUPA**

U studiju je bilo uključeno 150 postmenopauzalnih pacijentkinja sa primarnim operabilnim karcinomom dojke (klinički stadijum I/II) i detektabilnim nivoima hormonskih receptora (ER>0, PR>0) što bi trebalo da ukazuje na hormonski zavisni karcinom dojke. Sve pacijentkinje su operisane na Institutu za Onkologiju i Radiologiju Srbije (IORS). Nakon operacije histološki uzorci tumora su pregledani od strane patologa i klasifikovani po kriterijumima AJCC/UICC (American Joint Committee on Cancer / Union for International Cancer Control) za TNM status i histopatološki tip, i deo tumora je postoperativno zamrznut u tečnom azotu. Podaci o kliničko-patološkim parametrima pacijentkinja: godinama i statusu menopauze, nodalnom statusu, veličini tumora, histopatološkom tipu tumora, gradusu tumora i kliničkom stadijumu bolesti, dobijeni su iz istorija bolesti pacijentkinja uz konsultacije lekara interniste i patologa IORS-a.

Pacijentkinje sa povoljnim kliničko-patološkim parametrima (negativni nodalni status) postoperativno nisu primale terapiju, prema u to vreme važećem protokolu. S obzirom na odsustvo adjuvantne terapije, kod ovih pacijentkinja smo mogli da pratimo tzv. prirodni tok bolesti odnosno tok bolesti na koji nije uticala adjuvantna terapija. Na osnovu prirodnog toka bolesti pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju, analizirali smo prognostički značaj odabranih biomarkera. Ostale pacijentkinje, pretežno sa pozitivnim nodalnim statusom (N+), su primale adjuvantnu hormonsku terapiju tj. tamoksifen i kod njih smo mogli da pratimo odgovor na hormonsku terapiju, tzv. klinički tok bolesti. Na osnovu kliničkog toka bolesti pacijentkinja koje su primale tamoksifen, analizirali smo prediktivni značaj (efikasnost ili rezistencija za terapiju tamoksifenom) odabranih biomarkera. Tok bolesti pacijentkinja je praćen do ponovnog javljanja bolesti tj. do pojave relapsa.

**Etički aspekti.** Izvođenje ove studije je odobreno od strane Etičkog odbora IORS-a.

U tabeli 2. je prikazana raspodela pacijentkinja na osnovu dostupnih kliničko-patoloških parametara.

Tabela 2. Raspodela pacijentkinja prema kliničko-patološkim parametrima

<i>kliničko-patološki parametri</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
godine (medijana)		
≤ 63	79	52,7
> 63	71	47,3
nema podataka	0	0
veličina tumora		
pT1 (T < 2 cm)	80	53,4
pT2 (T ≥ 2 cm)	65	43,3
nema podataka	5	3,3
nodalni status <sup>1)</sup>		
N0	102	68
N+	36	24
nema podataka	12	8
histopatološki tip tumora <sup>2)</sup>		
IDC	63	42
ILC	48	32
ostali	37	24,7
nema podataka	2	1,3
histološki gradus tumora <sup>3)</sup>		
G1	17	11,3
G2	119	79,3
G3	13	8,7
nema podataka	1	0,7
ER status <sup>4)</sup>		
ER–	36	24
ER+	114	76
nema podataka	0	0
PR status <sup>5)</sup>		
PR–	100	66,7
PR+	50	33,3
nema podataka	0	0
HER2 status <sup>6)</sup>		
HER2–	100	66,7
HER2+	34	22,7
nema podataka	16	10,6

n, broj pacijentkinja;

<sup>1)</sup> nodalni status:

N0, odsustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima;

N+, prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima;

<sup>2)</sup> histopatološki tip tumora:

IDC, invazivni duktalni karcinom; ILC, invazivni lobularni karcinom;

<sup>3)</sup> histološki gradus:

gradus G1, odgovara dobro diferentovanim i nisko proliferativnim tumorima;

gradus G3, odgovara slabo diferentovanim i izrazito proliferativnim tumorima;

gradus G2, svi ostali slučajevi između G1 i G3 kategorije;

<sup>4)</sup> ER status: ER–, ER < 10 fmol/mg proteina; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg proteina;

<sup>5)</sup> PR status: PR–, PR < 20 fmol/mg proteina; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg proteina;

<sup>6)</sup> HER2 status: HER2–, odsustvo amplifikacije HER2 gena; HER2+, prisustvo amplifikacije HER2 gena.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Homogenizacija tkiva tumora i izdvajanje citosolne frakcije

Uzorak tumora (postoperativno zamrznut u tečnom azotu) smo na temperaturi tečnog azota mehanički isitnili i zatim homogenizovali u fosfatnom puferu, pH 7,4–7,7, ( $5 \times 10^{-3}$  fosfatni pufer, 20% glicerol, 1mM monotioglicerol i 1,5 mM EDTA, finalno) u homogenizatoru na temperaturi 0–4°C. Dobijenu suspenziju smo prebacili u fosfatni pufer istog sastava, na temperaturi ledenog kupatila i zatim centrifugirali na 800–1000 g na +4°C, tokom 30 min. Na ovaj način smo dobili grubi jedarni talog na dnu i neprečišćenu frakciju citosola u supernatantu. Sledi ultracentrifugiranje supernatanta na 100 000 g, na +4°C, 60 min, (ultracentrifuga Beckman L5-50) pri čemu smo dobili membransku frakciju u talogu i citosolnu frakciju u supernatantu. Citosolna frakcija se koristi za određivanje koncentracija hormonskih receptora (ER, PR) i odabranih biomarkera (IL8, MMP2, MMP9).

### 3.2.2. Određivanje koncentracije interleukina 8 u citosolnoj frakciji homogenata tkiva tumora ELISA esejem

U izdvojenoj citosolnoj frakciji smo odredili koncentracije IL8 imunoesejem ELISA (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Koristili smo *RayBio® Human IL8 ELISA Kit (SAD)* koji se zasniva:

1. na reakciji između IL8 iz uzorka i antitela na IL8 koje je imobilisano na mikroploči (engl. microplate) i

2. na reakciji između detekcionog antitela na IL8 obeleženog biotinom i streptavidina konjugovanog sa peroksidazom rena (engl. horse radish peroxidase, HRP).

Detekcija se zasniva na bojenoj reakciji između hromogenog supstrata – tetrametilbenzidina (TMB) i peroksidaze rena, pri čemu se razvija boja srazmerno količini vezanog IL8. Odmah po zaustavljanju bojene reakcije meri se apsorbanca na talasnoj dužini od 450 nm.

### **3.2.2.1. Priprema reagenasa, standarda i uzoraka za ELISA esej**

Prema instrukcijama u protokolu smo pripremili sve reagense, standarde i uzorke. Reagens D (engl. Sample Diluent Buffer) za razblaživanje standarda i uzoraka i reagens E (engl. Assay Diluent) za razblaživanje detekcionog antitela i HRP-streptavidin konjugata, smo pre upotrebe razblažili 5x u dH<sub>2</sub>O. Svaki uzorak citosolne frakcije homogenata tkiva tumora smo razblažili najmanje 5x u prethodno pripremljenom reagensu D. Razblaženje uzorka zavisi od koncentracije ukupnih proteina citosola (za veće koncentracije ukupnih proteina smo pravili veća razblaženja). Dodavanjem 800 µL pripremljenog reagensa D u vaju sa rekombinantnim humanim IL8 (reagens C, prethodno kratko spinovati vaju) dobili smo standard koncentracije 50 ng/mL (puder smo rastvorili blagim mešanjem). Ovaj standard smo koristili za pravljenje serije razblaženja standarda (koncentracije: 600, 200, 66.7, 22.2, 7.4, 2.5, 0.8 pg/mL). Puffer za ispiranje (reagens B) smo razblažili 20x u dH<sub>2</sub>O. Dodavanjem 100 µL pripremljenog reagensa E u vaju sa detekcionim antitelom (reagens F, prethodno kratko spinovati vaju) dobili smo koncentrovani rastvor detekcionog antitela (može se čuvati 5 dana na +4°C) koji smo pre upotrebe razblažili 80x u istom reagensu E. HRP-streptavidin konjugat (reagens G, prethodno kratko spinovati vaju) smo razblažili 30 000x u istom reagensu E.

### **3.2.2.2. Procedura ELISA eseja**

Prethodno pripremljene standarde i uzorke smo naneli na mikroploču u duplikatu (mikroploča sa 96 bunarića u kojima su imobilisana antitetela na IL8). Naneli smo po 100 µL svakog standarda i uzorka u odgovarajuće bunariće na mikroploči, mikroploču smo pokrili folijom i inkubirali 2,5h na sobnoj temperaturi uz blago mešanje na šejkeru. Nakon

ispiranja mikroploče 4x sa pripremljenim rastvorom za ispiranje, u svaki bunarić smo naneli po 100  $\mu$ L prethodno pripremljenog rastvora detekcionog antitela i inkubirali smo 1h na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Nakon ispiranja mikroploče (sa rastvorom za ispiranje, 4x) u svaki bunarić smo naneli po 100  $\mu$ L prethodno pripremljenog rastvora HRP-streptavidin konjugata, i inkubirali smo 45 min na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Nakon ispiranja mikroploče (sa rastvorom za ispiranje, 4x) u svaki bunarić smo naneli po 100  $\mu$ L reagensa supstrata TMB (reagens H, engl. TMB One-Step Substrate Reagent), mikroploču smo pokrili folijom i inkubirali 30 min na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Nakon nanošenja po 50  $\mu$ L reagensa I koji zaustavlja reakciju (2M sulfuronska kiselina, engl. Stop Solution), odmah smo očitali apsorbance na talasnoj dužini od 450 nm. Izračunali smo srednju vrednost apsorbance za svaki duplikat standarda, kontrola i uzoraka, od koje smo oduzeli srednju vrednost apsorbance nultog standarda. Konstruisali smo standardnu krivu na log-log papiru i pomoću Sigma Plot softvera. Koncentracije IL8 očitane sa standardne krive su korigovane za korišćena razblaženja. Koncentracije IL8 su izražene u pg/mg ukupnih proteina citosola.

### **3.2.3. Određivanje koncentracije matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u citosolnoj frakciji homogenata tkiva tumora ELISA esejem**

U izdvojenoj citosolnoj frakciji smo odredili koncentracije matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 imunoesejem ELISA. Koristili smo *Quantikine® Human MMP2 Immunoassay* i *Quantikine® Human MMP9 Immunoassay* kitove (SAD). Eseji se zasnivaju na reakciji između MMP 2/9 iz uzorka i antitela na MMP 2/9 koje je imobilisano na mikroploči, dok je detekciono antitelo na MMP 2/9 konjugovano sa peroksidazom rena. Detekcija se zasniva na bojenoj reakciji između hromogenog supstrata – tetrametilbenzidina (TMB) i peroksidaze rena (HRP), pri čemu se razvija boja srazmerno količini vezanog MMP 2/9. Odmah po zaustavljanju bojene reakcije meri se apsorbance na talasnoj dužini od 450 nm. Eseji podrazumevaju pripremu svih reagenasa, standarda i uzoraka prema instrukcijama u protokolu. Nakon procedure eseja i očitavanja apsorbanci, konstruisane su standardne krive sa kojih su očitane koncentracije matriksnih

metaloproteinaza 2 i 9 i izvršene neophodne korekcije. Koncentracije matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 su izražene u ng/mg ukupnih proteina citosola.

### **3.2.4. Detekcija amplifikacije HER2 gena na presecima tkiva tumora hromogenom *in situ* hibridizacijom (CISH metoda)**

HER2 status (odsustvo ili prisustvo amplifikacije HER2 gena) smo odredili na presecima tkiva tumora hromogenom *in situ* hibridizacijom (CISH). CISH metoda se zasniva na hibridizaciji visoko specifične oligonukleotidne HER2 probe obeležene digoksinom i komplementarne sekvence (HER2 gen) u uzorku *in situ*. Tkivo tumora je fiksirano u formalinu 12-24h pre kalupljenja u parafinske blokove. Iz parafinskih blokova seku se tkivni preseki tumora debljine 4  $\mu\text{m}$  i lepe na SuperFrost Plus mikroskopske pločice. Nakon sušenja 2h na 60°C i prekonoćne inkubacije na 37°C, tkivni preseki tumora su spremni za sam postupak hromogene *in situ* hibridizacije za koji smo koristili *Invitrogen SPOT-Light® HER2 CISH Kit (SAD)*.

#### **3.2.4.1. Procedura hromogene *in situ* hibridizacije**

Deparafinaciju tkivnih preseka smo izvršili potapanjem u ksilol (2 puta po 5 min), pa u apsolutni etanol (3 puta po 3 min). Nakon ispiranja tkivnih preseka u dejonizovanoj vodi, dH<sub>2</sub>O (3 puta po 2 min), izvršili smo pretretman toplotom koji podrazumeva kuvanje tkivnih preseka u reagensu A (engl. Heat Pretreatment Solution) na temperaturi  $\geq 98$  °C u trajanju od 15 min. Nakon ispiranja u dH<sub>2</sub>O (3 puta po 2 min), pločice smo posušili filter papirom i stavili u posudu za inkubaciju. Pretretman enzimom smo izvršili tako što smo na svaki tkivni presek naneli po nekoliko kapi enzima (reagens B, engl. Enzyme Pretreatment Reagent). Posudu smo zatvorili i inkubirali 5-10 min na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u dH<sub>2</sub>O (3 puta po 2 min), izvršili smo dehidraciju tkivnih preseka u seriji etanola rastućih koncentracija (70%, 85%, 95% i 2 puta u apsolutnom etanolu), po 2 min u svakom rastvoru. Nakon sušenja pločica na vazduhu ( $\geq 20$  minuta), izvršili smo proces denaturacije i hibridizacije na sledeći način. Na svaki tkivni presek smo naneli 10-20  $\mu\text{L}$  HER2 probe (reagens C), u zavisnosti od veličine preseka. Tkivni presek smo prekrili pokrovnim staklom (engl. coverslip) tako da se HER2 proba ravnomerno razlije po preseku.



Zaostale mehuriće vazduha smo istisnuli pincetom, pri čemu smo vodili računa da pincetom ne dodirujemo sam tkivni presek. Svaku pločicu sa pokrovnim staklom smo prelepili selotejpom kako bi sprečili isparavanje u toku inkubacije. Sve prelepljene pločice smo stavili na zagrejanu hibridizacionu ploču (engl. heating block) na kojoj se vrši denaturacija na temperaturi od 94-96 °C u trajanju od 5 min. Nakon denaturacije, pločice se stave u posudu za inkubiranje i inkubiraju se preko noći u inkubatoru na 37°C. Nakon prekonoćne hibridizacije, izvršili smo uklanjanje nevezane probe ispiranjem tako što smo sledećeg dana skinuli selotejp i potopili pločice u SSC citratni pufer (reagens D). Pločice smo držali u puferu sve dok pokrovna stakla nisu sama spala sa pločica. Pločice smo prebacili u zagrejanu SSC pufer u vodenom kupatilu i nakon inkubacije 5 min na 70°C, pločice smo isprali u dH<sub>2</sub>O (3 puta po 2 min). Nakon uklanjanja nevezane probe ispiranjem sledi imunodetekcija. Tkivne preseke smo potopili u 3% rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u apsolutnom metanolu u trajanju od 10 min, pa isprali u 0,01% rastvoru fosfatnog pufera PBS/Tween (reagensi E), 3 puta po 2 min. Na svaki presek smo naneli po nekoliko kapi reagensa F (engl. Casein Blocking Solution) koji sprečava nespecifično vezivanje primarnog antitela, inkubirali 10 min na sobnoj temperaturi, pa uklonili reagens F filter papirom. Zatim smo na svaki presek naneli po nekoliko kapi primarnog antitela na digoksinogenin (reagens G, engl. mouse anti-digoxigenin antibody), inkubirali 30 min na sobnoj temperaturi, pa ponovo isprali u rastvoru fosfatnog pufera PBS/Tween (3 puta 2 min). Nakon ispiranja nanosi se po nekoliko kapi sekundarnog antitela konjugovanog sa peroksidazom rena koja katalizuje bojenju reakciju (reagens H, engl. goat anti-mouse HRP polymer conjugate), inkubirati 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u rastvoru fosfatnog pufera PBS/Tween (3 puta 2 min) naneli smo po nekoliko kapi rastvora hromogenog supstrata – diaminobenzidina, DAB (reagensi I), inkubirali 30 min na sobnoj temperaturi pa isprali pod tekućom vodom. Kontrastno bojenje tkiva vrši se hematoksilinom (reagens J). Trajanje kontrastnog bojenja zavisi od samih tkivnih preseka. Nakon bojenja pločice smo isprali pod tekućom vodom. Dehidraciju tkivnih preseka izvršili smo u seriji etanola rastućih koncentracija (od prethodnog dana), po 2 min u svakom rastvoru, pa smo pločice potopili u ksilol (2 puta 2 min). Na kraju smo na svaki tkivni presek naneli reagens K (engl. Histomount Mounting Solution) i prekrili ga pokrovnim staklom (engl. coverslip) tako da se reagens K

ravnomerno razlije po tkivnom preseku. Zaostale mehuriće vazduha smo istisnuli pincetom. Obojene pločice čuvamo na sobnoj temperaturi.

Enzimaska reakcija hromogenog supstrata (DAB) dovodi do formiranja precipitata koji se mogu videti pod svetlosnim mikroskopom (uveličanje 40x) kao signali braon boje. Prema CISH protokolu, 1-5 genskih kopija po nukleusu u više od 50% malignih ćelija znak je da nema amplifikacije HER2 gena, pri čemu 1-2 genske kopije po nukleusu u više od 50% malignih ćelija ukazuju na diploidiju dok 3-5 genskih kopija ukazuju na polizomiju. 6-10 genskih kopija (ili mali genski klasteri) po nukleusu u više od 50% malignih ćelija znak je amplifikacije HER2 gena. Preko 10 genskih kopija (ili veliki genski klasteri) po nukleusu u više od 50% malignih ćelija znak je jake amplifikacije HER2 gena. Prednosti CISH metode su sledeće: brza i jednostavna interpretacija rezultata, vizuelizacija signala svetlosnim mikroskopom, mogućnost uporedne analize tkivne morfologije i CISH signala, kao i permanentnost CISH signala.

### 3.2.5. Statistička analiza

Raspodele (krive) preživljavanja mogu da se koriste u cilju izučavanja vremena potrebnog za dostizanje odgovarajućeg, prethodno definisanog događaja, kao što je u ovoj studiji vreme do pojave relapsa. Jednostavan način za poređenje vremena preživljavanja dve grupe pacijenata jeste iscrtavanje dve odgovarajuće procene funkcija preživljavanja na istim osama (Ljiljak, 2011). Program Sigma Stat 3.5 iscrtava krive preživljavanja uz pomoć Kaplan-Majerove (engl. Kaplan-Meier) metode i 95%-nog intervala poverenja i poredi dve ili više krivih preživljavanja korišćenjem Log Rank testa. Tok bolesti pacijentkinja je praćen od hirurške intervencije do pojave relapsa, što je definisano kao vreme preživljavanja do pojave relapsa (engl. relapse-free survival, RFS, Punt i sar., 2007). Za granične vrednosti koncentracija analiziranih biomarkera uzete su medijalne vrednosti. Man-Vitnijev test (engl. Mann-Whitney Rank Sum test) je korišćen za međusobno upoređivanje kvantitativnih vrednosti koncentracija biomarkera kod različitih grupa pacijentkinja. Spirmanov test korelacija (engl. Spearman Rank Order Correlation test) je korišćen za ispitivanje međusobne povezanosti kvantitativnih vrednosti koncentracija biomarkera. Razlike između podgrupa pacijentkinja u odnosu na kategorijalne

(kvalitativne) parametre ispitivali smo primenom Hi-kvadrat (engl. Chi-square) testa. Kao statistički značajne uzete su verovatnoće (p) manje od 0,05. Za statističku obradu podataka korišćeni su programi Sigma Stat 3.5 i Sigma Plot 12.

## **4. REZULTATI**

#### **4.1. Raspodela koncentracija biomarkera u odnosu na kliničko-patološke parametre i analiza uzajamnih odnosa koncentracija biomarkera**

##### **4.1.1. Raspodela koncentracija biomarkera u odnosu na kliničko-patološke parametre**

U tabeli 3. je prikazan opseg vrednosti koncentracija sa medijanom koncentracije biomarkera koji su određivani ELISA esejem u tkivnim homogenatima primarnih tumora za sve analizirane pacijentkinje.

Tabela 3. Koncentracije biomarkera u tkivnim homogenatima primarnih tumora za sve analizirane pacijentkinje

<i>biomarker</i>	<i>n</i>	<i>opseg vrednosti koncentracija</i>	<i>medijana koncentracije</i>
IL8	112	0,19 – 1846,32 pg/mg	28,42 pg/mg
MMP2	119	0,08 – 49,84 ng/mg	11,98 ng/mg
MMP9	105	0,12 – 46,57 ng/mg	1,87 ng/mg

n, broj pacijentkinja.

Raspodela koncentracija biomarkera u odnosu na kliničko-patološke parametre za sve analizirane pacijentkinje prikazana je u tabelama 4., 5. i 6. (Mann-Whitney Rank Sum test).

Tabela 4. Raspodela koncentracija IL8 u odnosu na kliničko-patološke parametre

<i>kliničko-patološki parametar</i>	<i>n</i>	<i>medijana IL8 (pg/mg)</i>	<i>p-vrednost</i>
godine (medijana)			
< 63	52	32,71	0,5
≥ 63	60	23,08	
veličina tumora			
pT1 (T < 2 cm)	57	24,47	0,5
pT2 (T ≥ 2 cm)	51	45,31	
nodalni status			
N0	73	88,82	<b>&lt;0,001</b>
N+	30	7,94	
histopatološki tip			
IDC	45	32,67	<b>0,03</b>
ILC	36	12,36	
histološki gradus			
G1	12	34,95	0,6
G3	12	11,75	
histološki gradus			
G2	87	32,67	0,5
G3	12	11,75	
ER status			
ER–	28	23,13	0,2
ER+	84	31,86	
PR status			
PR–	74	37,01	0,08
PR+	38	20,12	
HER2 status			
HER2–	71	32,67	0,8
HER2+	27	22,71	

n, broj pacijentkinja; IDC, invazivni duktalni karcinom; ILC, invazivni lobularni karcinom; ER–, ER < 10 fmol/mg; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg; PR–, PR < 20 fmol/mg; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg; HER2–, odsustvo amplifikacije HER2 gena; HER2+, prisustvo amplifikacije HER2 gena.

Prema rezultatima u tabeli 4., statistički značajna razlika u ekspresiji IL8 je nađena između pacijentkinja sa N0 i N+ statusom, kao i između pacijentkinja sa invazivnim duktalnim i invazivnim lobularnim karcinomom. Pacijentkinje sa N0 statusom i invazivnim duktalnim karcinomom su imale statistički značajno više koncentracije IL8 u tkivu tumora u poređenju sa pacijentkinjama sa N+ statusom i invazivnim lobularnim karcinomom.

Tabela 5. Raspodela koncentracija MMP2 u odnosu na kliničko-patološke parametre

<i>kliničko-patološki parametar</i>	<i>n</i>	<i>medijana MMP2 (ng/mg)</i>	<i>p-vrednost</i>
godine (medijana)			
< 63	60	12,14	0,4
≥ 63	59	10,99	
veličina tumora			
pT1 (T < 2 cm)	70	13,71	<b>0,04</b>
pT2 (T ≥ 2 cm)	47	10,68	
nodalni status			
N0	77	11,77	0,8
N+	31	12,71	
histopatološki tip			
IDC	49	12,62	0,9
ILC	43	12,16	
histološki gradus			
G1	14	12,46	<b>0,04</b>
G3	11	8,75	
histološki gradus			
G2	94	14,08	<b>0,01</b>
G3	11	8,75	
ER status			
ER–	30	10,81	0,2
ER+	89	12,16	
PR status			
PR–	81	11,62	0,3
PR+	38	13,85	
HER2 status			
HER2–	79	11,98	0,6
HER2+	26	13,85	

n, broj pacijentkinja; IDC, invazivni duktalni karcinom; ILC, invazivni lobularni karcinom; ER–, ER < 10 fmol/mg; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg; PR–, PR < 20 fmol/mg; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg; HER2–, odsustvo amplifikacije HER2 gena; HER2+, prisustvo amplifikacije HER2 gena.

Prema rezultatima u tabeli 5., statistički značajna razlika u ekspresiji MMP2 je nađena između tumora manjih od 2 cm i onih većih od 2 cm, između tumora gradusa G1 i G3, kao i između tumora gradusa G2 i G3. Manji tumori i tumori gradusa G1 i G2 su imali statistički značajno više koncentracije MMP2 u odnosu na veće tumore i tumore gradusa G3.

Tabela 6. Raspodela koncentracija MMP9 u odnosu na kliničko-patološke parametre

<i>kliničko-patološki parametar</i>	<i>n</i>	<i>medijana MMP9 (ng/mg)</i>	<i>p-vrednost</i>
godine (medijana)			
<63	51	1,64	0,8
≥63	54	2,57	
veličina tumora			
pT1 (T < 2 cm)	60	1,65	0,8
pT2 (T ≥ 2 cm)	42	2,54	
nodalni status			
N0	69	1,83	0,9
N+	27	2,40	
histopatološki tip			
IDC	47	2,79	<b>0,04</b>
ILC	31	1,43	
histološki gradus			
G1	13	1,87	0,6
G3	10	2,11	
histološki gradus			
G2	82	2,14	0,97
G3	10	2,11	
ER status			
ER–	25	3,33	0,3
ER+	80	1,67	
PR status			
PR–	69	1,83	0,6
PR+	36	2,74	
HER2 status			
HER2–	68	1,56	0,3
HER2+	25	1,83	

n, broj pacijentkinja; IDC, invazivni duktalni karcinom; ILC, invazivni lobularni karcinom; ER–, ER < 10 fmol/mg; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg; PR–, PR < 20 fmol/mg; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg; HER2–, odsustvo amplifikacije HER2 gena; HER2+, prisustvo amplifikacije HER2 gena.

Prema rezultatima u tabeli 6., statistički značajna razlika u ekspresiji MMP9 je nađena jedino između pacijentkinja sa invazivnim duktalnim i invazivnim lobularnim karcinomom. Pacijentkinje sa invazivnim duktalnim karcinomom su imale statistički značajno više koncentracije MMP9 u tkivu tumora u poređenju sa pacijentkinjama sa invazivnim lobularnim karcinomom.



#### 4.1.2. Analiza uzajamnih odnosa koncentracija biomarkera

U tabeli 7. su prikazane uzajamne korelacije između koncentracija hormonskih receptora i biomarkera za sve analizirane pacijentkinje (Spearman Rank Order Correlation test).

Tabela 7. Uzajamne korelacije između koncentracija hormonskih receptora i biomarkera za sve analizirane pacijentkinje

		PR	IL8	MMP2	MMP9
ER	<i>r</i>	0,5	-0,2	-0,04	-0,1
	<i>p</i>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,02</b>	0,6	0,3
	<i>n</i>	150	112	119	105
PR	<i>r</i>		-0,3	0,1	-0,09
	<i>p</i>	/	<b>0,006</b>	0,3	0,3
	<i>n</i>		112	119	105
IL8	<i>r</i>			0,1	0,4
	<i>p</i>	/	/	0,2	<b>&lt;0,001</b>
	<i>n</i>			92	87
MMP2	<i>r</i>				0,07
	<i>p</i>	/	/	/	0,5
	<i>n</i>				97

*r*, Spearman-ov koeficijent korelacije; *p*, *p*-vrednost; *n*, broj pacijentkinja.

Iz tabele 7. se vidi da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između koncentracija hormonskih receptora (ER i PR), kao i između koncentracija biomarkera IL8 i MMP9, dok statistički značajna negativna korelacija postoji između koncentracija hormonskih receptora i interleukina 8 (ER i IL8, PR i IL8). Nisu dobijene statistički značajne korelacije između koncentracija hormonskih receptora i matriksnih metaloproteinaza 2 i 9.

Uzajamni odnosi koncentracija biomarkera za sve analizirane pacijentkinje prikazani su u tabelama 8., 9. i 10. (Mann-Whitney Rank Sum test).

Tabela 8. Raspodela koncentracija IL8 u odnosu na MMP2/MMP9 status

<i>status biomarkera</i>	<i>n</i>	<i>medijana IL8 (opseg koncentracija) pg/mg</i>	<i>p-vrednost</i>
MMP2–	46	28,06 (0,19 – 1846,32)	0,7
MMP2+	46	24,48 (0,29 – 1200,00)	
MMP9–	43	15,79 (0,19 – 1200,00)	<b>0,008</b>
MMP9+	44	40,50 (1,44 – 1846,32)	

MMP2–, MMP2 < 11,98 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 11,98 ng/mg;

MMP9–, MMP9 < 1,87 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 1,87 ng/mg.

Tabela 9. Raspodela koncentracija MMP2 u odnosu na IL8/MMP9 status

<i>status biomarkera</i>	<i>n</i>	<i>medijana MMP2 (opseg koncentracija) ng/mg</i>	<i>p-vrednost</i>
IL8–	48	12,02 (0,08 – 49,84)	0,6
IL8+	44	11,63 (1,85 – 35,94)	
MMP9–	49	12,71 (0,08 – 31,69)	0,2
MMP9+	48	11,80 (0,60 – 49,84)	

IL8–, IL8 < 28,42 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 28,42 pg/mg;

MMP9–, MMP9 < 1,87 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 1,87 ng/mg.

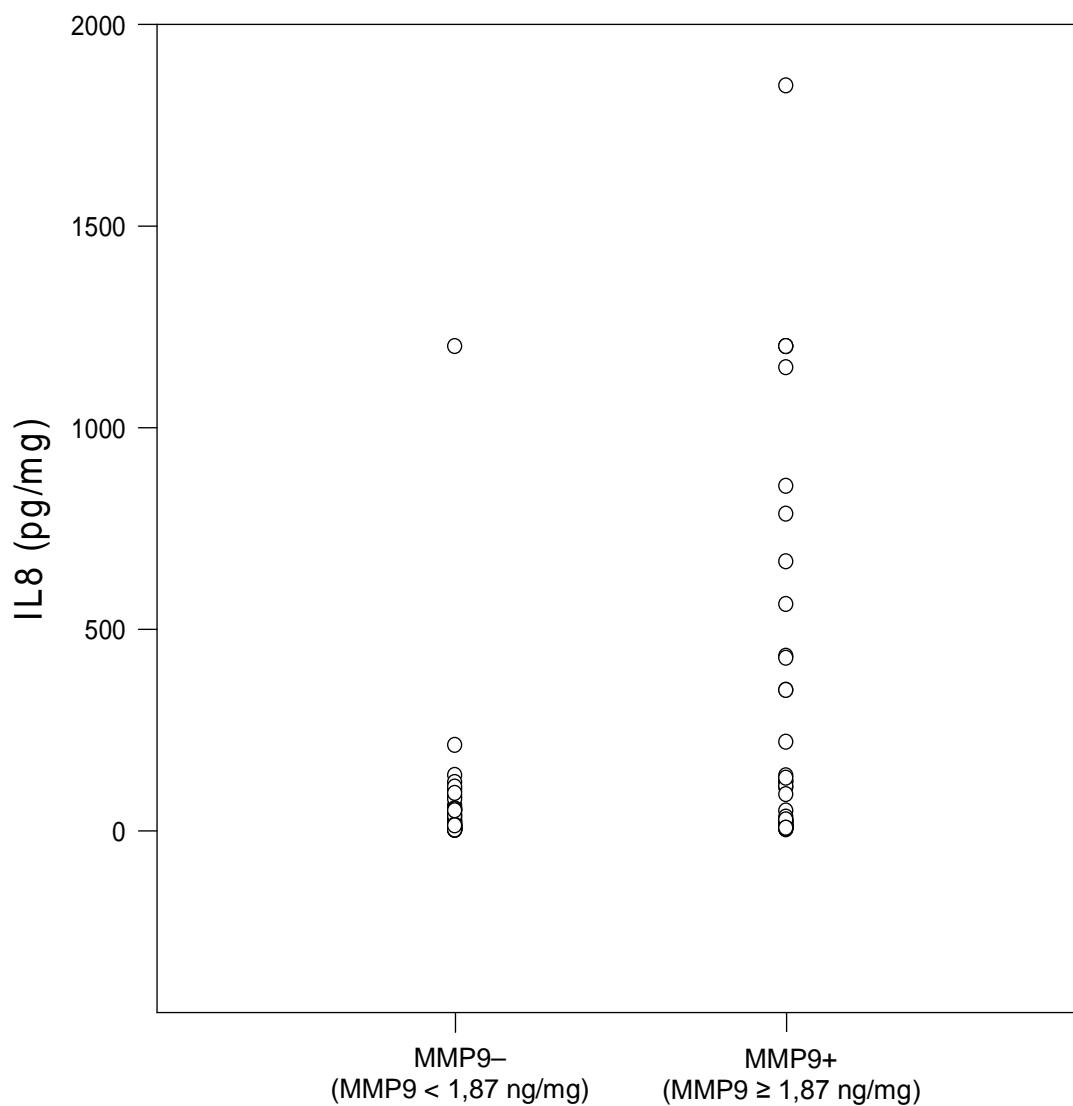
Tabela 10. Raspodela koncentracija MMP9 u odnosu na IL8/MMP2 status

<i>status biomarkera</i>	<i>n</i>	<i>medijana MMP9 (opseg koncentracija) ng/mg</i>	<i>p-vrednost</i>
IL8–	46	1,48 (0,12 – 32,24)	0,05
IL8+	41	3,04 (0,14 – 18,57)	
MMP2–	48	2,03 (0,12 – 46,57)	0,9
MMP2+	49	1,83 (0,14 – 32,24)	

IL8–, IL8 < 28,42 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 28,42 pg/mg;

MMP2–, MMP2 < 11,98 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 11,98 ng/mg.

Prema rezultatima u tabelama 8., 9. i 10., raspodela koncentracija IL8 u odnosu na MMP9 status pokazuje statističku značajnost, dok je raspodela koncentracija MMP9 u odnosu na IL8 status na granici statističke značajnosti. Pacijentkinje sa višim koncentracijama IL8 u tkivu tumora dojke su imale više koncentracije MMP9, i obrnuto (slika 7).



Slika 7. Grafički prikaz raspodele koncentracija IL8 u odnosu na MMP9 status

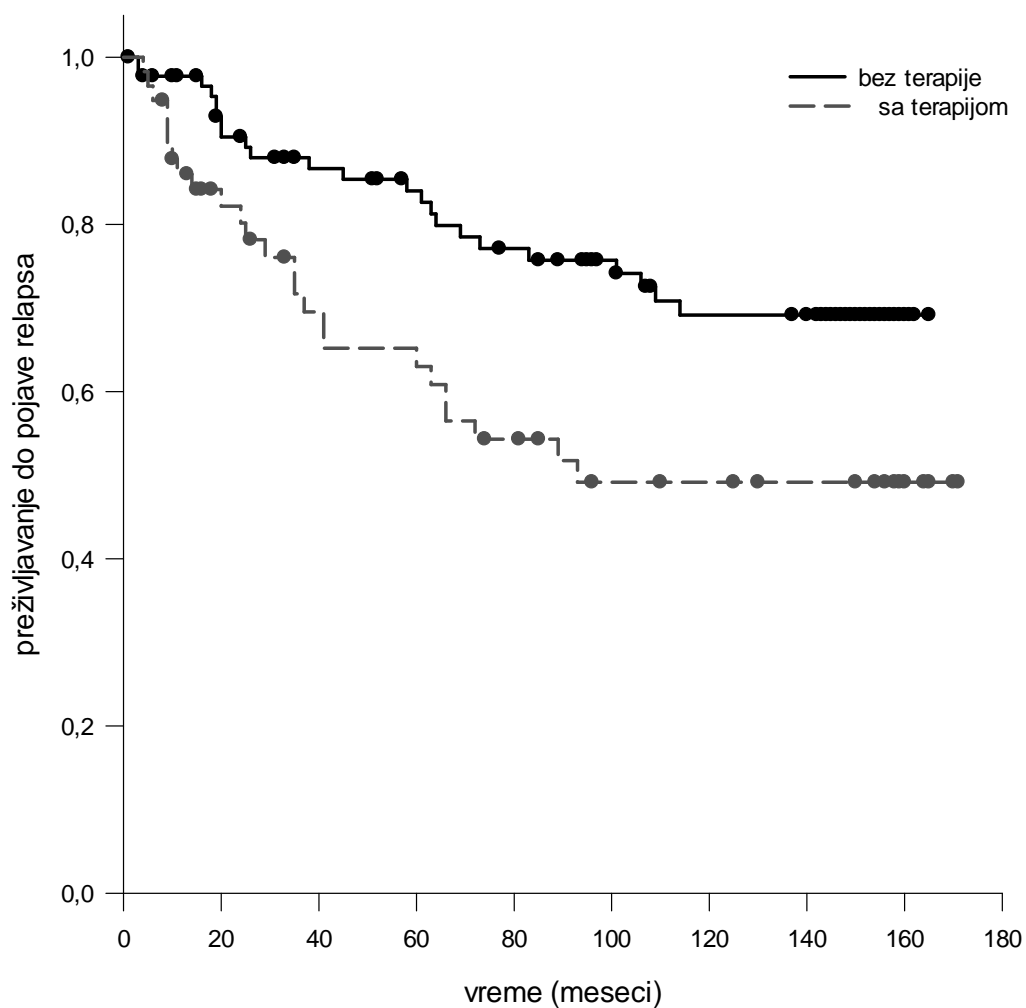
#### 4.2. Analiza prognostičkog i prediktivnog značaja potencijalnih biomarkera

U tabeli 11. i na slici 8. prikazane su razlike u vremenu preživljavanja do pojave relapsa (engl. relapse free survival, RFS) između pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju i pacijentkinja koje su primale adjuvantnu hormonsku terapiju (Log Rank test).

Tabela 11. Procenat relapsa i vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju i pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju (tamoksifen)

	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
<i>bez terapije</i>	91	23	25,3	3 – 165	107	<b>0,008</b>
<i>sa terapijom</i>	59	25	42,4	4 – 171	61	

n, broj pacijentkinja.



Slika 8. Krive preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju i pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju (tamoksifen)

Iz tabele 11. se vidi da postoji statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja do pojave relapsa između pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju i pacijentkinja koje su primale adjuvantnu hormonsku terapiju. Pacijentkinje koje nisu primale adjuvantnu terapiju su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama koje su primale hormonsku terapiju (tamoksifen).

#### 4.2.1. Analiza prognostičkog značaja kliničko-patoloških parametara i biomarkera

##### 4.2.1.1. Analiza prognostičkog značaja kliničko-patoloških parametara

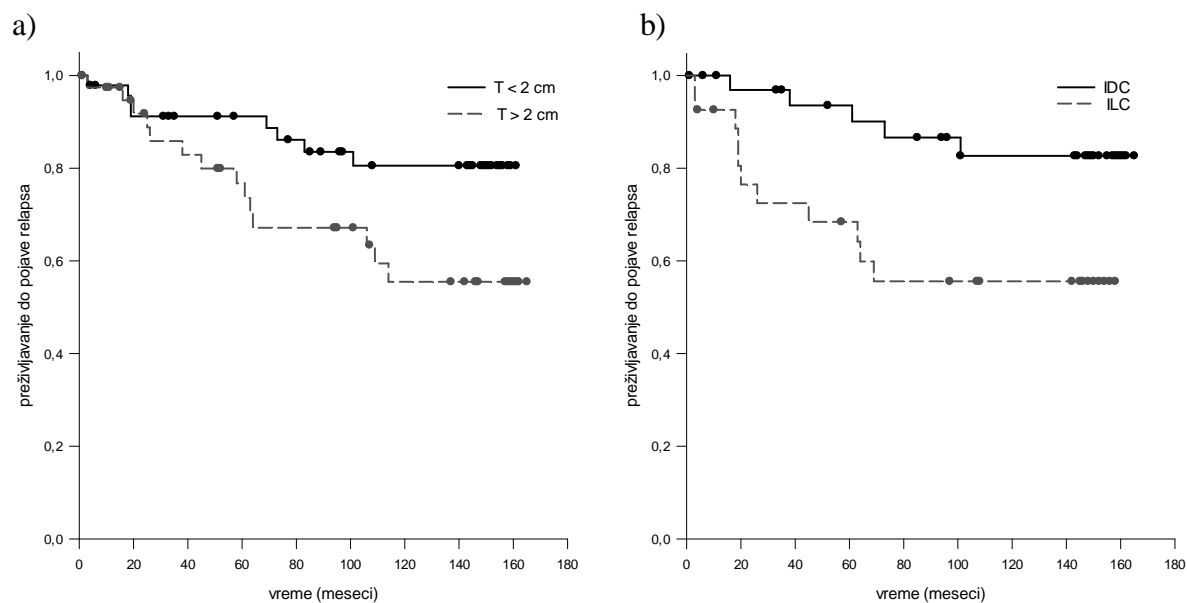
Značaj kliničko-patoloških parametara za praćenje prirodnog toka bolesti, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih prema kliničko-patološkim parametrima (tabela 12).

Tabela 12. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih prema kliničko-patološkim parametrima

<i>kliničko-patološki parametar</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
godine (medijana)						
< 62	42	12	28,6	4 – 161	95	0,5
≥ 62	46	11	23,9	3 – 165	127	
veličina tumora						
pT1 (T < 2 cm)	49	8	16,3	3 – 161	144	<b>0,03</b>
pT2 (T ≥ 2 cm)	40	14	35	3 – 165	95	
histopatološki tip						
IDC	36	5	13,9	6 – 165	145	<b>0,01</b>
ILC	27	11	40,7	3 – 158	69	
histološki gradus						
G1	9	3	33,3	51 – 161	146	0,8
G2	80	18	22,5	3 – 165	107	
ER status						
ER–	20	6	30	3 – 165	128	0,7
ER+	71	17	23,9	3 – 165	106	
PR status						
PR–	70	17	24,3	3 – 165	107	0,6
PR+	21	6	28,6	16 – 161	107	
HER2 status						
HER2–	65	16	24,6	3 – 165	108	0,8
HER2+	20	5	25	3 – 158	137	

n, broj pacijentkinja; IDC, invazivni duktalni karcinom; ILC, invazivni lobularni karcinom; ER–, ER < 10 fmol/mg; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg; PR–, PR < 20 fmol/mg; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg; HER2–, odsustvo amplifikacije HER2 gena; HER2+, prisustvo amplifikacije HER2 gena.

Prema rezultatima u tabeli 12., od dostupnih kliničko-patoloških parametara kao statistički značajni za praćenje prirodnog toka bolesti pokazali su se veličina tumora (slika 9a) i histopatološki tip tumora (slika 9b). Pacijentkinje sa manjim tumorima i invazivnim duktalnim karcinomom su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa većim tumorima i invazivnim lobularnim karcinomom. Ostali kliničko-patološki parametri nisu se pokazali kao statistički značajni za praćenje prirodnog toka bolesti.



Slika 9. Krive preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih prema veličini tumora (a) i histopatološkom tipu (b)

#### 4.2.1.2. Analiza prognostičkog značaja biomarkera

U tabeli 13. prikazan je opseg vrednosti koncentracija sa medijanom koncentracije biomarkera koji su određivani ELISA esejem u tkivnim homogenatima primarnih tumora pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju.

Tabela 13. Koncentracije biomarkera u tkivnim homogenatima primarnih tumora pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju

<i>biomarker</i>	<i>n</i>	<i>opseg vrednosti koncentracija</i>	<i>medijana koncentracije</i>
IL8	65	5,07 – 1846,32 pg/mg	88,82 pg/mg
MMP2	71	1,85 – 49,84 ng/mg	12,12 ng/mg
MMP9	61	0,12 - 46,57 ng/mg	1,82 ng/mg

n, broj pacijentkinja.

Značaj potencijalnih biomarkera pojedinačno za praćenje prirodnog toka bolesti, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih na osnovu medijane koncentracije biomarkera (tabela 14).



Tabela 14. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih na osnovu medijane koncentracije biomarkera

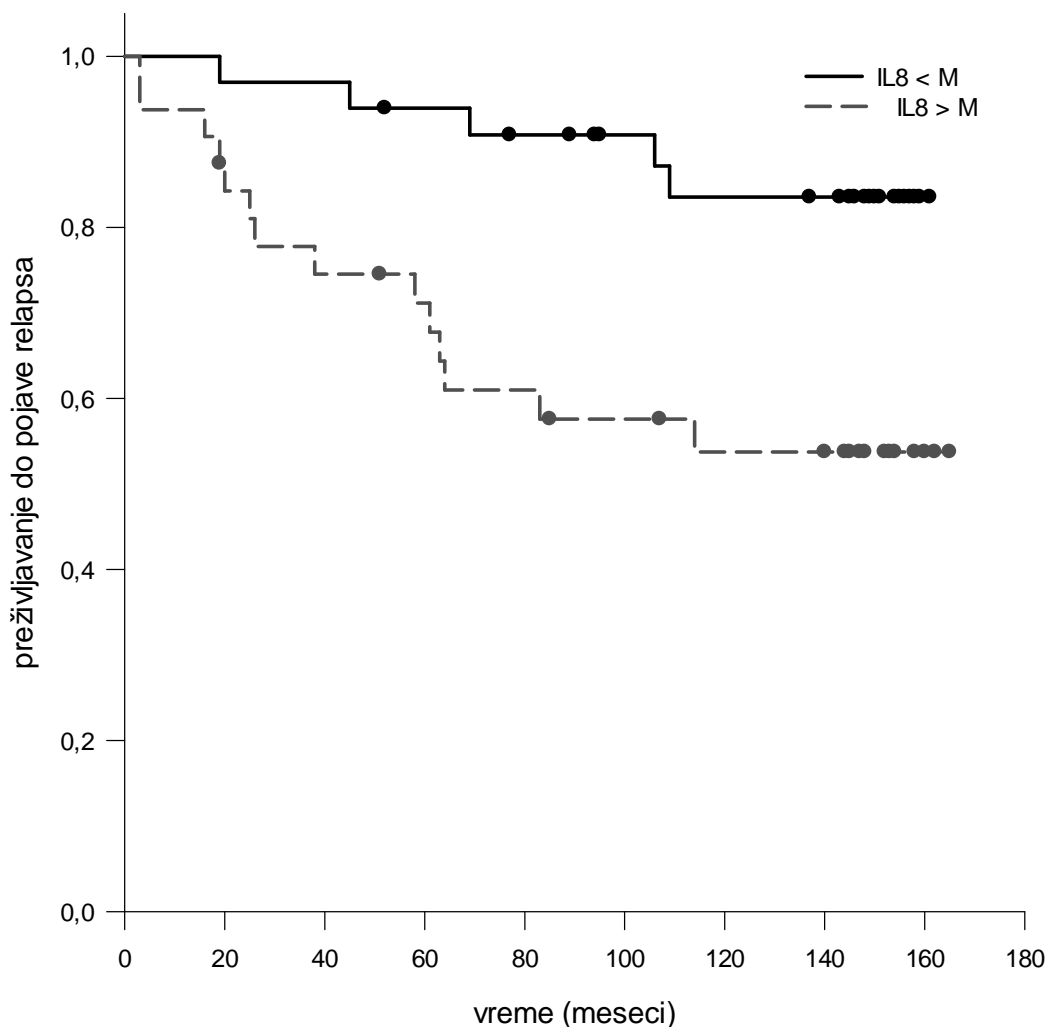
<i>biomarker</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
<b>IL8</b>						
IL8–	33	5	15,1	19 – 161	150	<b>0,002</b>
IL8+	32	14	43,7	3 – 165	96	
<b>MMP2</b>						
MMP2–	35	10	28,6	4 – 165	111	0,8
MMP2+	36	9	25	3 – 165	142	
<b>MMP9</b>						
MMP9–	31	7	22,6	3 – 165	146	0,2
MMP9+	30	9	30	6 – 165	89	

IL8–, IL8 < 88,82 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 88,82 pg/mg;

MMP2–, MMP2 < 12,12 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 12,12 ng/mg;

MMP9–, MMP9 < 1,82 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 1,82 ng/mg.

Prema rezultatima u tabeli 14., od ispitivanih biomarkera jedino se IL8 pokazao kao statistički značajan za praćenje prirodnog toka bolesti. Pacijentkinje sa nivoima IL8 u tkivu tumora manjim od medijane (M=88,82 pg/mg) su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa nivoima IL8 većim od medijane (slika 10). Za razliku od IL8 koji se pokazao kao marker loše prognoze, matriksne metaloproteinaze 2 i 9 nisu se pokazale kao statistički značajne za praćenje prirodnog toka bolesti.



Slika 10. Krive preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih na osnovu medijane koncentracije interleukina 8 ( $M=88,82$  pg/mg)

#### 4.2.1.2.1. Analiza prognostičkog značaja različitih fenotipskih kombinacija na osnovu statusa biomarkera

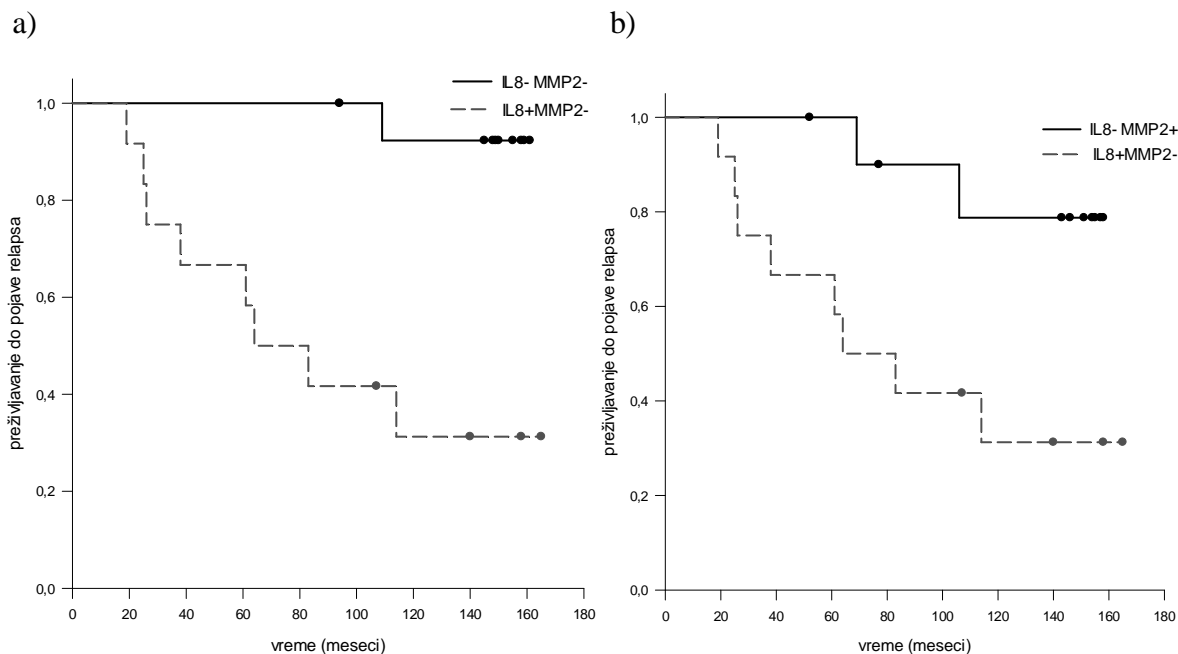
Značaj kombinacije biomarkera IL8 i MMP2 za praćenje prirodnog toka bolesti, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije datih biomarkera (tabela 15).

Tabela 15. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije IL8 i MMP2

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
IL8–MMP2–	14	1	7,1	94 – 161	152	0,3
IL8–MMP2+	11	2	18,2	52 – 158	146	
IL8+MMP2–	12	8	66,7	19 – 165	73	0,1
IL8+MMP2+	14	4	28,6	3 – 165	147	
IL8–MMP2–	14	1	7,1	94 – 161	152	<b>&lt;0,001</b>
IL8+MMP2–	12	8	66,7	19 – 165	73	
IL8–MMP2–	14	1	7,1	94 – 161	152	0,1
IL8+MMP2+	14	4	28,6	3 – 165	147	
IL8–MMP2+	11	2	18,2	52 – 158	146	<b>0,02</b>
IL8+MMP2–	12	8	66,7	19 – 165	73	
IL8–MMP2+	11	2	18,2	52 – 158	146	0,5
IL8+MMP2+	14	4	28,6	3 – 165	147	

IL8–, IL8 < 88,82 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 88,82 pg/mg;  
MMP2–, MMP2 < 12,12 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 12,12 ng/mg.

Prema rezultatima u tabeli 15., postoji statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja do pojave relapsa između pacijentkinja sa IL8–MMP2– i IL8+MMP2– fenotipovima (slika 11a), kao i između pacijentkinja sa IL8–MMP2+ i IL8+MMP2– fenotipovima (slika 11b). Pacijentkinje sa IL8–MMP2– i IL8–MMP2+ fenotipovima su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa IL8+MMP2– fenotipom.



Slika 11. Krive preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u IL8-MMP2- i IL8+MMP2- fenotipove (a) i IL8-MMP2+ i IL8+MMP2- fenotipove (b)

Značaj kombinacije biomarkera IL8 i MMP9 za praćenje prirodnog toka bolesti, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije datih biomarkera (tabela 16).

Tabela 16. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije IL8 i MMP9

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
IL8–MMP9–	18	3	16,7	45 – 161	150	0,6
IL8–MMP9+	4	1	25	94 – 161	131	
IL8+MMP9–	7	2	28,6	3 – 165	140	0,5
IL8+MMP9+	16	7	43,7	16 – 165	99	
IL8–MMP9–	18	3	16,7	45 – 161	150	0,4
IL8+MMP9–	7	2	28,6	3 – 165	140	
IL8–MMP9–	18	3	16,7	45 – 161	150	0,06
IL8+MMP9+	16	7	43,7	16 – 165	99	
IL8–MMP9+	4	1	25	94 – 161	131	0,9
IL8+MMP9–	7	2	28,6	3 – 165	140	
IL8–MMP9+	4	1	25	94 – 161	131	0,5
IL8+MMP9+	16	7	43,7	16 – 165	99	

IL8–, IL8 < 88,82 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 88,82 pg/mg;

MMP9–, MMP9 < 1,82 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 1,82 ng/mg.

Iz tabele 16. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

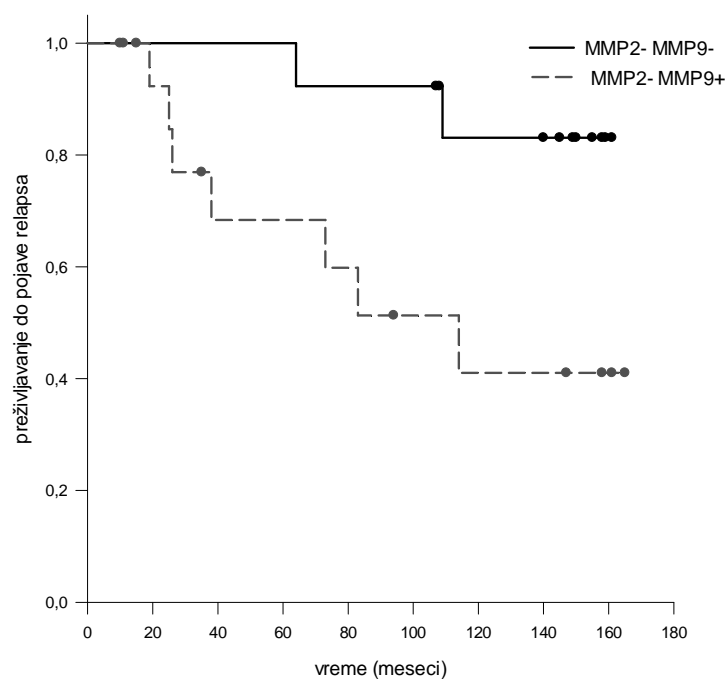
Značaj kombinacije biomarkera MMP2 i MMP9 za praćenje prirodnog toka bolesti, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije datih biomarkera (tabela 17).

Tabela 17. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije MMP2 i MMP9

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
MMP2–MMP9–	13	2	15,4	64 – 161	149	<b>0,02</b>
MMP2–MMP9+	16	7	43,7	10 – 165	55	
MMP2+MMP9–	17	4	23,5	3 – 165	146	0,7
MMP2+MMP9+	12	2	16,7	6 – 160	146	
MMP2–MMP9–	13	2	15,4	64 – 161	149	0,5
MMP2+MMP9–	17	4	23,5	3 – 165	146	
MMP2–MMP9–	13	2	15,4	64 – 161	149	0,7
MMP2+MMP9+	12	2	16,7	6 – 160	146	
MMP2–MMP9+	16	7	43,7	10 – 165	55	0,1
MMP2+MMP9–	17	4	23,5	3 – 165	146	
MMP2–MMP9+	16	7	43,7	10 – 165	55	0,08
MMP2+MMP9+	12	2	16,7	6 – 160	146	

MMP2–, MMP2 < 12,12 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 12,12 ng/mg;  
MMP9–, MMP9 < 1,82 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 1,82 ng/mg.

Prema rezultatima u tabeli 17., postoji statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja do pojave relapsa između pacijentkinja sa MMP2–MMP9– i MMP2–MMP9+ fenotipovima (slika 12). Pacijentkinje sa MMP2–MMP9– fenotipom su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa MMP2–MMP9+ fenotipom.



Slika 12. Krive preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u MMP2–MMP9– i MMP2–MMP9+ fenotipove

#### 4.2.1.2.2. Analiza prognostičkog značaja različitih fenotipskih kombinacija na osnovu statusa receptora i biomarkera

Značaj kombinacije receptora i IL8 za praćenje prirodnog toka bolesti, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane koncentracije IL8 (tabele 18., 19. i 20.).

Tabela 18. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu ER statusa i medijane koncentracije IL8

	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
ER-IL8-	5	0	0	52 – 159	148	0,07
ER-IL8+	9	5	55,5	3 – 165	114	
ER+IL8-	28	5	17,9	19 – 161	150	<b>0,04</b>
ER+IL8+	23	9	39,1	3 – 165	85	
ER-IL8-	5	0	0	52 – 159	148	0,3
ER+IL8-	28	5	17,9	19 – 161	150	
ER-IL8-	5	0	0	52 – 159	148	0,1
ER+IL8+	23	9	39,1	3 – 165	85	
ER-IL8+	9	5	55,5	3 – 165	114	<b>0,02</b>
ER+IL8-	28	5	17,9	19 – 161	150	
ER-IL8+	9	5	55,5	3 – 165	114	0,5
ER+IL8+	23	9	39,1	3 – 165	85	

ER-, ER < 10 fmol/mg; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg; IL8-, IL8 < 88,82 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 88,82 pg/mg.

Prema rezultatima u tabeli 18., u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa IL8- statusom su imale manji procenat relapsa i duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa IL8+ statusom, i to bez obzira na ER status. Pri tom je dobijena statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja do pojave relapsa između pacijentkinja sa ER+IL8- i ER+IL8+ fenotipovima (slika 13a), kao i između pacijentkinja sa ER+IL8- i ER-IL8+ fenotipovima (slika 13b). Pacijentkinje sa ER+IL8- fenotipom su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa ER+IL8+ i ER-IL8+ fenotipovima.

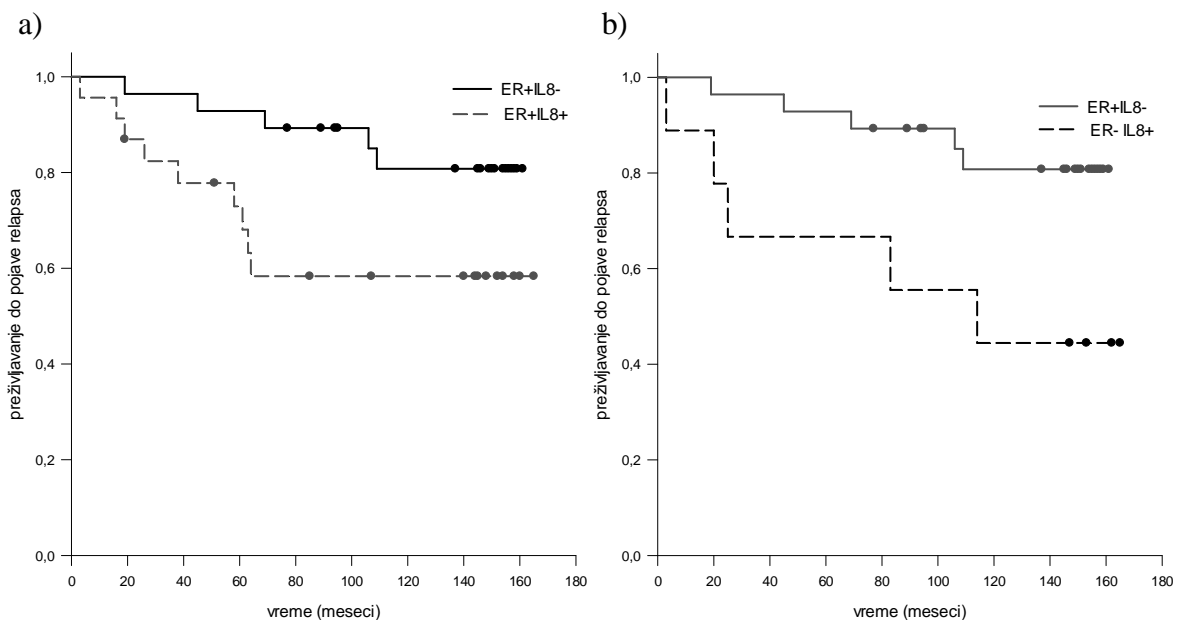


Tabela 19. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu PR statusa i medijane koncentracije IL8

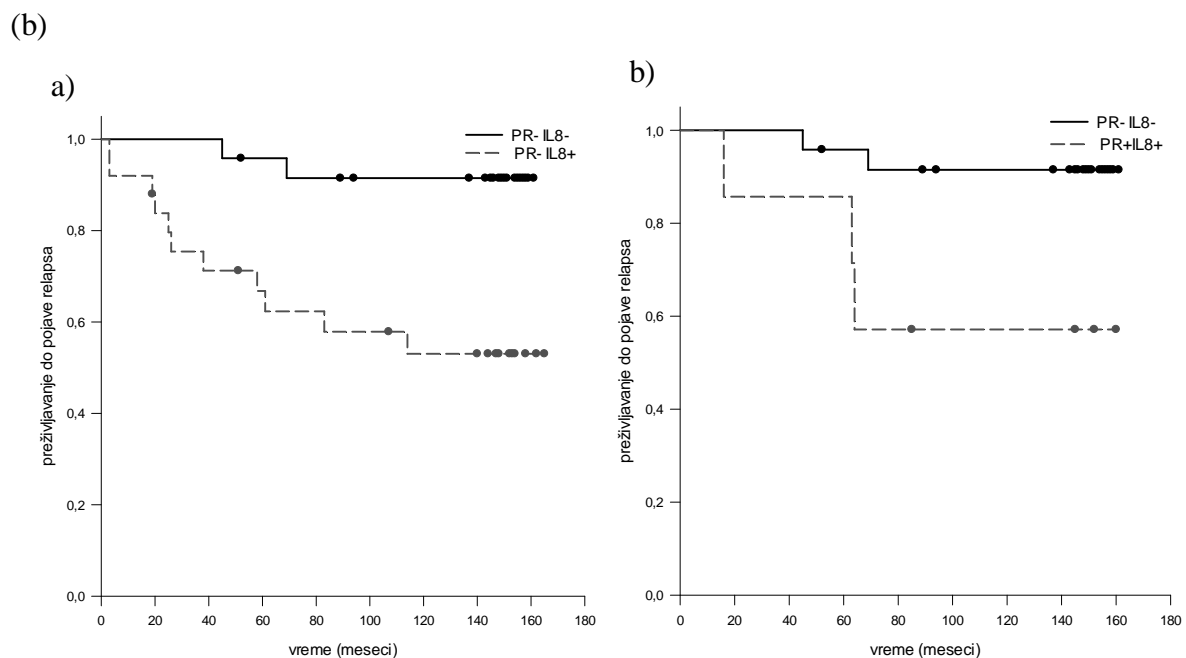
<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
PR-IL8-	24	2	8,3	45 – 161	150	<b>0,003</b>
PR-IL8+	25	11	44	3 – 165	107	
PR+IL8-	9	3	33,3	19 – 161	109	0,6
PR+IL8+	7	3	42,9	16 – 160	85	
PR-IL8-	24	2	8,3	45 – 161	150	0,07
PR+IL8-	9	3	33,3	19 – 161	109	
PR-IL8-	24	2	8,3	45 – 161	150	<b>0,02</b>
PR+IL8+	7	3	42,9	16 – 160	85	
PR-IL8+	25	11	44	3 – 165	107	0,5
PR+IL8-	9	3	33,3	19 – 161	109	
PR-IL8+	25	11	44	3 – 165	107	0,8
PR+IL8+	7	3	42,9	16 – 160	85	

PR-, PR < 20 fmol/mg; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg; IL8-, IL8 < 88,82 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 88,82 pg/mg.

Prema rezultatima u tabeli 19., u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa IL8- statusom su imale manji procenat relapsa i duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa IL8+ statusom, i to bez obzira na PR status. Pri tom je dobijena statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja do pojave relapsa između pacijentkinja sa PR-IL8- i PR-IL8+ fenotipovima (slika 14a), kao i između pacijentkinja sa PR-IL8- i PR+IL8+ fenotipovima (slika 14b). Pacijentkinje sa PR-IL8- fenotipom su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa PR-IL8+ i PR+IL8+ fenotipovima.



Slika 13. Krive preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u ER+IL8- i ER+IL8+ fenotipove (a) i ER+IL8- i ER-IL8+ fenotipove



Slika 14. Krive preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u PR-IL8- i PR-IL8+ fenotipove (a) i PR-IL8- i PR+IL8+ fenotipove

(b)

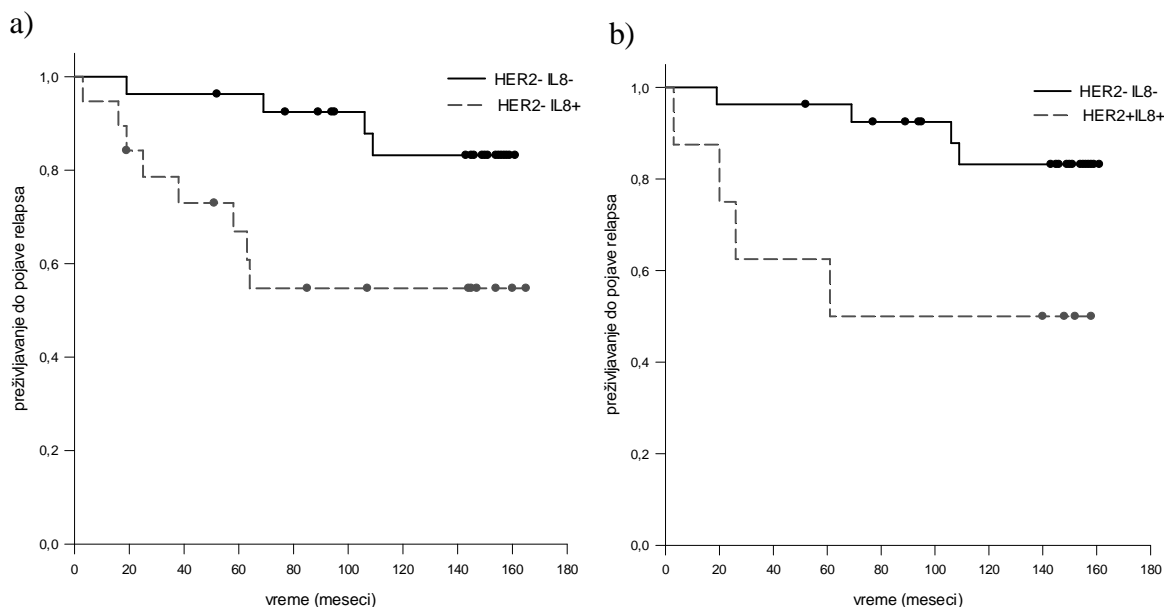
Tabela 20. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu HER2 statusa i medijane koncentracije IL8

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
HER2-IL8-	27	4	14,8	19 – 161	150	<b>0,01</b>
HER2-IL8+	19	8	42,1	3 – 165	64	
HER2+IL8-	6	1	16,7	45 – 158	153	0,2
HER2+IL8+	8	4	50	3 – 158	100	
HER2-IL8-	27	4	14,8	19 – 161	150	0,9
HER2+IL8-	6	1	16,7	45 – 158	153	
HER2-IL8-	27	4	14,8	19 – 161	150	<b>0,02</b>
HER2+IL8+	8	4	50	3 – 158	100	
HER2-IL8+	19	8	42,1	3 – 165	64	0,2
HER2+IL8-	6	1	16,7	45 – 158	153	
HER2-IL8+	19	8	42,1	3 – 165	64	0,7
HER2+IL8+	8	4	50	3 – 158	100	

HER2-, odsustvo amplifikacije HER2 gena; HER2+, prisustvo amplifikacije HER2 gena;  
 IL8-, IL8 < 88,82 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 88,82 pg/mg.

Prema rezultatima u tabeli 20., u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa IL8- statusom su imale manji procenat relapsa i duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa IL8+ statusom, i to bez obzira na HER2 status. Pored toga postoji statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja do pojave relapsa između pacijentkinja sa HER2-IL8- i HER2-IL8+ fenotipovima (slika 15a), kao i između pacijentkinja sa HER2-IL8- i HER2+IL8+ fenotipovima (slika 15b). Pacijentkinje sa

HER2–IL8– fenotipom su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa HER2–IL8+ i HER2+IL8+ fenotipovima.



Slika 15. Krive preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u HER2–IL8– i HER2–IL8+ fenotipove (a) i HER2–IL8– i HER2+IL8+ fenotipove (b)

Prema rezultatima u tabelama 18., 19. i 20., IL8 iz tkiva tumora dojke se pokazao kao pouzdaniji prognostički marker u odnosu na status receptora (ER, PR i HER2).

Značaj kombinacije receptora i MMP2 za praćenje prirodnog toka bolesti, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane koncentracije MMP2 (tabele 21., 22. i 23.).

Tabela 21. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu ER statusa i medijane koncentracije MMP2

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
ER–MMP2–	11	4	36,4	15 – 165	114	0,5
ER–MMP2+	6	1	16,7	3 – 153	143	
ER+MMP2–	23	6	26,1	4 – 161	109	0,9
ER+MMP2+	29	8	27,6	3 – 165	106	
ER–MMP2–	11	4	36,4	15 – 165	114	0,6
ER+MMP2–	23	6	26,1	4 – 161	109	
ER–MMP2–	11	4	36,4	15 – 165	114	0,7
ER+MMP2+	29	8	27,6	3 – 165	106	
ER–MMP2+	6	1	16,7	3 – 153	143	0,7
ER+MMP2–	23	6	26,1	4 – 161	109	
ER–MMP2+	6	1	16,7	3 – 153	143	0,6
ER+MMP2+	29	8	27,6	3 – 165	106	

ER–, ER < 10 fmol/mg; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg;

MMP2–, MMP2 < 12,12 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 12,12 ng/mg.

Iz tabele 21. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Tabela 22. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu PR statusa i medijane koncentracije MMP2

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
PR–MMP2–	29	8	27,6	4 – 165	108	0,7
PR–MMP2+	26	6	23,1	3 – 165	143	
PR+MMP2–	5	2	40	64 – 161	158	0,8
PR+MMP2+	9	3	33,3	16 – 160	85	
PR–MMP2–	29	8	27,6	4 – 165	108	0,9
PR+MMP2–	5	2	40	64 – 161	158	
PR–MMP2–	29	8	27,6	4 – 165	108	0,8
PR+MMP2+	9	3	33,3	16 – 160	85	
PR–MMP2+	26	6	23,1	3 – 165	143	0,6
PR+MMP2–	5	2	40	64 – 161	158	
PR–MMP2+	26	6	23,1	3 – 165	143	0,6
PR+MMP2+	9	3	33,3	16 – 160	85	

PR–, PR < 20 fmol/mg; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg;

MMP2–, MMP2 < 12,12 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 12,12 ng/mg.

Iz tabele 22. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Tabela 23. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu HER2 statusa i medijane koncentracije MMP2

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
HER2–MMP2–	24	6	25	4 – 165	127	0,6
HER2–MMP2+	26	8	30,8	3 – 165	103	
HER2+MMP2–	7	2	28,6	26 – 158	140	0,7
HER2+MMP2+	7	1	14,3	3 – 158	144	
HER2–MMP2–	24	6	25	4 – 165	127	0,9
HER2+MMP2–	7	2	28,6	26 – 158	140	
HER2–MMP2–	24	6	25	4 – 165	127	0,7
HER2+MMP2+	7	1	14,3	3 – 158	144	
HER2–MMP2+	26	8	30,8	3 – 165	103	0,9
HER2+MMP2–	7	2	28,6	26 – 158	140	
HER2–MMP2+	26	8	30,8	3 – 165	103	0,5
HER2+MMP2+	7	1	14,3	3 – 158	144	

HER2–, odsustvo amplifikacije HER2 gena; HER2+, prisustvo amplifikacije HER2 gena;  
MMP2–, MMP2 < 12,12 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 12,12 ng/mg.

Iz tabele 23. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Značaj kombinacije receptora i MMP9 za praćenje prirodnog toka bolesti, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane koncentracije MMP9 (tabele 24., 25. i 26.).

Tabela 24. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu ER statusa i medijane koncentracije MMP9

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseći)</i>	<i>medijana RFS (meseći)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
ER–MMP9–	3	0	0	143 – 155	147	0,2
ER–MMP9+	10	4	40	15 – 165	98	
ER+MMP9–	28	7	25	3 – 165	145	0,5
ER+MMP9+	18	5	27,8	6 – 161	89	
ER–MMP9–	3	0	0	143 – 155	147	0,3
ER+MMP9–	28	7	25	3 – 165	145	
ER–MMP9–	3	0	0	143 – 155	147	0,3
ER+MMP9+	18	5	27,8	6 – 161	89	
ER–MMP9+	10	4	40	15 – 165	98	0,3
ER+MMP9–	28	7	25	3 – 165	145	
ER–MMP9+	10	4	40	15 – 165	98	0,7
ER+MMP9+	18	5	27,8	6 – 161	89	

ER–, ER < 10 fmol/mg; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg;

MMP9–, MMP9 < 1,82 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 1,82 ng/mg.

Iz tabele 24. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.



Tabela 25. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu PR statusa i medijane koncentracije MMP9

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
PR–MMP9–	25	5	20	3 – 165	146	0,2
PR–MMP9+	22	7	31,8	6 – 165	78	
PR+MMP9–	6	2	33,3	64 – 159	130	0,9
PR+MMP2+	6	2	33,3	16 – 161	129	
PR–MMP9–	25	5	20	3 – 165	146	0,6
PR+MMP9–	6	2	33,3	64 – 159	130	
PR–MMP9–	25	5	20	3 – 165	146	0,5
PR+MMP9+	6	2	33,3	16 – 161	129	
PR–MMP9+	22	7	31,8	6 – 165	78	0,7
PR+MMP9–	6	2	33,3	64 – 159	130	
PR–MMP9+	22	7	31,8	6 – 165	78	0,8
PR+MMP9+	6	2	33,3	16 – 161	129	

PR–, PR < 20 fmol/mg; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg;

MMP9–, MMP9 < 1,82 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 1,82 ng/mg.

Iz tabele 25. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Tabela 26. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu HER2 statusa i medijane koncentracije MMP9

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
HER2–MMP9–	25	5	20	20 – 165	146	0,1
HER2–MMP9+	17	6	35,3	10 – 165	85	
HER2+MMP9–	6	2	33,3	3 – 158	146	0,7
HER2+MMP9+	6	1	16,7	6 – 158	89	
HER2–MMP9–	25	5	20	20 – 165	146	0,4
HER2+MMP9–	6	2	33,3	3 – 158	146	
HER2–MMP9–	25	5	20	20 – 165	146	0,9
HER2+MMP9+	6	1	16,7	6 – 158	89	
HER2–MMP9+	17	6	35,3	10 – 165	85	0,8
HER2+MMP9–	6	2	33,3	3 – 158	146	
HER2–MMP9+	17	6	35,3	10 – 165	85	0,5
HER2+MMP9+	6	1	16,7	6 – 158	89	

HER2–, odsustvo amplifikacije HER2 gena; HER2+, prisustvo amplifikacije HER2 gena;  
MMP9–, MMP9 < 1,82 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 1,82 ng/mg.

Iz tabele 26. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

## 4.2.2. Analiza prediktivnog značaja kliničko-patoloških parametara i biomarkera

### 4.2.2.1. Analiza prediktivnog značaja kliničko-patoloških parametara

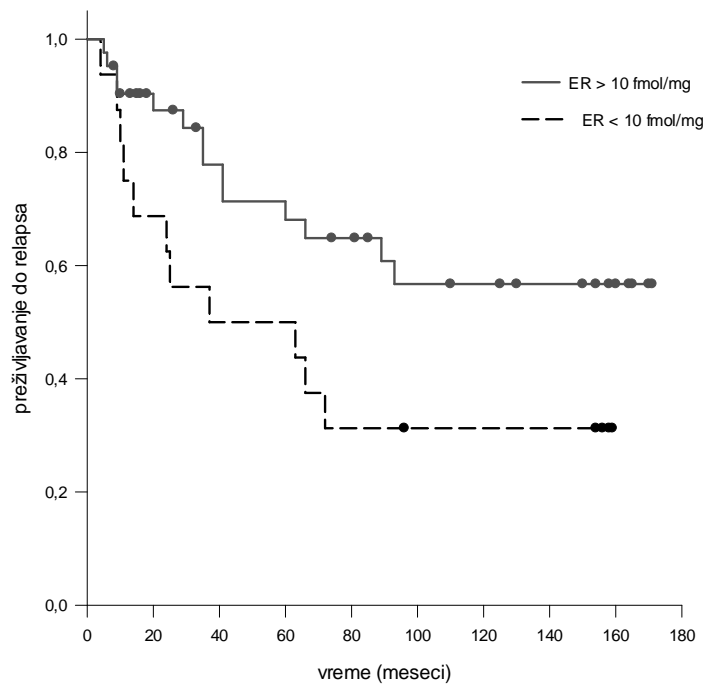
Značaj kliničko-patoloških parametara za predikciju odgovora na hormonsku terapiju, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih prema kliničko-patološkim parametrima (tabela 27).

Tabela 27. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju (tamoksifen) grupisanih prema kliničko-patološkim parametrima

<i>kliničko-patološki parametar</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
godine						
< 65 (medijana)	28	10	35,7	4 – 171	91	0,1
≥ 65	30	15	50	5 – 170	35	
veličina tumora						
pT1 (T < 2 cm)	31	11	35,5	8 – 170	72	0,08
pT2 (T ≥ 2 cm)	24	14	58,3	4 – 171	35	
nodalni status						
N0	11	4	36,4	10 – 165	85	0,96
N>0	36	12	33,3	4 – 171	74	
histopatološki tip						
IDC	27	13	48,2	4 – 165	66	0,9
ILC	20	8	40	6 – 171	35	
histološki gradus						
G1	8	3	37,5	9 – 154	58	0,6
G3	12	6	50	5 – 170	58	
status ER						
ER–	16	11	68,8	4 – 159	50	<b>0,04</b>
ER+	42	14	33,3	5 – 171	63	
status PR						
PR–	30	16	53,3	4 – 170	51,5	0,1
PR+	28	9	31	5 – 171	61,5	
status HER2						
HER2–	35	15	42,9	4 – 170	50,5	0,5
HER2+	14	5	35,7	8 – 171	76,5	

ER–, ER < 10 fmol/mg; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg; PR–, PR < 20 fmol/mg; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg.

Prema rezultatima u tabeli 27., od dostupnih kliničko-patoloških parametara jedino se status estrogenog receptora pokazao kao statistički značajan za predikciju odgovora na hormonsku terapiju (slika 16). Pacijentkinje sa ER+ statusom su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa ER- statusom.



Slika 16. Krive preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju (tamoksifen) grupisanih prema ER statusu

#### 4.2.2.2. Analiza prediktivnog značaja biomarkera

U tabeli 28. prikazan je opseg vrednosti koncentracija sa medijanom koncentracije biomarkera koji su određivani ELISA esejem u tkivnim homogenatima primarnih tumora pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju.

Tabela 28. Koncentracije biomarkera u tkivnim homogenatima primarnih tumora pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju (tamoksifen)

<i>biomarker</i>	<i>n</i>	<i>opseg vrednosti koncentracija</i>	<i>medijana koncentracije</i>
IL8	47	0,19 – 1147,54 pg/mg	9,15 pg/mg
MMP2	48	0,08 – 31,69 ng/mg	11,55 ng/mg
MMP9	44	0,14 – 32,24 ng/mg	2,51 ng/mg

n – broj pacijentkinja.

Značaj potencijalnih biomarkera pojedinačno za predikciju odgovora na hormonsku terapiju, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale adjuvantnu hormonsku terapiju grupisanih na osnovu medijane koncentracije biomarkera (tabela 29).

Tabela 29. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju (tamoksifen) grupisanih na osnovu medijane koncentracije biomarkera

<i>biomarker</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseći)</i>	<i>medijana RFS (meseći)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
IL8						
IL8–	22	8	36,4	5 – 170	77	0,6
IL8+	24	10	41,7	4 – 171	53	
MMP2						
MMP2–	23	9	39,1	4 – 171	35	0,8
MMP2+	24	11	45,8	6 – 170	64	
MMP9						
MMP9–	21	8	38,1	5 – 170	66	0,5
MMP9+	22	7	31,8	8 – 171	92	

IL8–, IL8 < 9,15 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 9,15 pg/mg;

MMP2–, MMP2 < 11,55 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 11,55 ng/mg;

MMP9–, MMP9 < 2,51 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 2,51 ng/mg.

Iz tabele 29. se vidi da se nijedan od ispitivanih biomarkera nije pokazao kao statistički značajan za predikciju odgovora (efikasnost ili rezistencija) na hormonsku terapiju.

#### 4.2.2.2.1. Analiza prediktivnog značaja različitih fenotipskih kombinacija na osnovu statusa biomarkera

Značaj kombinacije biomarkera IL8 i MMP2 za predikciju odgovora na hormonsku terapiju, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije datih biomarkera (tabela 30).

Tabela 30. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije IL8 i MMP2

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
IL8–MMP2–	12	3	25	5 – 170	77	0,7
IL8–MMP2+	8	3	37,5	6 – 170	124	
IL8+MMP2–	7	4	57,1	4 – 171	35	0,5
IL8+MMP2+	13	5	38,5	8 – 154	66	
IL8–MMP2–	12	3	25	5 – 170	77	0,2
IL8+MMP2–	7	4	57,1	4 – 171	35	
IL8–MMP2–	12	3	25	5 – 170	77	0,4
IL8+MMP2+	13	5	38,5	8 – 154	66	
IL8–MMP2+	8	3	37,5	6 – 170	124	0,5
IL8+MMP2–	7	4	57,1	4 – 171	35	
IL8–MMP2+	8	3	37,5	6 – 170	124	0,7
IL8+MMP2+	13	5	38,5	8 – 154	66	

IL8–, IL8 < 9,15 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 9,15 pg/mg;

MMP2–, MMP2 < 11,55 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 11,55 ng/mg.

Iz tabele 30. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Značaj kombinacije biomarkera IL8 i MMP9 za predikciju odgovora na hormonsku terapiju, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije datih biomarkera (tabela 31).

Tabela 31. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije IL8 i MMP9

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
IL8–MMP9–	14	6	42,9	5 – 170	77	0,2
IL8–MMP9+	7	1	14,3	26 – 170	125	
IL8+MMP9–	6	2	33,3	16 – 85	50	0,9
IL8+MMP9+	14	5	35,7	8 – 171	92	
IL8–MMP9–	14	6	42,9	5 – 170	77	0,98
IL8+MMP9–	6	2	33,3	16 – 85	50	
IL8–MMP9–	14	6	42,9	5 – 170	77	0,7
IL8+MMP9+	14	5	35,7	8 – 171	92	
IL8–MMP9+	7	1	14,3	26 – 170	125	0,3
IL8+MMP9–	6	2	33,3	16 – 85	50	
IL8–MMP9+	7	1	14,3	26 – 170	125	0,3
IL8+MMP9+	14	5	35,7	8 – 171	92	

IL8–, IL8 < 9,15 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 9,15 pg/mg;

MMP9–, MMP9 < 2,51 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 2,51 ng/mg.

Iz tabele 31. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Značaj kombinacije biomarkera MMP2 i MMP9 za predikciju odgovora na hormonsku terapiju, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije datih biomarkera (tabela 32).



Tabela 32. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije MMP2 i MMP9

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
MMP2–MMP9–	10	3	30	5 – 170	54	0,8
MMP2–MMP9+	7	2	28,6	11 – 171	125	
MMP2+MMP9–	8	3	37,5	9 – 164	83	0,97
MMP2+MMP9+	12	4	33,3	8 – 170	76	
MMP2–MMP9–	10	3	30	5 – 170	54	0,9
MMP2+MMP9–	8	3	37,5	9 – 164	83	
MMP2–MMP9–	10	3	30	5 – 170	54	0,9
MMP2+MMP9+	12	4	33,3	8 – 170	76	
MMP2–MMP9+	7	2	28,6	11 – 171	125	0,7
MMP2+MMP9–	8	3	37,5	9 – 164	83	
MMP2–MMP9+	7	2	28,6	11 – 171	125	0,7
MMP2+MMP9+	12	4	33,3	8 – 170	76	

MMP2–, MMP2 < 11,55 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 11,55 ng/mg;

MMP9–, MMP9 < 2,51 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 2,51 ng/mg.

Iz tabele 32. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

#### 4.2.2.2.2. Analiza prediktivnog značaja različitih fenotipskih kombinacija na osnovu statusa receptora i biomarkera

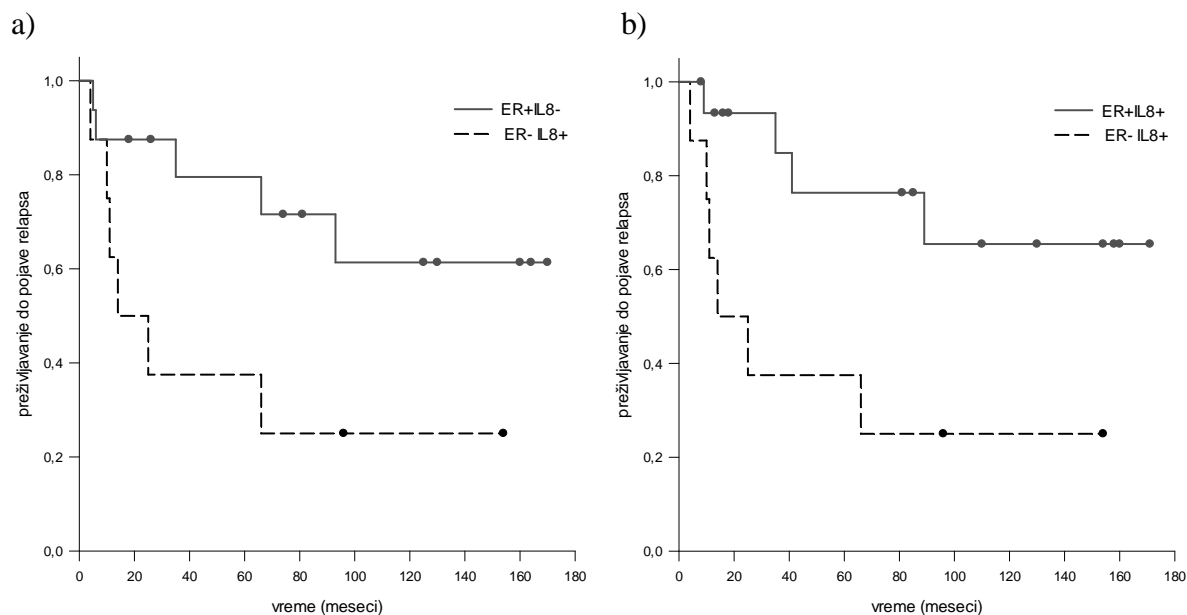
Značaj kombinacije receptora i IL8 za predikciju odgovora na hormonsku terapiju, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju (tamoksifen) grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane koncentracije IL8 (tabele 33., 34. i 35.).

Tabela 33. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu ER statusa i medijane koncentracije IL8

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
ER-IL8-	6	3	50	9 – 159	96	0,3
ER-IL8+	8	6	75	4 – 154	19	
ER+IL8-	16	5	31,2	5 – 170	77	0,7
ER+IL8+	16	4	25	8 – 171	83	
ER-IL8-	6	3	50	9 – 159	96	0,5
ER+IL8-	16	5	31,2	5 – 170	77	
ER-IL8-	6	3	50	9 – 159	96	0,4
ER+IL8+	16	4	25	8 – 171	83	
ER-IL8+	8	6	75	4 – 154	19	<b>0,04</b>
ER+IL8-	16	5	31,2	5 – 170	77	
ER-IL8+	8	6	75	4 – 154	19	<b>0,02</b>
ER+IL8+	16	4	25	8 – 171	83	

ER-, ER < 10 fmol/mg; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg; IL8-, IL8 < 9,15 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 9,15 pg/mg.

Prema rezultatima u tabeli 33., postoji statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja do pojave relapsa između pacijentkinja sa ER+IL8- i ER-IL8+ fenotipovima (slika 17a), kao i između pacijentkinja sa ER+IL8+ i ER-IL8+ fenotipovima (slika 17b). Pacijentkinje sa ER+IL8- i ER+IL8+ fenotipovima su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa ER-IL8+ fenotipom. Pored toga, u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa ER+ statusom su imale manji procenat relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa ER- statusom, i to bez obzira na IL8 status.



Slika 17. Krive preživljavanja do pojave relapsa pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u ER+IL8- i ER-IL8+ fenotipove (a) i ER+IL8+ i ER-IL8+ fenotipove (b)

Tabela 34. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu PR statusa i medijane koncentracije IL8

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
PR-IL8-	13	5	38,5	6 – 170	93	0,2
PR-IL8+	12	7	58,3	4 – 160	19	
PR+IL8-	9	3	33,3	5 – 170	35	0,5
PR+IL8+	12	3	25	13 – 171	85	
PR-IL8-	13	5	38,5	6 – 170	93	0,9
PR+IL8-	9	3	33,3	5 – 170	35	
PR-IL8-	13	5	38,5	6 – 170	93	0,6
PR+IL8+	12	3	25	13 – 171	85	
PR-IL8+	12	7	58,3	4 – 160	19	0,3
PR+IL8-	9	3	33,3	5 – 170	35	
PR-IL8+	12	7	58,3	4 – 160	19	0,06
PR+IL8+	12	3	25	13 – 171	85	

PR-, PR < 20 fmol/mg; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg; IL8-, IL8 < 9,15 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 9,15 pg/mg.

Prema rezultatima u tabeli 34., iako su u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa PR+ statusom imale manji procenat relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa PR- statusom i to bez obzira na IL8 status, ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Tabela 35. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu HER2 statusa i medijane koncentracije IL8

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
HER2-IL8-	12	6	50	5 – 170	70	0,6
HER2-IL8+	12	4	33,3	4 – 158	53	
HER2+IL8-	6	2	33,3	9 – 170	95	0,9
HER2+IL8+	7	2	28,6	8 – 171	81	
HER2-IL8-	12	6	50	5 – 170	70	0,6
HER2+IL8-	6	2	33,3	9 – 170	95	
HER2-IL8-	12	6	50	5 – 170	70	0,5
HER2+IL8+	7	2	28,6	8 – 171	81	
HER2-IL8+	12	4	33,3	4 – 158	53	0,97
HER2+IL8-	6	2	33,3	9 – 170	95	
HER2-IL8+	12	4	33,3	4 – 158	53	0,8
HER2+IL8+	7	2	28,6	8 – 171	81	

HER2-, odsustvo amplifikacije HER2 gena; HER2+, prisustvo amplifikacije HER2 gena;  
 IL8-, IL8 < 9,15 pg/mg; IL8+, IL8 ≥ 9,15 pg/mg.

Iz tabele 35. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Značaj kombinacije receptora i MMP2 za predikciju odgovora na hormonsku terapiju, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju (tamoksifen) grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane koncentracije MMP2 (tabele 36., 37. i 38.).

Tabela 36. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu ER statusa i medijane koncentracije MMP2

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
ER–MMP2–	6	4	66,7	4 – 159	17	0,7
ER–MMP2+	7	5	71,4	9 – 156	63	
ER+MMP2–	17	5	29,4	5 – 171	66	0,7
ER+MMP2+	17	6	35,3	6 – 170	81	
ER–MMP2–	6	4	66,7	4 – 159	17	0,07
ER+MMP2–	17	5	29,4	5 – 171	66	
ER–MMP2–	6	4	66,7	4 – 159	17	0,2
ER+MMP2+	17	6	35,3	6 – 170	81	
ER–MMP2+	7	5	71,4	9 – 156	63	0,1
ER+MMP2–	17	5	29,4	5 – 171	66	
ER–MMP2+	7	5	71,4	9 – 156	63	0,2
ER+MMP2+	17	6	35,3	6 – 170	81	

ER–, ER < 10 fmol/mg; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg;

MMP2–, MMP2 < 11,55 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 11,55 ng/mg.

Prema rezultatima u tabeli 36., u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa ER+ statusom su imale manji procenat relapsa i duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa ER– statusom, i to bez obzira na MMP2 status. Međutim ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Tabela 37. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu PR statusa i medijane koncentracije MMP2

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
PR–MMP2–	14	7	50	4 – 159	26	0,7
PR–MMP2+	12	7	58,3	6 – 170	45	
PR+MMP2–	9	2	22,2	5 – 171	74	0,7
PR+MMP2+	12	4	33,3	9 – 164	72	
PR–MMP2–	14	7	50	4 – 159	26	0,2
PR+MMP2–	9	2	22,2	5 – 171	74	
PR–MMP2–	14	7	50	4 – 159	26	0,3
PR+MMP2+	12	4	33,3	9 – 164	72	
PR–MMP2+	12	7	58,3	6 – 170	45	0,1
PR+MMP2–	9	2	22,2	5 – 171	74	
PR–MMP2+	12	7	58,3	6 – 170	45	0,2
PR+MMP2+	12	4	33,3	9 – 164	72	

PR–, PR < 20 fmol/mg; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg;

MMP2–, MMP2 < 11,55 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 11,55 ng/mg.

Prema rezultatima u tabeli 37., u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa PR+ statusom su imale manji procenat relapsa i duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa PR– statusom, i to bez obzira na MMP2 status. Međutim ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Tabela 38. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu HER2 statusa i medijane koncentracije MMP2

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
HER2–MMP2–	13	6	46,1	4 – 159	26	0,6
HER2–MMP2+	13	6	46,1	6 – 170	66	
HER2+MMP2–	4	1	25	35 – 171	150	0,8
HER2+MMP2+	8	2	25	8 – 164	53	
HER2–MMP2–	13	6	46,1	4 – 159	26	0,3
HER2+MMP2–	4	1	25	35 – 171	150	
HER2–MMP2–	13	6	46,1	4 – 159	26	0,4
HER2+MMP2+	8	2	25	8 – 164	53	
HER2–MMP2+	13	6	46,1	6 – 170	66	0,4
HER2+MMP2–	4	1	25	35 – 171	150	
HER2–MMP2+	13	6	46,1	6 – 170	66	0,5
HER2+MMP2+	8	2	25	8 – 164	53	

HER2–, odsustvo amplifikacije HER2 gena; HER2+, prisustvo amplifikacije HER2 gena;  
MMP2–, MMP2 < 11,55 ng/mg; MMP2+, MMP2 ≥ 11,55 ng/mg.

Iz tabele 38. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Značaj kombinacije receptora i MMP9 za predikciju odgovora na hormonsku terapiju, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju (tamoksifen) grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane koncentracije MMP9 (tabele 39., 40. i 41.).



Tabela 39. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu ER statusa i medijane koncentracije MMP9

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
ER–MMP9–	7	4	57,1	9 – 159	66	0,8
ER–MMP9+	5	3	60	11 – 154	63	
ER+MMP9–	14	4	28,6	5 – 170	54	0,4
ER+MMP9+	17	4	23,5	8 – 171	110	
ER–MMP9–	7	4	57,1	9 – 159	66	0,5
ER+MMP9–	14	4	28,6	5 – 170	54	
ER–MMP9–	7	4	57,1	9 – 159	66	0,1
ER+MMP9+	17	4	23,5	8 – 171	110	
ER–MMP9+	5	3	60	11 – 154	63	0,4
ER+MMP9–	14	4	28,6	5 – 170	54	
ER–MMP9+	5	3	60	11 – 154	63	0,1
ER+MMP9+	17	4	23,5	8 – 171	110	

ER–, ER < 10 fmol/mg; ER+, ER ≥ 10 fmol/mg;

MMP9–, MMP9 < 2,51 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 2,51 ng/mg.

Prema rezultatima u tabeli 39., u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa ER+ statusom su imale manji procenat relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa ER– statusom, i to bez obzira na MMP9 status, međutim ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Tabela 40. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu PR statusa i medijane koncentracije MMP9

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseći)</i>	<i>medijana RFS (meseći)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
PR–MMP9–	11	4	36,4	15 – 159	81	0,9
PR–MMP9+	11	4	36,4	8 – 170	96	
PR+MMP9–	10	4	40	5 – 170	35	0,3
PR+MMP9+	11	3	27,3	13 – 171	89	
PR–MMP9–	11	4	36,4	15 – 159	81	0,6
PR+MMP9–	10	4	40	5 – 170	35	
PR–MMP9–	11	4	36,4	15 – 159	81	0,6
PR+MMP9+	11	3	27,3	13 – 171	89	
PR–MMP9+	11	4	36,4	8 – 170	96	0,8
PR+MMP9–	10	4	40	5 – 170	35	
PR–MMP9+	11	4	36,4	8 – 170	96	0,6
PR+MMP9+	11	3	27,3	13 – 171	89	

PR–, PR < 20 fmol/mg; PR+, PR ≥ 20 fmol/mg;

MMP9–, MMP9 < 2,51 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 2,51 ng/mg.

Iz tabele 40. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Tabela 41. Procenat relapsa, vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) i p-vrednost (Log Rank test) kod pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu HER2 statusa i medijane koncentracije MMP9

<i>biomarkeri</i>	<i>n</i>	<i>broj relapsa</i>	<i>% relapsa</i>	<i>RFS (meseci)</i>	<i>medijana RFS (meseci)</i>	<i>p-vrednost (Log Rank)</i>
HER2–MMP9–	12	5	41,7	5 – 159	51	0,5
HER2–MMP9+	12	4	33,3	9 – 170	81	
HER2+MMP9–	7	3	42,9	9 – 170	81	0,8
HER2+MMP9+	5	1	20	8 – 171	26	
HER2–MMP9–	12	5	41,7	5 – 159	51	0,8
HER2+MMP9–	7	3	42,9	9 – 170	81	
HER2–MMP9–	12	5	41,7	5 – 159	51	0,5
HER2+MMP9+	5	1	20	8 – 171	26	
HER2–MMP9+	12	4	33,3	9 – 170	81	0,7
HER2+MMP9–	7	3	42,9	9 – 170	81	
HER2–MMP9+	12	4	33,3	9 – 170	81	0,9
HER2+MMP9+	5	1	20	8 – 171	26	

HER2–, odsustvo amplifikacije HER2 gena; HER2+, prisustvo amplifikacije HER2 gena;  
MMP9–, MMP9 < 2,51 ng/mg; MMP9+, MMP9 ≥ 2,51 ng/mg.

Iz tabele 41. se vidi da ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

## **5. DISKUSIJA**

### ***5.1. Raspodela koncentracija biomarkera u odnosu na kliničko-patološke parametre i analiza uzajamnih odnosa koncentracija biomarkera***

Interleukin 8 i matriksne metaloproteinaze 2 i 9 kao potencijalni molekularni biomarkeri prognoze i predikcije bi trebalo da budu u direktnoj relaciji sa nepovoljnim kliničko-patološkim parametrima. Prema dostupnim literaturnim podacima, u različitim tipovima humanih kancera povišena ekspresija interleukina 8 i matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u tkivu primarnog tumora i/ili serumu pacijenata je u direktnoj relaciji sa invazivnim potencijalom tumora. Prema našim rezultatima, pacijentkinje sa invazivnim duktalnim karcinomom su imale statistički značajno više koncentracije IL8 i MMP9 u tkivu tumora dojke u poređenju sa pacijentkinjama sa invazivnim lobularnim karcinomom (tabele 4. i 6.). Ovi rezultati su u saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima, s obzirom da pacijentkinje sa invazivnim duktalnim karcinomom generalno imaju agresivniji tok bolesti u poređenju sa pacijentkinjama sa invazivnim lobularnim karcinomom (Ellis i sar., 1992, Wasif i sar., 2010). Prema našim rezultatima, raspodela koncentracija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u odnosu na nodalni status nije bila statistički značajna, dok su pacijentkinje sa N0 statusom imale statistički značajno više koncentracije IL8 u tkivu tumora dojke u poređenju sa pacijentkinjama sa N+ statusom (tabele 4. i 6.). Međutim literaturni podaci ukazuju da bi interleukin 8 i matriksne metaloproteinaze 2 i 9 mogli doprineti metastaziranju karcinoma dojke u regionalne limfne čvorove. Zheng i saradnici su pokazali da je ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u tkivu tumora dojke značajno povišena kod pacijentkinja sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima u poređenju sa pacijentkinjama sa N0 statusom (Zheng i sar., 2010). Wu i saradnici su pokazali da pacijentkinje sa povišenom ekspresijom MMP9 u tkivu tumora dojke i serumu imaju metastaze u regionalnim limfnim čvorovima i uznapredovali klinički stadijum bolesti (Wu i sar., 2008). Liu i saradnici su pokazali da je ekspresija IL8 i MMP9 značajno povišena u tkivu tumora i serumu pacijenata sa uznapredovalim kliničkim stadujumom nesitnoćelijskog karcinoma pluća kao i kod pacijenata sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima u odnosu na pacijente sa N0 statusom (Liu i sar., 2010). Prema ovim

autorima, povišena koncentracija IL8 u serumu pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća bi mogla biti indikator prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (Liu i sar., 2010). Literaturni podaci ukazuju da je IL8 marker invazivnog i metastatskog potencijala tumora dojke. Benoy i saradnici su pokazali da su nivoi IL8 značajno povišeni u serumu pacijentkinja sa N+ karcinomom dojke u poređenju sa pacijentkinjama sa N0 statusom (Benoy i sar., 2004). Ahmed i saradnici su pokazali da su nivoi interleukina 6 i 8 značajno povišeni u serumu pacijentkinja sa T3 veličinom tumora dojke, više od 3 pozitivna regionalna limfna čvora i više od jedne udaljene metastaze, u poređenju sa pacijentkinjama sa T1/T2 veličinom tumora, do 3 pozitivna regionalna limfna čvora i jednom udaljenom metastazom (Ahmed i sar., 2006). S obzirom da su prema našim rezultatima pacijentkinje sa N0 statusom imale statistički značajno više koncentracije IL8 u tkivu tumora dojke u poređenju sa pacijentkinjama sa N+ statusom (tabela 4.), moguće je da je doprinos interleukina 8 rastu i progresiji tumora izraženiji u ranijim fazama karcinoma dojke, pre metastatskog širenja u regionalne limfne čvorove. Prema našim rezultatima manji tumori dojke su imali statistički značajno više koncentracije MMP2 u odnosu na veće tumore (tabela 5.), što se može objasniti nezavisnošću invazivnog i metastatskog potencijala tumora od njegove veličine, odnosno činjenicom da i vrlo mali tumori mogu imati visok invazivni i metastatski potencijal (Klein, 2009). Prema našim rezultatima, tumori dojke gradusa G1 i G2 su imali statistički značajno više koncentracije MMP2 u odnosu na tumore gradusa G3 (tabela 5.), dok su drugi autori pokazali suprotno, da je ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 značajno povišena u tumorima dojke višeg gradusa (Sullu i sar., 2011). Li i saradnici su pokazali da je ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 povišena u tumorima dojke višeg gradusa i većim tumorima (Li i sar., 2004). Stanković i saradnici su pokazali da je serumska aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 značajno povišena kod pacijentkinja sa uznapredovalim kliničkim stadijumom karcinoma dojke i kod pacijentkinja sa većim tumorima (Stanković i sar., 2010).

Analizom uzajamnih korelacija između koncentracija hormonskih receptora i potencijalnih biomarkera (tabela 7.), dobijena je statistički značajna pozitivna korelacija između koncentracija hormonskih receptora (ER i PR) i statistički značajna negativna

korelacija između koncentracija hormonskih receptora i interleukina 8 (ER i IL8, PR i IL8). Uočena pozitivna korelacija između koncentracija ER i PR u ovoj studiji je u saglasnosti sa poznatom činjenicom da je ekspresija PR indikator funkcionalnosti estrogenog receptora. Između koncentracija hormonskih receptora i matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 nisu dobijene statistički značajne korelacije (tabela 7.). O inverznoj relaciji između koncentracija hormonskih receptora i interleukina 8 biće diskutovano kasnije (poglavlje 5.2.2.1.).

Analizom uzajamnih odnosa koncentracija potencijalnih biomarkera, dobijena je statistički značajna pozitivna korelacija između koncentracija IL8 i MMP9 (tabela 7.) i raspodela koncentracija IL8 u odnosu na MMP9 status pokazuje statističku značajnost (tabela 8., slika 7.). Raspodela koncentracija MMP9 u odnosu na IL8 status bila je na granici statističke značajnosti (tabela 10.), što ukazuje da bi se možda mogla dobiti drugačija statistička značajnost u studiji sa većim brojem pacijentkinja. Dakle, pacijentkinje sa višim koncentracijama IL8 u tkivu tumora dojke su imale više koncentracije MMP9, i obrnuto. Liu i saradnici su pokazali da su koncentracije IL8 i MMP9 u tkivu tumora pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća u značajnoj pozitivnoj korelaciji (Liu i sar., 2010). Biasi i saradnici su pokazali da je nivo IL8 u serumu pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u progresivnom porastu počev od stadijuma II bolesti i da se paralelno povećava i serumska aktivnost MMP9. Zapravo, rastući trend ova dva serumska biomarkera bio je u značajnoj pozitivnoj korelaciji (Biasi i sar., 2012). *In vitro* istraživanja su pokazala da IL8 povećava invazivni i metastatski potencijal ćelijskih linija melanoma tako što stimuliše ekspresiju i aktivaciju MMP2 (Luca i sar., 1997). CAT (hloramfenikol acetiltransferaza) eseji bazirani na pozicioniranju MMP2 promotora ushodno od CAT reporterskog gena, pokazali su da je CAT aktivnost povećana u ćelijama transfektovanim sa IL8 (Luca i sar., 1997). *In vitro* istraživanja su pokazala da IL8 povećava invazivni i metastatski potencijal ćelijskih linija karcinoma prostate tako što stimuliše ekspresiju i aktivaciju MMP9 (Inoue i sar., 2000). Istraživanja na ćelijskim linijama karcinoma mokraćne bešike su pokazala da humano antitelo na IL8 suprimira transkripciju, ekspresiju i aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 (Mian i sar., 2003). Mian i saradnici su pokazali da antitelo čoveka na IL8 smanjuje invazivni potencijal ćelija *in vitro* dok nema

uticaja na ćelijsku proliferaciju *in vitro* i inhibira rast tumora beške u mišjem modelu *in vivo*. Wang i saradnici su pokazali da IL8 povećava invazivni i metastatski potencijal ćelijskih linija karcinoma jajnika i interleukinom 8 indukovana ćelijska invazivnost bila je u direktnoj relaciji sa ekspresijom i aktivnošću matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 (Wang i sar., 2012). Novija istraživanja na ćelijskim linijama adenokarcinoma pluća su pokazala da antigeni humanog papiloma virusa (HPV) stimulišu ekspresiju IL8, zatim ekspresiju i aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 i 9, kao i da je povišena ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 posledica virusom stimulisane ekspresije IL8 (Shiau i sar., 2013). Inhibicija virusom stimulisane ekspresije IL8 kombinovanim tretmanom antitelom na IL8 i malim interferirajućim RNK za IL8, imala je za posledicu redukciju nivoa matriksnih metaloproteinaza 2 i 9. *In vitro* istraživanja su pokazala da IL8 stimuliše proliferaciju, preživljavanje i ekspresiju matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u CXCR1+/CXCR2+ humanim endotelnim ćelijama (Li i sar., 2003). Inkubacijom endotelnih ćelija sa IL8 bila je inhibirana apoptoza i stimulisana ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 na nivou iRNK i proteina. *In vitro* istraživanja na imunološkim ćelijama su pokazala da IL8 stimuliše sekreciju MMP9 iz granula neutrofila aktivacijom CXCR2 i nishodnih kinaznih kaskada (PKC/ERK1/2 i Src kinaza) (Chakrabarti i Patel, 2005). Poznato je da različite forme IL8 imaju različiti potencijal za hemoatrakciju neutrofila. Van den Steen i saradnici su pokazali da MMP9 višestruko povećava hemotaksičnu aktivnost interleukina 8 procesovanjem njegovog amino terminusa (Van den Steen i sar., 2000).

Imajući sve navedeno u vidu, može se pretpostaviti da je postojanje pozitivne relacije i/ili pozitivne korelacije između koncentracija IL8 i MMP9 karakteristika većine tipova humanih kancera, uključujući i karcinom dojke. To ukazuje da bi eventualno postojanje pozitivne sprege između IL8 i MMP9 moglo doprineti progresiji hormonski zavisnog karcinoma dojke. Poznato je da IL8 doprinosi rastu i progresiji tumora direktno – delujući kao mitogeni i angiogenezni faktor, i indirektno – preko hemotaksične infiltracije neutrofila i monocita/makrofaga na mesto tumora, koji i sami produkuju faktore rasta, faktore angiogeneze i proteaze. Poznato je da MMP9 degraduje komponente bazalnih membrana i vanćelijskog matriksa i oslobađa citokine/hemokine, faktore rasta i faktore angiogeneze vezane za matriks. Pored važne efektorne uloge u migraciji ćelija tumora,



MMP9 ima i važnu regulatornu ulogu, s obzirom da proteolizom reguliše aktivnost brojnih citokina/hemokina uključujući IL8, stimuliše angiogenezu, rast i progresiju tumora.

## **5.2. Analiza prognostičkog i prediktivnog značaja potencijalnih biomarkera**

Karcinom dojke je heterogeno oboljenje na histološkom, biohemijskom i molekularnom nivou, što rezultira veoma heterogenim tokom bolesti i otežava predviđanje pojave udaljenih metastaza. Kao što je ranije pomenuto, u studiju je bilo uključeno 150 postmenopauzalnih pacijentkinja sa primarnim operabilnim karcinomom dojke (klinički stadijum I/II) i detektabilnim nivoima hormonskih receptora (ER>0, PR>0) što bi trebalo da ukazuje na hormonski zavisni karcinom. Hormonski receptori su još uvek jedni od najpouzdanijih parametara prognoze i predikcije u karcinomu dojke. Iako pacijentkinje sa ER+PR+ karcinomom dojke generalno imaju dobru prognozu usled manje invazivnog i agresivnog toka bolesti (Clark i sar., 1983, Dunnwald i sar., 2007), i pored toga su klinički ishod pacijentkinja i odgovor na hormonsku terapiju varijabilni. Hormonski receptori su glavni, ali ne i sasvim pouzdni, indikatori predikcije odgovora na hormonsku terapiju, s obzirom da dodatne molekularne alteracije imaju uticaja na senzitivnost ćelija tumora na tamoksifen (Rudas i sar., 2008). Pošto određeni procenat pacijentkinja pokazuje rezistenciju na tamoksifen (*de novo* ili kasnije u toku terapije) postoji potreba da se utvrde mehanizmi i biomarkeri koji bi omogućili bolje razumevanje ovog fenomena. Uključivanje HER2 u klasifikaciju karcinoma dojke zajedno sa steroidnim receptorima i drugim kliničko-patološkim parametrima, samo je donekle pomoglo utvrđivanju preciznijeg prognostičkog profila, odnosno pokazalo se nedovoljnim i ostavilo potrebu za traženjem dodatnih, selektivnijih markera prognoze i predikcije. Kao što je ranije pomenuto, interleukin 8 i matriksne metaloproteinaze 2 i 9 su u novije vreme dosta ispitivani kao potencijalni biomarkeri prognoze i predikcije u različitim tipovima humanih kancera.

Pacijentkinje sa povoljnim kliničko-patološkim parametrima (N0 status) nakon operacije nisu primale terapiju, prema u to vreme važećem protokolu. S obzirom na odsustvo adjuvantne terapije, kod ovih pacijentkinja smo mogli da pratimo prirodni tok bolesti. O prirodnom toku bolesti karcinoma dojke ima vrlo malo literaturnih podataka, iz

razloga što je savremena klinička praksa takva da se svim pacijentkinjama daje neki oblik adjuvantne terapije i to bez obzira na status kliničko-patoloških parametara. Na osnovu prirodnog toka bolesti pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju, analizirali smo prognostički značaj odabranih biomarkera. To bi moglo doprineti rešavanju problema prevelike tretiranosti pacijentkinja sa povoljnim kliničko-patološkim parametrima (N0) koji danas postoji u kliničkoj praksi (Harbeck i Thomssen, 2011). Ostale pacijentkinje, pretežno sa pozitivnim nodalnim statusom (N+), bile su na adjuvantnoj hormonskoj terapiji tj. tamoksifenu i kod njih smo mogli da pratimo odgovor na hormonsku terapiju. Na osnovu kliničkog toka bolesti pacijentkinja koje su primale tamoksifen, analizirali smo prediktivni značaj (efikasnost ili rezistencija za terapiju tamoksifenom) odabranih biomarkera. Tok bolesti pacijentkinja je praćen od hirurške intervencije do pojave relapsa, što je definisano kao vreme preživljavanja do pojave relapsa (engl. relapse-free survival, RFS, Punt i sar., 2007). Prema našim rezultatima, postoji statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja do pojave relapsa (RFS) između pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju i pacijentkinja koje su primale tamoksifen (tabela 11., slika 8.). Pacijentkinje koje nisu primale adjuvantnu terapiju su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama koje su primale tamoksifen. Dakle, pacijentkinje sa povoljnim kliničko-patološkim parametrima (N0) su imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa manje povoljnim kliničko-patološkim parametrima (pretežno N+). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima prema kojima je nodalni status najznačajniji, mada ne i sasvim pouzdan, nezavisni parametar prognoze (Singletary i sar., 2002).

### **5.2.1. Analiza prognostičkog i prediktivnog značaja kliničko-patoloških parametara**

Od dostupnih kliničko-patoloških parametara kao statistički značajni za praćenje prirodnog toka bolesti pokazali su se veličina tumora i histopatološki tip tumora (tabela 12.). Pacijentkinje sa manjim tumorima su imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa većim tumorima (slika 9a.) što je u saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima (Carter i sar., 1989, Fitzgibbons i sar., 2000). Najzastupljeniji

histopatološki tipovi karcinoma u ovoj studijskoj grupi su bili invazivni duktalni i invazivni lobularni, dok su ostali tipovi bili procentualno dosta manje zastupljeni. Prema našim rezultatima, pacijentkinje sa duktalnim karcinomom su imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa lobularnim karcinomom (slika 9b.). Velika klinička studija koja je obuhvatila preko 250 000 pacijentkinja pokazala je da pacijentkinje sa lobularnim karcinomom dojke generalno imaju bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa duktalnim karcinomom (Wasif i sar., 2010). Analizom raspodele veličine tumora i histološkog gradusa u odnosu na različite histopatološke tipove (duktalni vs lobularni), utvrdili smo da ne postoji statistički značajna razlika u raspodeli različitih veličina i gradusa tumora u okviru pomenutih histopatoloških tipova. Time smo potvrdili da dobijena nepovoljna prognoza pacijentkinja sa lobularnim karcinomom (slika 9b.) ne potiče od prisustva tumora sa većim dimenzijama odnosno tumora višeg gradusa. Heterogenost karcinoma dojke se ogleda i postojanjem značajnog broja različitih histopatoloških subtipova. Ellis i saradnici su pokazali da pacijentkinje sa klasičnim lobularnim, tubulo-lobularnim i mešovitim lobularnim karcinomom imaju bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa duktalnim karcinomom. Izuzetak su predstavljale pacijentkinje sa solidnim lobularnim karcinomom koje su imale lošiju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa duktalnim karcinomom (Ellis i sar., 1992). Fitzgibbons i saradnici su ukazali da samo pacijentkinje sa klasičnim lobularnim karcinomom koji čini svega 4% karcinoma dojke, imaju bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa duktalnim karcinomom (Fitzgibbons i sar., 2000). Dakle, moguće je da različiti subtipovi lobularnog karcinoma koji nisu definisani za našu studijsku grupu i koje nije moguće naknadno definisati, imaju uticaja na dobijeni rezultat.

Prema našim rezultatima, receptori (ER, PR, HER2) se nisu pokazali kao statistički značajni prognostički markeri za praćenje prirodnog toka bolesti (tabela 12.), što nije u saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima prema kojima bi pacijentkinje sa pozitivnim statusom hormonskih receptora i odsustvom amplifikacije HER2 gena trebalo da imaju bolju prognozu (Clark i sar., 1983, Slamon i sar., 1987, Dunnwald i sar., 2007). Od dostupnih kliničko-patoloških parametara, jedino se status estrogenog receptora pokazao kao statistički značajan za predikciju odgovora na hormonsku terapiju (tabela 27.).

Prema našim rezultatima, ER+ status se pokazao kao indikator senzitivnosti na tamoksifen (slika 16.) što je u saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima. Poznato je da je hormonska terapija najefikasniji oblik adjuvantne terapije kod pacijentkinja sa ER+ karcinomom dojke. Hormonski receptori su glavni, ali ne i sasvim pouzdani, indikatori senzitivnosti na hormonsku terapiju. Hormonska terapija je efikasna kod 60% pacijentkinja sa ER+ karcinomom dojke, odnosno kod 70-75% pacijentkinja sa ER+PR+ karcinomom dojke (Brooks i sar., 1980). Dalju selekciju pacijentkinja sa hormonski zavisnim karcinomom dojke trebalo bi izvršiti na osnovu dodatnih, selektivnijih biomarkera.

### **5.2.2. Analiza prognostičkog i prediktivnog značaja interleukina 8**

Od potencijalnih biomarkera jedino je IL8 pokazao prognostički značaj za praćenje prirodnog toka bolesti pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju (tabela 14.). Pacijentkinje sa nižim nivoima IL8 u tkivu tumora dojke su imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa višim nivoima IL8 (slika 10.). Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije IL8 i MMP2 (tabela 15.), pokazali smo da su pacijentkinje sa IL8– statusom imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa IL8+ statusom, i to bez obzira na MMP2 status. Tako su pacijentkinje sa IL8–MMP2– i IL8–MMP2+ fenotipovima imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa IL8+MMP2– fenotipom (slika 11.). Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije IL8 i MMP9 (tabela 16.), ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Prema našim rezultatima, nijedan od potencijalnih biomarkera nije pokazao značaj za predikciju odgovora (efikasnost ili rezistencija) na hormonsku terapiju (tabela 29.). Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane koncentracije IL8 i MMP2/MMP9 (tabele 30. i 31.), ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Literaturni podaci ukazuju na značaj IL8 kao potencijalnog biomarkera u različitim tipovima humanih kancera. Kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika, nivoi IL8 su povišeni u cističnom fluidu, abdominalnom fluidu, serumu i tkivu tumora i povišena ekspresija IL8 je u direktnoj relaciji sa lošom prognozom (Wang i sar., 2012). Kod pacijentkinja sa endometrijalnim karcinomom, ekspresija IL8 i CXCR1/CXCR2 receptora je značajno povišena u tkivu tumora endometrijuma u odnosu na tkivo endometrijuma zdravih žena (Ewington i sar., 2012) i povišena ekspresija IL8 u tkivu tumora endometrijuma je u direktnoj relaciji sa lošom prognozom (Mannelqvist i sar., 2011). Ekspresija IL8 i MMP9 u serumu i tkivu pluća je značajno povišena kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća u odnosu na pacijente sa benignom respiratornom bolešću i zdrave osobe (Liu i sar., 2010). Kao što je ranije pomenuto, ekspresija IL8 i MMP9 je značajno povišena u tkivu tumora i serumu pacijenata sa uznapredovalim kliničkim stadijumom karcinoma pluća i kod pacijenata sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (Liu i sar., 2010). Pine i saradnici su sprovedi dve velike kliničke studije koje su pokazale da su nivoi interleukina 6 i 8 znatno povišeni u serumu pacijenata sa karcinomom pluća u odnosu na zdrave osobe, kao i da su povišeni nivoi IL8 u serumu zdravih osoba u direktnoj relaciji sa povećanim rizikom od karcinoma pluća nekoliko godina pre dijagnoze (Pine i sar., 2011). Chen i saradnici su ukazali na značaj IL8 kao prognostičkog markera u adenokarcinomu pankreasa. Oni su pokazali da su nivoi IL8 u serumu pacijenata sa karcinomom pankreasa povišeni u odnosu na pacijente sa karcinomom u drugim delovima digestivnog trakta – karcinomom želuca, kolorektalnim i hepatocelularnim karcinomom. Dalje, transplantati tkiva adenokarcinoma pankreasa iz pacijenata sa višim nivoima IL8 u serumu rasli su brže u imunodeficientnim miševima u odnosu na transplantate iz pacijenata sa nižim nivoima IL8 u serumu (Chen i sar., 2012). Biasi i saradnici su pokazali da kod pacijenata sa kolorektalnim adenomom nivoi IL8 i MMP9 u serumu ostaju u okviru normalnog opsega, dok su kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom serumski nivoi IL8 i MMP9 u konstantnom porastu počev od stadijuma II (Biasi i sar., 2012). Reis i saradnici su pokazali da iako je ekspresija IL8 snižena u tkivu tumora mokraćne bešike u odnosu na tkivo bešike pacijenata sa benignim uvećanjem prostate, kod pacijenata sa karcinomom bešike IL8 se pokazao kao marker loše prognoze. Ekspresija IL8 u tkivu tumora bešike bila je višestruko

povišena kod pacijenata kod kojih je kasnije došlo do relapsa u odnosu na pacijente bez relapsa (Reis i sar., 2012). IL8 je identifikovan i kao najvažniji urinarni biomarker za detekciju karcinoma mokraćne bešike (Urquidi i sar., 2012). Poznato je da nazofaringealni karcinom ima najviši metastatski potencijal od svih kancera u regionu glave i vrata. Kod pacijenata sa nazofaringealnim karcinomom, IL8 iz tkiva primarnog tumora se pokazao kao nezavisni marker loše prognoze (Li i sar., 2012). Dodatno, Singh i saradnici su pokazali da je metastatski potencijal melanoma u direktnoj relaciji sa ekspresijom IL8 i CXCR1/CXCR2 u uzorcima melanoma (Singh i sar., 2010).

U cilju identifikacije najvažnijih citokina koji doprinose progresiji humanog karcinoma dojke, Lin i saradnici su razvili proteinske čipove (engl. protein arrays) za simultanu detekciju nivoa ekspresije više citokina *in vitro*, i u tom kontekstu IL8 je identifikovan kao najvažniji (Lin i sar., 2004). Malo je literaturnih podataka o IL8 kao potencijalnom markeru prognoze i predikcije u karcinomu dojke. Kozlowski i saradnici su pokazali da su nivoi interleukina 6, 8 i 10 značajno povišeni u serumu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na zdrave žene, kao i da pacijentkinje sa povišenim nivoima ovih hemokina u serumu imaju lošiju prognozu (Kozlowski i sar., 2003). Benoy i saradnici su pokazali da su nivoi IL8 značajno povišeni u serumu pacijentkinja sa metastatskim karcinomom dojke (M+) u poređenju sa pacijentkinjama sa nemetastatskim karcinomom. Serumski IL8 se pokazao kao nezavisni marker loše prognoze za postrelapsno preživljavanje pacijentkinja sa metastatskim karcinomom dojke (Benoy i sar., 2004). Derin i saradnici su pokazali da nema statistički značajne razlike između nivoa IL8 u serumu pacijentkinja sa karcinomom dojke i zdravih žena, ali da su nivoi IL8 znatno povišeni u serumu pacijentkinja sa metastatskim karcinomom dojke u poređenju sa pacijentkinjama sa nemetastatskim karcinomom (Derin i sar., 2007). Više autora je pokazalo da je IL8 povišeno eksprimiran na nivou iRNK i proteina u tumorima dojke u odnosu na kontrolno tkivo dojke (Green i sar., 1997, Chavey i sar., 2007). Snoussi i saradnici su pokazali da je prisustvo određenih varijantnih alela (polimorfizmi) u genima za IL8 i CXCR2 u direktnoj relaciji sa povećanim rizikom od karcinoma dojke, kao i lošom prognozom pacijentkinja sa karcinomom dojke (Snoussi i sar., 2010). Bieche i saradnici su analizirali prediktivni značaj više CXC hemokina iz tkiva tumora dojke kod pacijentkinja sa ER+ karcinomom dojke

koje su primale adjuvantnu hormonsku terapiju (tamoksifen). Na osnovu univarijantnih analiza preživljavanja, pacijentkinje sa sniženom ekspresijom IL1/IL3/IL8 u tkivu tumora dojke su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS), odnosno interleukini 1, 3 i 8 su se pokazali kao indikatori rezistencije na tamoksifen (Bieche i sar., 2007). Na osnovu multivarijantnih analiza preživljavanja, jedino je IL8 bio blizu statističke značajnosti u kontekstu nezavisnog indikatora rezistencije na tamoksifen (Bieche i sar., 2007). Iako se u našem radu nije pokazalo da IL8 ima prediktivni značaj, pacijentkinje sa IL8<sup>-</sup> statusom su imale manji procenat relapsa i duže vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) u poređenju sa pacijentkinjama sa IL8<sup>+</sup> statusom (tabela 29.), što ukazuje da bi imalo smisla sprovesti studiju sa većim brojem pacijentkinja koja bi eventualno pokazala prediktivni značaj IL8.

#### **5.2.2.1. Odnos interleukina 8 i receptora (ER/HER2)**

Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane IL8 (tabele 18., 19. i 20.), u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa IL8<sup>-</sup> statusom su imale manji procenat relapsa i duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa IL8<sup>+</sup> statusom, i to bez obzira na status receptora. Pri tom su pacijentkinje sa ER+IL8<sup>-</sup> fenotipom imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa ER+IL8<sup>+</sup> i ER<sup>-</sup>IL8<sup>+</sup> fenotipovima (slika 13.); pacijentkinje sa PR<sup>-</sup>IL8<sup>-</sup> fenotipom su imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa PR<sup>-</sup>IL8<sup>+</sup> i PR+IL8<sup>+</sup> fenotipovima (slika 14.); i pacijentkinje sa HER2<sup>-</sup>IL8<sup>-</sup> fenotipom su imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa HER2<sup>-</sup>IL8<sup>+</sup> i HER2+IL8<sup>+</sup> fenotipovima (slika 15.). Prema ovim rezultatima IL8 se pokazao kao pouzdaniji prognostički marker u odnosu na status receptora (ER, PR, HER2).

Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa hormonskih receptora i medijane IL8 (tabele 33. i 34.), u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa ER+/PR+ statusom su imale manji procenat relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup> statusom i to bez obzira na IL8 status. Pri tom su pacijentkinje sa ER+IL8<sup>-</sup> i

ER+IL8+ fenotipovima imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa ER–IL8+ fenotipom (slika 17). Prema ovim rezultatima status estrogenog receptora se pokazao kao pouzdaniji prediktivni marker u odnosu na interleukin 8. Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu HER2 statusa i medijane IL8 (tabela 35.), ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa.

Potpuno razumevanje hormonske regulacije karcinoma dojke do danas je ostalo nedovoljno istraženo i nerazjašnjeno. Stoga je važno ispitati uticaj hormona i/ili hormonskih receptora na ekspresiju različitih proinvazivnih biomarkera kao što su citokini, hemokini i proteaze. *In vitro* istraživanja su pokazala da IL8 višestruko povećava invazivni potencijal ER+ ćelijskih linija karcinoma dojke (Freund i sar., 2003), ali se malo zna o uticaju IL8 na tok bolesti pacijentkinja sa ER+ karcinomom dojke. U karcinomu dojke, najvažnija relacija interleukina 8 je sa ER i/ili HER2 statusom. Studije o potencijalnom značaju IL8 u odnosu na ER/HER2 status su malobrojne i kontroverzne. Literaturni podaci pokazuju da ER+ ćelijske linije karcinoma dojke imaju mali invazivni i metastatski potencijal i eksprimiraju niske nivoe više CXC hemokina uključujući IL8, dok ER– ćelijske linije imaju visok invazivni i metastatski potencijal i eksprimiraju visoke nivoe CXC hemokina (Bieche i sar., 2007, Yao i sar., 2007). Eseji transfekcije su pokazali da ekspresija ER u ER– ćelijskim linijama karcinoma dojke inhibira ekspresiju IL8 (Freund i sar., 2003, Lin i sar., 2004), što ukazuje da ER negativno reguliše gensku ekspresiju IL8. Freund i saradnici su pokazali da je povišena ekspresija IL8 u ER– ćelijskim linijama karcinoma dojke uglavnom posledica povišene ekspresije transkripcionih faktora NFκB i AP1 koji stimulišu transkripciju gena za IL8 (Freund i sar., 2004). Više autora je pokazalo da je ekspresija IL8 u tkivu tumora dojke u inverznoj relaciji sa ER statusom i direktnoj relaciji sa HER2 statusom. ELR+ CXC hemokine u koje spada i IL8 uglavnom eksprimiraju ER– tumori dojke (Bieche i sar., 2007, Chavey i sar., 2007). Ekspresija IL8 je povišena u HER2+ tumorima dojke (Chavey i sar., 2007). Sa druge strane, Bendrik i Dabrosin su tehnikom mikrodijalize pokazali značajnu pozitivnu korelaciju između nivoa estradiola i interleukina 8 u tkivu dojke i ER+PR+ karcinomu dojke *in vivo*. Oni su dalje pokazali da



estradiol povećava dok tamoksifen inhibira sekreciju IL8 *in vitro* i u tumorima imunodeficientnih miševa *in vivo* (Bendrik i Dabrosin, 2009). Azenshtein i saradnici su pokazali da EGF (HER2 ligand) povećava sekreciju IL8 u ćelijskim linijama karcinoma dojke, i da je taj efekat potenciran konsektivnim tretiranjem ćelija estrogenom i progesteronom (Azenshtein i sar., 2005). Haim i saradnici su pokazali da EGF i estrogen deluju aditivno na ekspresiju i sekreciju IL8 u ćelijskim linijama karcinoma dojke (Haim i sar., 2011).

Dakle, glavna kontroverza oko odnosa ER i IL8 je da je ekspresija IL8 u inverznoj relaciji sa ER statusom (ER inhibira ekspresiju IL8), ali su zato nivoi IL8 i estradiola u pozitivnoj korelaciji (estradiol stimuliše ekspresiju IL8). Ovo je isti paradoks kao i sa estrogenom i njegovim receptorom – estrogen je potentni faktor rasta i progresije karcinoma dojke, ali pacijentkinje sa ER– karcinomom dojke imaju lošiju prognozu. Iako je ekspresija IL8 u inverznoj relaciji sa ER statusom, IL8 može da poveća invazivni potencijal ER+ ćelija karcinoma dojke. Bilo bi interesantno ispitati da li inverzna relacija između ER i IL8 ima uticaja na efikasnost hormonske terapije. Iako je prisustvo ER preduslov za hormonsku terapiju (tamoksifen), rezistencija na tamoksifen (*de novo* i stečena) je dugo poznati i nerešeni problem. Blokiranjem estrogenog receptora, tamoksifen bi mogao da ima uticaja na ekspresiju faktora rasta i citokina koji su regulisani estrogenim receptorom, tzv. ER+ kancerski ekspresioni profil. Kod ER+ karcinoma dojke, ako ER inhibira ekspresiju IL8 (nezavisno od efekta estrogena) i tamoksifen blokira efekte estrogenog receptora, moglo bi se zaključiti da u toku terapije tamoksifen postepeno dovodi do povećanja ekspresije IL8, različitim mehanizmima. Kod pacijentkinja na hormonskoj terapiji rizik od relapsa opada, mada taj rizik zavisi od sposobnosti postojećih ćelija tumora da sekretuju solubilne medijatore (faktori rasta, citokini, hemokini) koji bi mogli da stimulišu razvoj rezistentnog ćelijskog fenotipa sa povećanim invazivnim i metastatskim potencijalom. Ako je to tačno, onda bi IL8 mogao biti uzrok i indikator rezistencije na tamoksifen, kao sastavni deo interleukinom 8 posredovane progresije karcinoma dojke. Do danas ima samo nekoliko studija koje se odnose na ovu problematiku. Wang i saradnici su pokazali na ćelijskim linijama karcinoma jajnika da je ekspresija interleukina 6 i 8 u inverznoj relaciji sa osetljivošću ćelija na tamoksifen (Wang i sar., 2010). Dugotrajno izlaganje ćelijskih

linija karcinoma dojke antiestrogenima (tamoksifen) indukuje sticanje rezistentnog i agresivnog ćelijskog fenotipa koji, između ostalog, povišeno eksprimira IL8 (Hayes i sar., 2011). Samo jedna studija na pacijentkinjama sa karcinomom dojke je pokazala suprotno, da su serumski nivoi nekoliko citokina uključujući IL8 bili značajno redukovani nakon jednogodišnje terapije tamoksifenom (Premkumar i sar., 2007).

Interakcije između signalnih puteva estrogenog receptora i različitih faktora rasta kao što je HER2, su kompleksne i bidirekzione. S obzirom da ova dva receptora imaju potencijal da koaktiviraju jedan drugog u ER+HER2+ karcinomu dojke, očekivani neto efekat njihovog uzajamnog delovanja bi bio povećanje proliferacije i preživljavanja ćelija tumora. U kontekstu prognoze i predikcije karcinoma dojke, interakcije između ER i HER2 se često smatraju za glavne molekularne mehanizme rezistencije na različite tipove terapija. U tom kontekstu, uloga IL8 bi mogla biti važna u rastu i progresiji HER2+ karcinomu dojke koji je po pravilu rezistentan na antiestrogene. Wen i saradnici su prvi pokazali *in vitro* i na mišijim modelima *in vivo* da je ekspresija IL8 direktno stimulirana aktivacijom HER2 receptora i nishodnih PI3K/Akt kinaznih kaskada (Wen i sar., 2006). Vazquez-Martin i saradnici su za identifikaciju gena/proteina koji su diferencijalno ekspimirani u HER2+ karcinomu dojke koristili proteinske ereje kojima su simultano detektovali preko 40 citokina i faktora rasta. Oni su pokazali da su nivoi interleukina 1 i 8 značajno povišeni u serumu pacijentkinja sa HER2+ karcinomom dojke, kao i da je ekspresija interleukina 1 i 8 višestruko povišena u MCF7 ćelijama transfektovanim sa HER2 (Vazquez-Martin i sar., 2008). Vazquez-Martin i saradnici su prvi ukazali da bi povećana ekspresija IL8, koja je povezana sa inaktivacijom ER, mogla predstavljati mehanizam rezistencije na hormonsku terapiju kod pacijentkinja sa HER2+ karcinoma dojke. Aceto i saradnici su ispitivali efekte koekspresije i aktivacije HER2 i HER3 na genske ekspresione profile ćelijskih linija karcinoma dojke i pokazali da je među 80 povišeno ekspimiranih gena, ekspresija IL8 višestruko povećana. Pretragom javnih baza podataka ukazali su da je IL8 povišeno ekspimiran kod HER2+ i bazalnih molekularnih subtipova karcinoma dojke koje karakteriše izrazito loša prognoza (Aceto i sar., 2012). Kao što je ranije pomenuto, Haim i saradnici su pokazali da EGF i estrogen deluju aditivno na ekspresiju i sekreciju IL8 u ćelijskim linijama karcinoma dojke. Stimulacija ćelija epidermalnim faktorom rasta

stimuliše ekspresiju IL8 preko HER2, HER1, MAPK i PI3K/Akt signalnih puteva, dok stimulacija ćelija estrogenom aktivira HER2 i MAPK signalne puteve (Haim i sar., 2011). Dodavanje estrogena epidermalnom faktoru rasta dovodi do delimičnog (HER2, HER1, MAPK) ili potpunog (PI3K/Akt) isključivanja navedenih signalnih puteva u stimulaciji IL8. Prilikom kostimulacije, estrogen reguliše transkripciju gena za IL8 preko ER dok EGF deluje nezavisno na stimulaciju transkripcije gena za IL8 preko AP1 (Haim i sar., 2011). Nezavisno delovanje estrogena i EGF na regulaciju transkripcije gena za IL8 ukazuje na potrebu simultanog ciljanja ER i HER2. Dakle, ekspresija IL8 koja je zavisna od kompleksnih interakcija signalnih puteva ER i HER2, može imati uticaja na prognozu i predikciju karcinoma dojke. U kontekstu hormonske terapije (tamoksifen), multidirekciono interakcije između ER, HER2 i IL8 mogu imati uticaja na efikasnost terapije.

### **5.2.3. Analiza prognostičkog i prediktivnog značaja matriksnih metaloproteinaza 2 i 9**

Matriksne metaloproteinaze 2 i 9 nisu pokazale prognostički značaj za praćenje prirodnog toka bolesti pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju (tabela 14.). Prema našim rezultatima MMP9 je pokazao trend markera loše prognoze, s obzirom da su pacijentkinje sa MMP9– statusom imale manji procenat relapsa i duže vreme preživljavanja do pojave relapsa (RFS) u poređenju sa pacijentkinjama sa MMP9+ statusom. Sa druge strane MMP2 je pokazao trend markera dobre prognoze, s obzirom da su pacijentkinje sa MMP2+ statusom imale manji procenat relapsa i duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa MMP2– statusom. Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane MMP2 i MMP9 (tabela 17.), pacijentkinje sa MMP2–MMP9– fenotipom su imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa MMP2–MMP9+ fenotipom (slika 12.).

Kao što je ranije pomenuto, nijedan od potencijalnih biomarkera nije pokazao značaj za predikciju odgovora (efikasnost ili rezistencija) na hormonsku terapiju (tabela 29.). Poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu medijane MMP2 i MMP9,

ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa (tabela 32.).

Literaturni podaci o matriksnim metaloproteinazama 2 i 9 kao potencijalnim biomarkerima u različitim tipovima humanih kancera su kontradiktorni. Više autora je ukazalo da je MMP2 potencijalni marker loše prognoze u karcinomu dojke. Patel i saradnici su pokazali da su serumski nivoi matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 značajno povišeni kod pacijentkinja sa karcinomom dojke u poređenju sa pacijentkinjama sa benignim lezijama dojke i zdrave žene (Patel i sar., 2011). Daniele i saradnici su pokazali da je ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 značajno povišena u limfnim čvorovima i serumu pacijentkinja sa metastatskim karcinomom dojke u poređenju sa pacijentkinjama sa nemetastatskim karcinomom i zdrave žene (Daniele i sar., 2010). Hirvonen i saradnici su ukazali da bi MMP2 mogao biti marker loše prognoze kod pacijentkinja sa N0 karcinomom dojke, s obzirom da su pacijentkinje sa sniženom ekspresijom MMP2 u tkivu tumora dojke imale znatno duže vreme ukupnog preživljavanja (engl. overall survival, OS) i preživljavanja do pojave relapsa (RFS) u poređenju sa pacijentkinjama sa povišenom ekspresijom MMP2 u tkivu tumora (Hirvonen i sar., 2003). Talvensaari-Matila i saradnici su pokazali da su pacijentkinje sa sniženom ekspresijom MMP2 u tkivu tumora dojke imale bolju prognozu odnosno statistički značajno duže vreme ukupnog preživljavanja i preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa povišenom ekspresijom MMP2 (Talvensaari-Matila i sar., 2003). Isti autori su ukazali da bi MMP2 iz tkiva tumora dojke mogao biti indikator rezistencije na hormonsku terapiju kod postmenopauzalnih pacijentkinja sa N+ karcinomom dojke. Pacijentkinje sa sniženom ekspresijom MMP2 u tkivu tumora dojke su imale statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa povišenom ekspresijom MMP2 (Talvensaari-Matila i sar., 2001). Li i saradnici su ukazali da su matriksne metaloproteinaze 2 i 9 potencijalni markeri loše prognoze kod pacijentkinja sa N0 karcinomom dojke (Li i sar., 2004). Pacijentkinje sa sniženom ekspresijom MMP2 i/ili MMP9 u tkivu tumora dojke su imale bolju prognozu odnosno statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa povišenom ekspresijom MMP2 i/ili MMP9 u tkivu tumora. Na osnovu multivarijantnih analiza preživljavanja, koekspresija matriksnih

metaloproteinaza 2 i 9 bila je nezavisni indikator loše prognoze (Li i sar., 2004). I drugi autori su pokazali da je koekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 nezavisni indikator loše prognoze u karcinomu dojke (Ranogajec i sar., 2012). Leppa i saradnici su pokazali da bi MMP2, ali ne i MMP9, mogao biti marker loše prognoze kod pacijentkinja sa N+ karcinomom dojke. Pacijentkinje sa nižim nivoima MMP2 u serumu su imale bolju prognozu odnosno statistički značajno duže vreme ukupnog preživljavanja i preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa višim serumskim nivoima MMP2, i serumski MMP2 je bio nezavisni indikator loše prognoze (Leppa i sar., 2004). Sa druge strane, neki autori su ukazali da bi MMP2 mogao biti potencijalni marker dobre prognoze. Kuvaja i saradnici su pokazali da su pacijentkinje sa povišenim nivoima slobodne aktivne forme MMP2 u serumu imale znatno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa nižim nivoima slobodne aktivne forme MMP2 u serumu. Oni su pokazali i da je nivo ukupnih proMMP2 u serumu u inverznoj relaciji sa agresivnošću karcinoma dojke, odnosno da su pacijentkinje sa N+ statusom i uznapredovalim kliničkim stadijumom bolesti imale niže nivoe ukupnih proMMP2 u serumu (Kuvaja i sar., 2006).

Više autora je ukazalo da je MMP9 potencijalni marker loše prognoze. Reis i saradnici su pokazali da je ekspresija MMP9 povišena, dok je ekspresija njenih specifičnih inhibitora (TIMP1 i RECK), zatim IL8, MMP2, MMP14 i TIMP2 snižena, u tkivu tumora mokraćne bešike u odnosu na kontrolno tkivo bešike. Ekspresija MMP9 u tkivu tumora bešike bila je višestruko povišena kod pacijenata kod kojih je kasnije došlo do relapsa u odnosu na pacijente kod kojih nije došlo do relapsa (Reis i sar., 2012). Patel i saradnici su pokazali da su pacijentkinje sa metastatskim karcinomom dojke (M+) imale značajno povišene nivoe MMP9 u serumu u poređenju sa pacijentkinjama sa nemetastatskim karcinomom (Patel i sar., 2011). Wu i saradnici su pokazali da su nivoi MMP9 i TIMP1 u serumu značajno povišeni kod pacijentkinja sa karcinomom dojke u poređenju sa pacijentkinjama sa benignim lezijama dojke i zdrave žene. Pacijentkinje sa nižim nivoima MMP9 i TIMP1 u serumu su imale bolju prognozu odnosno statistički značajno duže vreme ukupnog preživljavanja i preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa višim serumskim nivoima MMP9 i TIMP1 (Wu i sar., 2008). Sullu i saradnici su

pokazali da su pacijentkinje sa sniženom ekspresijom MMP9 u tkivu tumora dojke imale bolju prognozu odnosno statistički značajno duže vreme ukupnog preživljavanja i preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa povišenom ekspresijom MMP9 (Sullu i sar., 2011). Sung i saradnici su pokazali da su pacijentkinje sa karcinomom dojke koje su imale niže nivoe MMP9 i lipokalina 2 u serumu, imale bolju prognozu odnosno statistički značajno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa višim serumskim nivoima MMP9 i lipokalina 2 (Sung i sar., 2012). Schveigert i saradnici su pokazali da su pacijentkinje sa povišenom ekspresijom MMP9 u tkivu tumora dojke i serumu, i pacijentkinje sa određenim varijantnim alelom gena za MMP9, imale lošiju prognozu. Značajne razlike u distribuciji genotipova nađene su između pacijentkinja sa kliničkim stadijumima I i III/IV, i između pacijentkinja sa N0 i N+ nodalnim statusom (Schveigert i sar., 2013). Najnovija meta analiza publikovanih studija koja je obuhvatila 2 400 pacijentkinja sa karcinomom dojke, pokazala je da povišena ekspresija MMP9 ima značajni nepovoljni uticaj na ukupno preživljavanje i preživljavanje do pojave relapsa (Song i sar., 2013). Međutim Scorilas i saradnici su pokazali da je kod pacijentkinja sa N0 karcinomom dojke MMP9 potencijalni marker dobre prognoze. Pacijentkinje sa povišenom ekspresijom MMP9 u tkivu tumora su imale bolju prognozu odnosno statistički značajno duže vreme ukupnog preživljavanja i preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa sniženom ekspresijom MMP9 (Scorilas i sar., 2001). Pellikainen i saradnici su ukazali da bi pozitivna ekspresija MMP9 u samim ćelijama tumora dojke mogla biti indikator dobre prognoze, dok bi pozitivna ekspresija MMP9 u ćelijama strome ER+ tumora dojke mogla biti indikator loše prognoze (Pellikainen i sar., 2004). Pacijentkinje sa MMP9+ ekspresijom u ćelijama tumora dojke su imale bolju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa MMP9– ekspresijom. U grupi pacijentkinja sa ER+ tumorima dojke, one sa MMP9+ ekspresijom u ćelijama strome su imale lošiju prognozu u poređenju sa pacijentkinjama sa MMP9– ekspresijom. Na osnovu multivarijantnih analiza preživljavanja, uznapredovali stadijum bolesti, HER2+ ekspresija i MMP9– ekspresija u ćelijama tumora dojke bili su nezavisni indikatori loše prognoze (Pellikainen i sar., 2004). Rahko i saradnici su ukazali da je prediktivni značaj MMP9 ograničen kod postmenopauzalnih pacijentkinja sa N+ karcinomom dojke koje su primale

adjuvantnu hormonsku terapiju (Rahko i sar., 2004). Prema ovim autorima, MMP9 iz tkiva tumora dojke bi mogao biti indikator rezistencije na hormonsku terapiju u grupi pacijentkinja sa ER– tumorima, ali ne i u grupi sa ER+ tumorima. Pacijentkinje sa sniženom ekspresijom MMP9 u tkivu ER– tumora dojke su imale znatno duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa povišenom ekspresijom MMP9 (Rahko i sar., 2004).

#### **5.2.3.1. Odnos matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 i receptora (ER/HER2)**

Značaj kombinacije receptora i matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 za praćenje prirodnog toka bolesti, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane MMP2/MMP9. Prema našim rezultatima, ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa (tabele 21.-26.).

Značaj kombinacije receptora i MMP2 za predikciju odgovora na hormonsku terapiju, utvrđen je poređenjem preživljavanja do pojave relapsa (RFS) pacijentkinja koje su primale hormonsku terapiju grupisanih u različite fenotipove na osnovu statusa receptora i medijane MMP2. Iako su u svim kombinacijama fenotipova pacijentkinje sa ER+/PR+ statusom imale manji procenat relapsa i duže vreme preživljavanja do pojave relapsa u poređenju sa pacijentkinjama sa ER–/PR– statusom, i to bez obzira na MMP2 status, ni u jednoj kombinaciji fenotipova nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa (tabele 36.-38.). Pored toga, ni u jednoj kombinaciji fenotipova na osnovu statusa receptora i medijane MMP9 nije dobijena statistički značajna razlika u dužini vremena preživljavanja do pojave relapsa (tabele 39.-41.).

Prema dostupnim literaturnim podacima, matriksne metaloproteinaze 2 i 9 imaju dominantne uloge u više faza reproduktivnog ciklusa ženki sisara – implantaciji embriona i remodelovanju tkiva endometrijuma u toku menstrualnog ciklusa, što je najpre ukazalo na hormonski zavisnu regulaciju ekspresije i aktivnosti ovih enzima (Dubois i sar., 2000, Riley i sar., 2004). Iako su matriksne metaloproteinaze 2 i 9 odgovorne za razvoj mlečnih žlezda i nastanak karcinoma dojke (Rudolph-Owen i Matrisian, 1998, Duffy i sar., 2000), manje je

poznato kakav je direktan uticaj steroidnih hormona i hormonskih receptora na ekspresiju i aktivnost ovih enzima u tkivu dojke. *In vitro* istraživanja su pokazala da ER– ćelijske linije karcinoma dojke imaju veći invazivni potencijal i eksprimiraju značajno više nivoe MMP9, VEGF i katepsina D u odnosu na ER+ ćelije (Wang i sar., 2009). Nilsson i Dabrosin su pokazali na mišjem modelu *in vivo* da tamoksifen u kombinaciji sa estradiolom povećava aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u tkivu tumora, povećava nivoe endostatina i smanjuje vaskularizaciju tumora u poređenju sa tretmanom sa samim estradiolom (Nilsson i Dabrosin, 2006). *In vitro* istraživanja na ER+PR+ humanim ćelijskim linijama karcinoma dojke su pokazala da tamoksifen povećava nivoe intraćelijskih i sekretovanih matriksnih metaloproteinaza 2 i 9, kao i njihovu aktivnost, i povećava nivoe vanćelijskog endostatina, dok estradiol značajno redukuje nivoe i aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 (Nilsson i sar., 2007). *In vitro* istraživanja su pokazala i da HER2 povećava invazivni potencijal i sposobnost migracije MCF ćelija preko stimulacije ekspresije MMP9 (Kim i sar., 2009). U HER2+ MCF ćelijama se mogla konstatovati i redukcija ekspresije E-kadherina (marker epitelnih ćelija) kao i indukcija ekspresije vimentina, što je ukazivalo da bi epitelno-mezenhimalna tranzicija mogla imati ulogu u HER2-indukovanoj invazivnosti i migraciji MCF ćelija. p38 MAPK i PI3K/Akt kinazne kaskade su bile od presudnog značaja za HER2-indukovanu stimulaciju ekspresije MMP9 i povećanje invazivnog potencijala MCF ćelija (Kim i sar., 2009).

Prema našim rezultatima, raspodela koncentracija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u odnosu na status receptora (ER, PR, HER2) nije bila statistički značajna (tabele 5. i 6.). Dalje, između koncentracija hormonskih receptora i matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 nisu dobijene statistički značajne korelacije (tabela 7.). Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 nije hormonski regulisana. Studije na pacijentima koje se bave ovom problematikom su kontradiktorne. Više autora je pokazalo da ekspresija i/ili aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u tkivu tumora dojke i/ili serumu pacijentkinja, nije u statistički značajnoj relaciji sa triple receptor statusom. Rahko i saradnici su pokazali da ekspresija MMP9 u tkivu tumora dojke nije u statistički značajnoj relaciji sa kliničko-patološkim parametrima, uključujući status hormonskih receptora (Rahko i sar., 2004). Međutim, La Rocca i saradnici su pokazali da je



serumska aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u inverznoj relaciji sa ER statusom. Oni su prvi pokazali da je serumska aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u direktnoj relaciji sa ekspresijom HER2, i ukazali da bi HER2 signalizacija mogla stimulirati ekspresiju i/ili aktivnost ovih enzima u HER2+ karcinomu dojke (La Rocca i sar., 2004). Decock i saradnici nisu dobili statistički značajnu relaciju između nivoa matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 u plazmi (ukupnih i aktivnih) i kliničko-patoloških parametara, uključujući status hormonskih receptora. Međutim aktivna forma MMP2 bila je značajno povišena u plazmi pacijentkinja sa HER2+ karcinomom dojke u poređenju sa pacijentkinjama sa HER2- karcinomom (Decock i sar., 2005). Sullu i saradnici su pokazali da je ekspresija MMP9 bila značajno povišena u triple- i ER- tumorima dojke. U grupi pacijentkinja sa N0 karcinomom dojke, ekspresija MMP2 je bila značajno povišena u ER- tumorima. Ekspresija MMP9 bila je povišena i u HER2+ tumorima dojke u odnosu na HER2- tumore, ali ta razlika nije bila statistički značajna (Sullu i sar., 2011). Dakle, više radova ukazuje na potencijalnu ulogu HER2 u stimulaciji ekspresije i aktivnosti matriksnih metaloproteinaza 2 i 9. Međutim prema našim rezultatima između koncentracija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 i amplifikacije HER2 gena nisu dobijene statistički značajne relacije, što ukazuje da HER2 nema uticaja na ekspresiju ovih enzima.

## **6. ZAKLJUČCI**

Prema dobijenim rezultatima ovom disertacijom se mogu izvesti sledeći zaključci:

- Od dostupnih kliničko-patoloških parametara karcinoma dojke, veličina tumora i histopatološki tip tumora su pokazali prognostički značaj za praćenje prirodnog toka bolesti pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju. Pored toga, pozitivan status estrogenog receptora je pokazao prediktivni značaj za efikasnost hormonske terapije (tamoksifen).
- Od potencijalnih biomarkera jedino je IL8 pokazao prognostički značaj za praćenje prirodnog toka bolesti pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju, te bi IL8 iz tkiva tumora mogao biti marker loše prognoze.
- Analizom prognostičkog značaja fenotipskih kombinacija na osnovu statusa receptora i biomarkera kod pacijentkinja koje nisu primale adjuvantnu terapiju, IL8 se pokazao kao pouzdaniji prognostički marker u odnosu na status receptora (ER, PR, HER2).
- Nijedan od potencijalnih biomarkera, pojedinačno ili kombinovano, nije pokazao značaj za predikciju odgovora (efikasnost ili rezistencija) na hormonsku terapiju (tamoksifen).
- Analizom prediktivnog značaja fenotipskih kombinacija na osnovu statusa receptora i biomarkera kod pacijentkinja koje su primale adjuvantnu hormonsku terapiju, receptor za estrogen se pokazao kao pouzdaniji prediktivni marker u odnosu na ispitivane biomarkere (IL8, MMP2, MMP9).
- Između koncentracija hormonskih receptora i interleukina 8 postoji značajna negativna korelacija, što potvrđuje da bi ekspresija IL8 mogla biti hormonski regulisana.
- Između koncentracija hormonskih receptora i matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 nema značajnih relacija i korelacija, što ukazuje da ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 nije hormonski regulisana.
- Između koncentracija ispitivanih biomarkera i amplifikacije HER2 gena nema značajnih relacija, što ukazuje da HER2 nema uticaja na ekspresiju odabranih biomarkera (IL8, MMP2, MMP9).

- Između koncentracija IL8 i MMP9 postoji značajna pozitivna relacija i značajna pozitivna korelacija, što ukazuje da bi eventualno postojanje pozitivne sprege između IL8 i MMP9 moglo doprineti progresiji hormonski zavisnog karcinoma dojke.
- Na osnovu značajne negativne korelacije između koncentracija ER i IL8, a uzimajući u obzir efekat tamoksifena koji deluje kao blokator/antagonist estrogenog receptora, moglo bi se pretpostaviti da bi u toku terapije tamoksifenom moglo doći do povećanja ekspresije IL8 u tkivu tumora, što bi izazvalo rezistenciju na tamoksifen, iako se u našem radu nije pokazalo da IL8 ima prediktivni značaj.

## **7. LITERATURA**

**A**

- Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology. Elsevier Inc. NY 2006.
- Aceto N, Duss S, McDonald G, Meyer DS, Roloff TC i saradnici. Co-expression of HER2 and HER3 receptor tyrosine kinases enhances invasion of breast cells via stimulation of interleukin-8 autocrine secretion. *Breast Cancer Res* 2012; 14:R131.
- Ahmed OI, Adel AM, Diab DR, Gobran NS. Prognostic value of serum level of interleukin-6 and interleukin-8 in metastatic breast cancer patients. *Egypt J Immunol* 2006; 13:61-8.
- Ardi VC, Van den Steen PE, Opdenakker G, Schweighofer B, Deryugina EI i saradnici. Neutrophil MMP-9 proenzyme, unencumbered by TIMP-1, undergoes efficient activation *in vivo* and catalytically induces angiogenesis via a basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGFR-2 pathway. *J Biol Chem* 2009; 284:25854-66.
- Azenshtein E, Meshel T, Shina S, Barak N, Keydar I, Ben-Baruch A. The angiogenic factors CXCL8 and VEGF in breast cancer: regulation by an array of pro-malignancy factors. *Cancer Lett* 2005; 217:73-86.

**B**

- Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1825:29-36.
- Bendrik C, Dabrosin C. Estradiol increases IL-8 secretion of normal human breast tissue and breast cancer *in vivo*. *J Immunol* 2009; 182:371-8.
- Benoy IH, Salgado R, Van Dam P, Geboers K, Van Marck E i saradnici. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res* 2004; 10:7157-62.
- Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362:419-27.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T i saradnici. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2:737-44.

- 
- Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A i saradnici. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2:444-55.
  - Biasi F, Guina T, Maina M, Nano M, Falcone A i saradnici. Progressive increase of matrix metalloprotease-9 and interleukin-8 serum levels during carcinogenic process in human colorectal tract. *PLoS One* 2012; 7(7):e41839.
  - Bièche I, Chavey C, Andrieu C, Busson M, Vacher S i saradnici. CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14:1039-52.
  - Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11:359-77.
  - Brooks SC, Saunders DE, Singhakowinta A, Vaitkevicius VK. Relation of tumor content of estrogen and progesterone receptors with response of patients to endocrine therapy. *Cancer* 1980; 46:2775-8.
- C.
- Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 1;63:181-7.
  - Chakrabarti S, Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2005; 78:279-88.
  - Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, i saradnici. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 2009; 69:1302-13.
  - Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlinchon S, Boissière F i saradnici. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res* 2007; 9(1):R15.
  - Chen Y, Shi M, Yu GZ, Qin XR, Jin G i saradnici. Interleukin-8, a promising predictor for prognosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2012;18:1123-9.

- Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB i saradnici. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003; 421:756-60.
- Clark GM, McGuire WL, Hubay CA, Pearson OH, Marshall JS. Progesterone receptors as a prognostic factor in Stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1983; 309:1343-7.
- Clarke RB, Anderson E, Howell A. Steroid receptors in human breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15:316-23.
- Colletti LM, Green M, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM. Proliferative effects of CXC chemokines in rat hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Shock* 1998; 10:248-57.

**D.**

- Dabrosin C. Increased extracellular local levels of estradiol in normal breast *in vivo* during the luteal phase of the menstrual cycle. *J Endocrinol* 2005; 187:103-8.
- Daniele A, Zito AF, Giannelli G, Divella R, Asselti M i saradnici. Expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in sentinel lymph node and serum of patients with metastatic and non-metastatic breast cancer. *Anticancer Res* 2010; 30:3521-7.
- Decock J, Hendrickx W, Wildiers H, Christiaens MR, Neven P i saradnici. Plasma gelatinase levels in patients with primary breast cancer in relation to axillary lymph node status, Her2/neu expression and other clinicopathological variables. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22:495-502.
- Derin D, Soydinc HO, Guney N, Tas F, Camlica H i saradnici. Serum IL-8 and IL-12 levels in breast cancer. *Med Oncol* 2007; 24:163-8.
- Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R i saradnici. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2001; 263:209-23.
- Devarajan P, Johnston JJ, Ginsberg SS, Van Wart HE, Berliner N. Structure and expression of neutrophil gelatinase cDNA. Identity with type IV collagenase from HT1080 cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 25228-32.



- 
- Dowsett M, Cooke T, Ellis I, Gullick WJ, Gusterson B i saradnici. Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? *Eur J Cancer* 2000; 36:170-6.
  - Dubois B, Arnold B, Opdenakker G. Gelatinase B deficiency impairs reproduction. *J Clin Invest* 2000; 106:627-8.
  - Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000; 2:252-7.
  - Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2007; 9(1):R6.
- E.**
- Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1992; 20:479-89.
  - Elston CW, Ellis O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19:403-10.
  - Ewington L, Taylor A, Sriraksa R, Horimoto Y, Lam EW, El-Bahrawy MA. The expression of interleukin-8 and interleukin-8 receptors in endometrial carcinoma. *Cytokine* 2012; 59:417-22.
- F.**
- Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, Hamilton DH, Palena C. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Res* 2011; 71:5296-306.
  - Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC i saradnici. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:966-78.
  - Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD i saradnici. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2011; 378:1461-84.

- 
- Freund A, Chauveau C, Brouillet JP, Lucas A, Lacroix M i saradnici. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene* 2003; 22:256-65.
  - Freund A, Jolivel V, Durand S, Kersual N, Chalbos D i saradnici. Mechanisms underlying differential expression of interleukin-8 in breast cancer cells. *Oncogene* 2004; 23:6105-14.
- G.**
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE i saradnici. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; 11:495-505.
  - Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M i saradnici. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells *in vitro* and in xenografts. *J Clin Invest* 2010; 120:485-97.
  - Green AR, Green VL, White MC, Speirs V. Expression of cytokine messenger RNA in normal and neoplastic human breast tissue: identification of interleukin-8 as a potential regulatory factor in breast tumours. *Int J Cancer* 1997; 72:937-41.
  - Gunnarsson C, Hellqvist E, Stal O. 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenases involved in local oestrogen synthesis have prognostic significance in breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 92:547-52.
- H.**
- Haim K, Weitzenfeld P, Meshel T, Ben-Baruch A. Epidermal growth factor and estrogen act by independent pathways to additively promote the release of the angiogenic chemokine CXCL8 by breast tumor cells. *Neoplasia* 2011; 13:230-43.
  - Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, Lively JC, Maeshima Y i saradnici. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* 2003; 3:589-601.
  - Harbeck N, Thomssen C. A new look at node-negative breast cancer. *The Oncologist* 2011; 16:51-60.

- 
- Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52:305-19.
  - Hayes E, Smith C, Nicholson RI, Gee J, Hiscox S. Acquired Tamoxifen Resistance Promotes Angiogenic Responses in ER+ Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 2011; 71(24 Suppl):Abstract nr P2-05-01.
  - Heljasvaara R, Nyberg P, Luostarinen J, Parikka M, Heikkilä P i saradnici. Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Exp Cell Res* 2005; 307:292-304.
  - Hirvonen R, Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T(1-2)N0 breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77:85-91.
  - Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leuk Biol* 2002; 72:847-55.
  - Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, Hutcheson IR, Nicholson RI i saradnici. Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature* 2008; 456:663-6.
- I.**
- Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P i saradnici. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2104-19.
- J.**
- Jansson AK, Gunnarsson C, Cohen M, Sivik T, Stal O. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 14 affects estradiol levels in breast cancer cells and is a prognostic marker in estrogen receptor - positive breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66:11471-7.
- K.**
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141:52-67.
  - Kim IY, Yong HY, Kang KW, Moon A. Overexpression of ErbB2 induces invasion of MCF10A human breast epithelial cells *via* MMP-9. *Cancer Letters* 2009; 275: 227-33.

- Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1993; 268:10425-32.
- Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:302-12.
- Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2011; 41:271-90.
- Kozłowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P, Wojtukiewicz MZ. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Bialymst* 2003; 48:82-4.
- Kurebayashi J. Resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56:39-46.
- Kuvaja P, Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Low serum level of pro-matrix metalloproteinase 2 correlates with aggressive behavior in breast carcinoma. *Hum Pathol* 2006; 37:1316-23.

**L.**

- La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Br J Cancer* 2004; 90:1414-21.
- Lamote I, Meyer E, Massart-leen AM, Burnvenich C. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation and involution. *Steroids* 2004; 69:145-59.
- Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev* 2011; 32:597-622.
- Leppä S, Saarto T, Vehmanen L, Blomqvist C, Elomaa I. A high serum matrix metalloproteinase-2 level is associated with an adverse prognosis in node-positive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:1057-63.

- Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003; 170:3369-76.
- Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis* 2005; 8:63-71.
- Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J i saradnici. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88:75-85.
- Li XJ, Peng LX, Shao JY, Lu WH, Zhang JX i saradnici. As an independent unfavorable prognostic factor, IL-8 promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition and activation of AKT signaling. *Carcinogenesis* 2012; 33:1302-9.
- Liang Y, Hyder SM. Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. *Endocrinol* 2005; 146:3632-41.
- Lin Y, Huang R, Chen L, Li S, Shi Q i saradnici. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor - regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. *Int J Cancer* 2004; 109:507-15.
- Liu Z, Xu S, Xiao N, Song C, Zhang H, Li F. Overexpression of IL-8 and MMP-9 confer high malignant phenotype in patients with non-small cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2010; 13:795-802.
- Ljiljak N. Primena analize preživljavanja u medicinskom istraživanju. Master rad. Univerzitet u NS, PMF, 2011.
- Losordo DW, Isner JM. Estrogen and Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:6-12.
- Love RR, Mazess RB, Barden HS, Barden HS, Epstein S i saradnici. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med* 1992; 326:852-6.

- Luca M, S. Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 1997; 151:1105-13.
- Luster AD. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338:436-45.

**M.**

- Maeda H, Okamoto T, Akaike T. Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol Chem* 1998; 379:193-200.
- Maione TE, Gray GS, Petro J, Hunt AJ, Donner AL i saradnici. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* 1990; 247:77-9.
- Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010; 10:955-60.
- Mannelqvist M, Stefansson IM, Bredholt G, Hellem BT, Oyan AM i saradnici. Gene expression patterns related to vascular invasion and aggressive features in endometrial cancer. *Am J Pathol* 2011; 178:861-71.
- McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I i saradnici. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties *in vivo*. *Blood* 2002; 100:1160-7.
- Mian BM, Dinney CP, Bermejo CE, Sweeney P, Tellez C i saradnici. Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-kappaB. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3167-75.
- Mohamed MM. Monocytes conditioned media stimulate fibronectin expression and spreading of inflammatory breast cancer cells in three-dimensional culture: a mechanism mediated by IL-8 signaling pathway. *Cell Commun Signal* 2012; 10:3.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D i saradnici. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410:50-6.

- Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:631-43.

## N.

- Nelissen I, Martens E, Van den Steen PE, Proost P, Ronsse I, Opdenakker G. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 cleaves interferon-beta and is a target for immunotherapy. *Brain* 2003; 126:1371-81.
- Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Activated protein C directly activates human endothelial gelatinase A. *J Biol Chem* 2000; 275:9095-8.
- Nilsson UW, Dabrosin C. Estradiol and tamoxifen regulate endostatin generation via matrix metalloproteinase activity in breast cancer *in vivo*. *Cancer Res* 2006; 66:4789-94.
- Nilsson UW, Garvin S, Dabrosin C. MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 102:253-61.
- Nordenskjold B, Rosell J, Rutqvist LE, Malmstrom PO, Bergh J i saradnici. Coronary heart disease mortality after 5 years of adjuvant tamoxifen therapy: results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1609-10.

## O.

- Opdenakker G, Masure S, Grillet B, Van Damme J. Cytokine mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. *Lymphokine Cytokine Res* 1991; 10:317-24.
- Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG i saradnici. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:353-61.
- Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005; 23:1616-22.
- Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med* 2011; 62:233-47.
- Osborne CK, Zhao HH, Fuqua SAW. Selective estrogen receptor modulators: structure, function and clinical use. *J Clin Oncol* 2000; 18:3172-86.

**P.**

- Pasqualini JR, Chetrite GS. Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 93:221-36.
- Patel S, Sumitra G, Koner BC, Saxena A. Role of serum matrix metalloproteinase-2 and -9 to predict breast cancer progression. *Clin Biochem* 2011; 44: 869-72.
- Pekmezović T. Epidemiologija raka dojke. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke. Ministarstvo zdravlja RS 2012.
- Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10:7621-8.
- Pine SR, Mechanic LE, Enewold L, Chaturvedi AK, Katki HA i saradnici. Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:1112-22.
- Premkumar VG, Yuvaraj S, Vijayasarathy K, Gangadaran SG, Sachdanandam P. Serum cytokine levels of interleukin -1beta, - 6, - 8, tumour necrosis factor-alpha and vascular endothelial growth factor in breast cancer patients treated with tamoxifen and supplemented with co-enzyme Q(10), riboflavin and niacin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 100:38791.
- Punt CJ, Buyse M, Köhne CH, Hohenberger P, Labianca R i saradnici. Endpoints in adjuvant treatment trials: a systematic review of the literature in colon cancer and proposed definitions for future trials. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:998-1003.

**Q.**

- Qazi BS, Tang K, Qazi A. Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis. *Int J Inflamm* 2011; 2011:908468.



**R.**

- Rahko E, Jukkola A, Melkko J, Paavo P, Bloigu R i saradnici. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) immunoreactive protein has modest prognostic value in locally advanced breast carcinoma patients treated with an adjuvant antiestrogen therapy. *Anticancer Res* 2004; 24:4247-53.
- Ranogajec I, Jakić-Razumović J, Puzović V, Gabrilovac J. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and aminopeptidase N/CD13 in breast cancer patients. *Med Oncol* 2012; 29:561-9.
- Reis ST, Leite KR, Piovesan LF, Pontes-Junior J, Viana NI i saradnici. Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of bladder cancer. *BMC Urol* 2012; 12:18.
- Riley SC, Thomassen R, Bae SE, Leask R, Pedersen HG i saradnici. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion by the equine ovary during follicular growth and prior to ovulation. *Anim Reprod Sci* 2004; 81:329-39.
- Rudas M, Lehnert M, Huynh A, Jakesz R, Singer C i saradnici. Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1767-74.
- Rudolph-Owen LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in remodeling of the normal and neoplastic mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; 3:177-89.
- Russell K, Hung MC. Transcriptional repression of the neu protooncogene by estrogen stimulated estrogen receptor. *Cancer Res* 1992; 52:6624-9.

**S.**

- Scarff RF, Torloni H. International histological classification of neoplasms: Histologic types of breast neoplasms. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1981.
- Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 1998; 161:3340-6.

- Schveigert D, Cicenás S, Bruzas S, Samalavicius NE, Gudleviciene Z, Didziapetriene J. The value of MMP-9 for breast and non-small cell lung cancer patients' survival. *Adv Med Sci* 2013; 58:73-82.
- Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Bassilopoulos P i saradnici. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer* 2001; 84:1488-96.
- Shapiro S, Khodalev O, Bitterman H, Auslender R, Lahat N. Different activation forms of MMP-2 oppositely affect the fate of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298:C942-51.
- Shawarby MA, Al-Tamimi DM, Ahmed A. Molecular classification of breast cancer: an overview with emphasis on ethnic variations and future perspectives. *Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences* 2013; 1:14-9.
- Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 2001; 61:237-42.
- Shiau MY, Fan LC, Yang SC, Tsao CH, Lee H i saradnici. Human papillomavirus up-regulates MMP-2 and MMP-9 expression and activity by inducing interleukin-8 in lung adenocarcinomas. *PLoS One* 2013; 8:e54423.
- Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB, Anderson E, Hewlett J i saradnici. Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast. *Am J Pathol* 1999; 155:1811-5.
- Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Walker C, Sloane JP. Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast. *J Pathol* 1999; 188:237-44.
- Singh S, Singh AP, Sharma B, Owen LB, Singh RK. CXCL8 and its cognate receptors in melanoma progression and metastasis. *Future Oncol* 2010; 6:111-6.
- Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D i saradnici. Revision of the American Joint Committee on cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:3628-36.

- 
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
  - Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: a field in transit. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:832-44.
  - Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Fekih M, Khairi H i saradnici. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. *BMC Cancer* 2010; 10:283.
  - Song J, Su H, Zhou YY, Guo LL. Prognostic value of matrix metalloproteinase 9 expression in breast cancer patients: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14:1615-21.
  - Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S i saradnici. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10869-74.
  - Stankovic S, Konjevic G, Gopcevic K, Jovic V, Inic M, Jurisic V. Activity of MMP-2 and MMP-9 in sera of breast cancer patients. *Pathol Res Pract* 2010; 206:241-7.
  - Stein RA, Staros JV. Evolutionary analysis of the ErbB receptor and ligand families. *J Mol Evol* 2000; 50:397-412.
  - Stoner M, Saville B, Wormke M, Dean D, Burghardt R, Safe S. Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha in ZR-75 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2002; 16:2231-42.
  - Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD i saradnici. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995; 270:27348-57.
  - Sullu Y, Demirag GG, Yildirim A, Karagoz F, Kandemir B. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract* 2011; 207:747-53.

- 
- Sung H, Choi J-Y, Lee S-A, Lee KM, Han S i saradnici. The association between the preoperative serum levels of lipocalin-2 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and prognosis of breast cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 193.
- T.**
- Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with the risk for a relapse in postmenopausal patients with node-positive breast carcinoma treated with antiestrogen adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 65:55-61.
  - Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89:1270-5.
  - Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L i saradnici. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008; 10:R67.
  - Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998; 351:1451-67.
  - Tan M, Yu D. Molecular mechanisms of erbB2-mediated breast cancer chemoresistance. *Adv Exp Med Biol* 2007; 608:119-29.
  - Templeton NS, Stetler-Stevenson WG. Identification of a basal promoter for the human Mr 72,000 type IV collagenase gene and enhanced expression in a highly metastatic cell line. *Cancer Res* 1991; 51: 6190-3.
- U.**
- Urquidi V, Chang M, Dai Y Kim J, Wolfson ED i saradnici. IL-8 as a urinary biomarker for the detection of bladder cancer. *BMC Urol* 2012; 12:12.
- V.**
- Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 2000; 96:2673-81.

- Van den Steen PE, Wuyts A, Husson SJ, Proost P, Van Damme JV, Opdenakker G. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur J Biochem* 2003; 270:3739-49.
- Vazquez-Martin A, Colomer R, Menendez JA. Her-2/neu-induced “cytokine signature” in breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008; 617:311-9.
- Vermeulen A, Deslypere JP, Paridaens R, Leclercq G, Roy F i saradnici. Aromatase, 17 beta - hydroxysteroid dehydrogenase and intratissular sex hormone concentrations in cancerous and normal glandular breast tissue in postmenopausal women. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22:515-25.

**W.**

- Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *Br J Cancer* 1996; 74:1796-800.
- Wang X, Tan J, Marc V, Bertrand D, Ren G. Comparison of hyaluronidase expression, invasiveness and tubule formation promotion in ER (-) and ER (+) breast cancer cell lines *in vitro*. *Chin Med J* 2009; 122:1300-4.
- Wang Y, Guo XQ, Niu XL, Wu J, Zhu YQ, Mao LQ. Relationship of IL-6 and IL-8 secretion in epithelial ovarian cancer cell lines with their sensitivity to tamoxifen as well as MAPK, Akt and estrogen receptor phosphorylation. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2010; 26:21-4.
- Wang Y, Xu RC, Zhang XL, Niu XL, Qu Y i saradnici. Interleukin-8 secretion by ovarian cancer cells increases anchorage-independent growth, proliferation, angiogenic potential, adhesion and invasion. *Cytokine* 2012; 59:145-55.
- Wasif N, Maggard MA, Ko CY, Giuliano AE. Invasive lobular vs. ductal breast cancer: a stage-matched comparison of outcomes. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1862-9.
- Waugh DJJ, Wilson C. The Interleukin 8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6735-41.
- Weinberg RA. *The biology of cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group LLC 2007.

- 
- Wen XF, Yang G, Mao W, Thornton A, Liu J i saradnici. HER2 signaling modulates the equilibrium between pro- and antiangiogenic factors via distinct pathways: implications for HER2-targeted antibody therapy. *Oncogene* 2006; 25:6986-96.
  - Wu ZS, Wu Q, Yang JH, Wang HQ, Ding XD i saradnici. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer* 2008; 122:2050-6.
- X.**
- Xie K. Interleukin 8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12:375-91.
- Y.**
- Yao C, Lin Y, Chua MS, Ye CS, Bi J i saradnici. Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor–negative breast cancer cells. *Int J Cancer* 2007; 121:1949-57.
  - Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14:163-76.
  - Yue W, Wang JP, Hamilton CJ, Demers LM, Santen RJ. In situ aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res* 1998; 58:927-32.
- Z.**
- Zheng SQ, Huang RQ, Zhang YJ. Role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and vascular endothelial growth factor C in lymph node metastasis of breast cancer. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2010; 39:240-4.

## ***BIOGRAFIJA AUTORA***

Jelena Milovanović je rođena 3. jula 1979. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera završila je u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, završila je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,14. Iste godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Molekularna biologija. Zvanje istraživača pripravnika stekla je 2011. godine, a zatim i zvanje istraživača saradnika 2013. godine. Zaposlena je na Odeljenju za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije od 2011. godine. Eksperimentalni deo svoje doktorske disertacije uradila je u Laboratoriji za receptore i biologiju malignih tumora u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije ON175068 'Molekularni biomarkeri karcinoma dojke i promena njihovog značaja u zavisnosti od perioda praćenja toka bolesti'.

***PRILOZI***



## Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписана: Јелена Миловановић  
број уписа: М3006/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Интерлеукин 8 и матриксне металопротеиназе 2 и 9 као маркери инвазивности у хормонски зависном карциному 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 кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 03.11.2014.

---

## Прилог 2.

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Јелена Миловановић

Број уписа: М3006/2010

Студијски програм: Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада: Интерлеукин 8 и матриксне металопротеиназе 2 и 9 као маркери инвазивности у хормонски зависном карциному дојке

Ментори: доц. др Катарина Зељић, др Наташа Тодоровић-Раковић

Потписани: Јелена Миловановић

**Изјављујем** да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала 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, 03.11.2014.

---

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

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

Интерлеукин 8 и матриксне металопротеиназе 2 и 9 као маркери инвазивности у хормонски зависном карциному дојке

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала 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, 03.11.2014.

---

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.