

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Sandra S. Radenković

**ISPITIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA  
ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE,  
MATRIKS METALOPROTEINAZA-2 I -9 I  
POKAZATELJA ĆELIJSKE SMRTI U TKIVU  
PACIJENTKINJA SA KARCINOMOM DOJKE**

*-Doktorska disertacija-*

**Beograd, 2013**

UNIVERSITY OF BELGRADE  
MEDICAL SCHOOL

Sandra S. Radenković

**ANALYSIS OF ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE  
ENZYMES, MATRIX METALLOPROTEINASES -2  
AND -9 AND CELL DEATH PARAMETERS IN  
TISSUE OF BREAST CANCER PATIENTS**

*-Doctoral dissertation-*

**Belgrade, 2013**

1. Mentor: dr Kristina Gopčević, vanredni profesor, Institut za hemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Komentor: dr Gordana Konjević, naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Komisija u sastavu:

dr Aleksandra Isaković, vanredni profesor, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Zorica Milošević, vanredni profesor, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Vladimir Jurišić, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija je uradjena u Laboratoriji Instituta za hemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Kristine Gopčević i u Laboratoriji za eksperimentalnu imunologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije pod rukovodstvom N. Sav. dr Gordane Konjević. Disertacija je realizovana u okviru projekata Ministarstva za nauku Republike Srbije br. 145056: „Izučavanje regulatornih mehanizama vezanih za imunomodulaciju u malignim bolestima“ čiji je rukovodioc bila prof. dr Gordana Konjević i br. 175056: „Molekulske, biohemijske i imunološke analize u dijagnostici tumora” čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Jurišić.

Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr Kristini Gopčević na neizmernom strpljenju i podršci, korisnim savetima i sugestijama tokom izrade ove doktorske disertacije, kao i tokom naše dugogodišnje saradnje koja datira još od mojih studentskih dana.

Posebnu zahvalnost dugujem komentoru, N.Sav. dr Gordani Konjević na ogromnoj pomoći i podršci u mom naučnoistraživačkom radu, kao i na ukazanom prijateljstvu. Takođe, zahvaljujem se dr Gordani Konjević na energiji i trudu koji je uložila u realizaciju ove teze.

Prof. dr Aleksandri Isaković zahvaljujem se na korisnim sugestijama, ličnom angažovanju i pozitivnom stavu tokom izrade ove teze.

Prof. dr Zorici Milošević se zahvaljujem na pomoći i strpljenju u savladavanju radioloških aspekata ove doktorske teze, kao i mom upoznavanju sa radiologijom.

Prof. dr Vladimiru Jurišiću se zahvaljujem na ukazanom poverenju i pomoći u oblikovanju publikacija proisteklih iz ove teze.

Svojim dragim kolegenicama iz Laboratorije za imunologiju Katarini i Jasni, a posebno Ani Vuletić zahvaljujem se na kolegijalnosti i spremnosti na saradnju, kao i pomoći tokom eksperimentalnog rada.

Dr Tatjani Srdić-Rajić, VNS zahvaljujem se na strpljenju i izuzetnoj pomoći u savladavanju eksperimentalnih metoda, kao i sugestijama tokom pisanja doktorske teze.

Iznad svega, zahvaljujem se svojoj porodici na neizmernoj podršci i strpljenju: mami, Dušanu i Mihajlu.

Ispitivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, matriks metaloproteinaza -2 i -9 i ekspresije pokazatelja ćelijske smrti u tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke

**REZIME**

**Uvod:** Obzirom da je aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) i malat dehidrogenaze (MDH) povezana sa procesima proliferacije i invazije tumora, određivanje distribucije njihovih izoenzima važno je u procesu metabolizma tumorske ćelije. Dugo se smatralo da enzimi antioksidativne zaštite, kao što su superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (CAT), štite ćelije od kancerogeneze. Međutim, pokazano je da su CAT i SOD uključene u procese izbegavanja ćelijske smrti i proliferacije, zbog čega predstavljaju važne medijatore u biologiji karcinoma dojke. Sve češće povezivanje mamografskih karakteristika sa histopatološkim markerima i enzimima, stvara novu klasifikaciju pacijentkinja sa karcinomom dojke u cilju adekvatnog individualnog pristupa. Pored povećane aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, u karcinomima dolazi do poremećaja ekspresije pokazatelja ćelijske smrti kao što su STAT3, ciklin D1 i Bcl-2. Obzirom na porast incidence karcinoma dojke u svetu, javlja se sve veća potreba za definisanjem panela tumorskih markera koji bi pouzdano mogli da identifikuju karcinom dojke sa mogućom tendencijom recidiva. Podaci pokazuju da marker za karcinom dojke može biti među proteinima koji učestvuju u procesu tumorske progresije kao što su MMP-2, MMP-9 i TIMP1.

**Cilj:** Iz tih razloga, cilj ovog rada je bio utvrđivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT), anaerobnog metabolizma (LDH, MDH), invazivnosti (MMP-2, MMP-9, TIMP1) i ekspresije pokazatelja ćelijske smrti (pSTAT3, bcl-2, Ciklin D1) u tumorskom tkivu i njihovog odnosa sa kliničko-patološkim karakteristikama tumora, kao i sa mamografskim nalazom bolesnica sa karcinomom dojke.

**Materijal i metode:** U radu je analizirano 75 uzoraka tumorskog i 75 uzoraka okolnog peritumorskog tkiva bolesnica sa histopatološki potvrđenim karcinomom dojke. Aktivnost MMP-2 i MMP-9 određivana je metodom želatin zimografije, dok je aktivnost SOD, CAT, LDH i MDH određivana odgovarajućim spektrofotometrijskim metodama.

Distribucija izoenzima LDH, MDH i SOD određivana je odgovarajućim elektroforetskim metodama. Metodom Imunoblota određivana je ekspresija pSTAT3, TIMP-1, Ciklin D i bcl-2. Retrospektivno su analizirani mamografski snimci: struktura dojki i karakteristike lezije prema Breast Imaging Reporting and Data system (BI-RADS) leksikonu. Za statističku obradu podataka korišćeni su *T test*, *Vilkokson test sume rangova* i *Man Vitnijev test*.

**Rezultati:** LDH5 izoenzim detektovan je samo u tumorskom tkivu karcinoma dojke. Aktivnost MDH, m-MDH, CAT i m-SOD je značajno veća u tumorskom u poredjenju sa peritumorskim tkivom pacijentkinja sa karcinomom dojke. Pacijentkinje sa HER2 pozitivnim receptorima u tumoru imale su veću prosečnu aktivnost SOD, kao i ekspresiju pSTAT3. Aktivnost LDH značajno se povećava, a aktivnost CAT značajno smanjuje sa povećanjem BIRADS kategorije. Aktivnost LDH, MMP-2, MMP-9 i ekspresija TIMP1 povećava se uporedo sa progresijom kliničkog stadijuma. Bazaloidni tumori, sa agresivnijom angiogenezom imaju povećanu aktivnost proMMP-2 u tumorskom, odnosno aktivne forme MMP-2 u peritumorskom tkivu. Ekspresija TIMP1, pSTAT3 i ciklina D1 proteina je veća u tumorskom u odnosu na peritumorsko tkivo. Ekspresija pSTAT3, Bcl-2 i ciklina D1 je veća kod hormon-zavisnih i luminalnih A tumora dojki, koji su povezani sa boljim preživljavanjem.

**Zaključak:** Povećanje aktivnosti LDH, MMP-2, MMP-9 i TIMP1 sa povećanjem kliničkog stadijuma sugeriše da bi navedeni parametri mogli biti korišćeni u kliničkoj praksi kao markeri kliničkog stadijuma pacijentkinja sa karcinomom dojke. Ekspresija pSTAT3, Bcl-2 i ciklina D1 u tumorskom tkivu je povoljan parametar kod bolesnica sa karcinomom dojke i udruženi su sa fenotipom nižeg malignog potencijala tumora dojki. Ispitivani molekuli mogu biti meta za nove terapijske agense koji bi doveli do boljeg odgovora na terapiju. Pored toga, povezanost aktivnosti LDH i CAT sa BIRADS kategorijom, može pomoći u definisanju karcinoma dojke sa agresivnijim fenotipom.

**Ključne reči:** karcinom dojke, antoksidativni enzimi, želatinaze, pokazatelji ćelijske smrti

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

UDK broj:

## Analysis of activity of antioxidative enzymes, matrix metalloproteinases -2 and -9 and cell death parameters in tissue of breast cancer patients

**Introduction:** Lactate dehydrogenase (LDH) and malate dehydrogenase (MDH) activity is associated with highly invasive and metastatic breast cancer. It was long thought that the antioxidative enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), protect cells against carcinogenesis. However, it has been shown that SOD and CAT play role in processes of proliferation and cell death. Association of enzyme profile and mammographic features provide insights into the biological processes in breast cancer and could be of use in defining novel biomarkers and potential therapeutic targets. Together with increased activities of antioxidative enzymes, cancers have altered expression of cell death parameters such as STAT3, Bcl-2 and cyclin D1. Since the incidence of breast cancer is increasing, it is necessary to find more tumor markers for breast cancer patients with high risk of recurrence. The proteins of tumor progression such as MMP-2, MMP-9 and TIMP1 could be possible tumor markers.

**Aim:** The aim of this study was to examine the activity of antioxidative (SOD, CAT), anaerobic metabolism (LDH, MDH), invasiveness (MMP-2, MMP-9) enzymes and expression of cell death parameters (TIMP1, STAT3, cyclin D1, Bcl-2) and their relation with clinico-pathologic and mammographic characteristics of breast cancer patients.

**Material and methods:** In this study we analyzed tumor and adjacent tissue samples of 75 breast cancer patients. We examined the activity of MMP-2 and MMP-9 by gelatin zymography, while SOD, CAT, LDH and MDH activity was assayed spectrophotometrically. Distribution of isoforms was determined with direct and reverse electrophoretic zymography. Expression of TIMP1, STAT3, cyclin D1 and Bcl-2 was assessed in tumor lysates by Western blotting. Mammograms were evaluated according to the American College of Radiology Breast Imaging Reporting and Data system (BIRADS). Significance of differences of the obtained results was analyzed by the *T test*, *Wilcoxon rank sum test* and *Mann–Whitney U-test*.

**Results:** The LDH5 isoenzyme was detected in tumor tissue of breast cancer patients. The activity of MDH, m-MDH, CAT and m-SOD in tumor tissue of breast cancer



patients significantly increases compared to adjacent patient tissue. HER2 positive patients had higher SOD activity, as well as pSTAT3 expression compared to HER2 negative patients. The activity of LDH in patients significantly increases, while activity of CAT significantly decreases with the increase of BIRADS category. The activity of LDH, MMP-2, MMP-9 and expression of TIMP1 significantly increased with each advancing clinical stage of disease. Patients with basal-like cancers had significantly higher proMMP-2 tumor activity and aMMP-2 adjacent tissue activity compared to patients with luminal A tumors. The expression of TIMP1, pSTAT3 and cyclin D1 in tumor tissue of breast cancer patients significantly increases compared to adjacent patient tissue. Patients with Luminal A and hormone positive cancers had significantly higher pSTAT3, Bcl-2 and cyclin D1 expression in tumor tissue.

**Conclusion:** Increasing tumor LDH, MMP-2, MMP-9 activity and TIMP1 expression with clinical stage suggests the usefulness of these parameters as staging markers for breast cancer patients. Expression of pSTAT3, Bcl-2 and cyclin D1 in tumor tissue can be considered as favorable molecular markers in breast cancer patient associated with lower malignant potential phenotype. Evidence of expression of these markers may serve as a basis for designing novel targeted molecular therapeutic strategies that hold great potential for the therapy of breast cancer. These results suggest that association of activity of LDH and CAT in tumor tissue with mammographic characteristics could help in defining aggressive breast cancers.

**Key words:** breast cancer, antioxidative enzymes, gelatinases, cell death parameters

**Scientific field:** Medicine

**Confined scientific field:** Molecular medicine

**UDC number:**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Enzimi anaerobnog metabolizma u karcinomu dojke .....	1
1.1.1. Uloga laktat dehidrogenaze u karcinomu dojke .....	1
1.1.2. Uloga malat dehidrogenaze u karcinomu dojke .....	4
1.2. Enzimi antioksidativne zaštite u karcinomu dojke .....	5
1.2.1. Uloga superoksid dismutaze u karcinomu dojke .....	5
1.2.2. Uloga katalaze u karcinomu dojke .....	6
1.3. Mamografske karakteristike i poremećaji LDH, CAT i SOD .....	7
1.4. Poremećaji MMP-2 i MMP-9 u karcinomu dojke .....	9
1.5. Poremećaj funkcije TIMP1 u karcinomu dojke .....	18
1.6. Poremećaj funkcije STAT3 u karcinomu dojke .....	20
1.7. Poremećaj funkcije Bcl-2 u karcinomu dojke .....	23
1.8. Poremećaj funkcije Ciklina D1 u karcinomu dojke .....	25
<b>2. CILJEVI</b> .....	28
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	30
3.1. Kriterijumi za uključivanje bolesnica u studiju .....	30
3.2. Kriterijumi za isključivanje bolesnica iz studije .....	30
3.3. Priprema uzorka .....	30
3.4. Određjivanje koncentracije proteina metodom Bradforda .....	31
3.5. Određjivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze .....	31
3.6. Određjivanje izoenzima laktat dehidrogenaze.....	31
3.7. Određjivanje aktivnosti malat dehidrogenaze .....	32
3.8. Određjivanje izoenzima malat dehidrogenaze.....	33
3.9. Određjivanje aktivnosti katalaze .....	33
3.10. Određjivanje aktivnosti superoksid dismutaze .....	34
3. 11. Određjivanje izoenzima superoksid dismutaze .....	34
3.12. Metoda želatin zimografije .....	35
3.13. Densitometrijsko određjivanje aktivnosti enzima na gelovima .....	35

3.14. Metoda Imunoblota .....	36
3.14.1. Priprema uzorka za elektroforezu .....	36
3.14.1. Elektroforeza proteina .....	36
3.14.2. Elektrotransfer proteina na membranu .....	37
3.14.3. Imunodetekcija proteina .....	37
3.14.3.1. Blokiranje nespecifičnog vezivanja .....	37
3.14.3.2. Inkubacija sa primarnim antitelom .....	38
3.14.3.3. Inkubacija sa sekundarnim antitelom .....	38
3.14.3.4. Detekcija hemiluminiscencijom .....	38
3.14.3.5. Denzitometrijsko određivanje intenziteta fluorescence ....	39
3.15. Kliničko-patološki parametri ispitivanih bolesnica .....	39
3.16. Analiza mamografija .....	39
3.17. Statistička obrada podataka .....	40
<b>4. REZULTATI</b> .....	41
4.1. Aktivnosti enzima anaerobnog metabolizma i antioksidativne zaštite kod pacijentkinja sa karcinomom dojke .....	41
4.1.1. Aktivnost LDH u tumorskom i peritumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke .....	41
4.1.2. Aktivnost LDH u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke .....	42
4.1.3. Aktivnost MDH u tumorskom i peritumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke .....	45
4.1.4. Aktivnost MDH u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke .....	46
4.1.5. Aktivnost CAT u tumorskom i peritumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke .....	48
4.1.6. Aktivnost CAT u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke .....	48
4.1.7. Aktivnost SOD u tumorskom i peritumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke .....	50

4.1.8. Aktivnost SOD u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke .....	52
4.2. Aktivnost LDH, SOD i CAT u odnosu na mamografske karakteristike ....	53
4.2.1. Mamografski nalazi .....	53
4.2.2. Povezanost aktivnosti LDH, CAT i SOD sa mamografskim karakteristikama .....	56
4.3. Aktivnost MMP-2 i MMP-9 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke ....	63
4.3.1. Aktivnost MMP-2 i MMP-9 u tumorskom i peritumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke .....	63
4.3.2. Aktivnost MMP-2 i MMP-9 u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke .....	65
4.4. Ekspresija TIMP1 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke .....	77
4.4.1. Ekspresija TIMP1 u tumorskom i peritumorskom tkivu .....	77
4.4.2. Ekspresija TIMP1 u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke .....	78
4.5. Ekspresija pSTAT3 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke .....	84
4.5.1. Ekspresija pSTAT3 u tumorskom i peritumorskom tkivu .....	84
4.5.2. Ekspresija pSTAT3 u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke .....	85
4.6. Ekspresija Bcl-2 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke .....	90
4.6.1. Ekspresija Bcl-2 u tumorskom i peritumorskom tkivu .....	90
4.6.2. Ekspresija Bcl-2 u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke .....	91
4.7. Ekspresija ciklina D1 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke .....	96
4.7.1. Ekspresija Ciklina D1 u tumorskom i peritumorskom tkivu .....	96
4.7.2. Ekspresija Ciklina D1 u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke .....	97
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>102</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>121</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>124</b>
<b>BIOGRAFIJA AUTORA .....</b>	<b>140</b>

## 1. UVOD

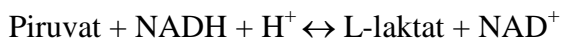
Uprkos različitim modalitetima lečenja i razvoju novih hemioterapeutika, incidencija karcinoma dojke, kao i mortalitet žena obolelih od karcinoma dojke su i dalje visoki. Iz tih razloga se ispituju mnogobrojni parametri, kao što su glandularna građa dojki i biohemijski markeri čije promene ekspresije mogu da ukažu na povećani rizik za rekurentnost karcinoma dojke (Sekine i sar., 2009). Sve češće povezivanje mamografskih karakteristika sa biohemijskim, citološkim i molekularnim markerima, stvara novu klasifikaciju pacijentkinja sa karcinomom dojke u cilju adekvatnog individualnog pristupa. Obzirom da je aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) i malat dehidrogenaze (MDH) povezana sa procesima proliferacije i invazije tumora, određivanje distribucije izoenzima ovih enzima važno je za proces metabolizma tumorske ćelije. Dugo se smatralo da enzimi antioksidativne zaštite, kao što su superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (CAT), štite ćelije od kancerogeneze. Međutim, pokazano je da su CAT i SOD uključene u procese izbegavanja ćelijske smrti i time proliferacije tumora, zbog čega predstavljaju važne medijatore u biologiji karcinoma dojke. Pored povećane aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, u karcinomima dolazi do poremećaja ekspresije pokazatelja ćelijske smrti. Obzirom na porast incidence karcinoma dojke u svetu, javlja se sve veća potreba za definisanjem panela tumorskih markera koji bi pouzdano mogli da identifikuju karcinom dojke sa mogućom tendencijom recidiva (Curtis i sar., 2010). Podaci pokazuju da marker za karcinom dojke može biti među proteinima koji učestvuju u procesu tumorske progresije kao što su matriks metaloproteinaze -2 i -9 (MMP-2 i MMP-9) i tkivni inhibitor metaloproteinaza 1 (TIMP1).

### 1.1. Enzimi anaerobnog metabolizma u karcinomu dojke

#### 1.1.1. Uloga laktat dehidrogenaze u karcinomu dojke

Ćelije karcinoma, za razliku od zdravih ćelija, koriste aerobnu glikolizu uz smanjenu oksidativnu fosforilaciju, omogućavajući tako sintezu adekvatne količine ATP, koja je

neophodna tumorskim ćelijama da proliferišu u uslovima hipoksije (Warburg, 1956). LDH predstavlja enzim koji vrši reverzibilnu konverziju piruvata u laktat. U aerobnim uslovima, piruvat, kao krajnji proizvod glikolize ulazi u Krebsov ciklus preko acetilkoenzima A stvarajući energiju (adenozin tri fosfat, ATP) i redukovan nikotinamid adenin dinukleotid (NADH<sub>2</sub>). U uslovima hipoksije koji postoje u tumorima, piruvat se konvertuje u laktat, pri čemu se stvara oksidovani nikotinamid adenine dinukleotida (NAD<sup>+</sup>) i time omogućava stalno iskorišćavanje glukoze anaerobnom glikolizom, kao metaboličkim putem sinteze ATP-a. Reakcija koju katalizuje LDH:



NAD<sup>+</sup> nastao na ovaj način, uključuje se u proces glikolize (Fantin i sar., 2006). Iako laktat predstavlja krajnji proizvod anaerobne glikolize, pokazano je da se u tumorskim ćelijama ovaj metabolički put dešava čak i u prisustvu O<sub>2</sub>, zbog čega se danas, ovaj inače anaeroban proces, naziva aerobnom glikolizom, ali se ovaj fenomen ograničava isključivo na ćelije tumora. Na taj način, ćelije karcinoma, za razliku od zdravih ćelija, koriste aerobnu glikolizu uz smanjenu oksidativnu fosforilaciju, omogućavajući tako sintezu adekvatne količine ATP, koja je neophodna tumorskim ćelijama da proliferišu u uslovima hipoksije (Zhou i sar., 2010). Nadalje, u ćelijama kancera dolazi do prekomerne ekspresije hipoksijom indukovano faktora 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), što dovodi do povećanja ekspresije LDH gena. Ćelije kancera tako koriste anaerobne puteve za stvaranje energije čak i u prisustvu kiseonika i taj fenomen je Oto Warburg nazvao aerobna glikoliza (Warburg, 1956; Fantin i sar., 2006). Takozvani "glikolitički fenotip" omogućava malignim ćelijama ubrzan rast. Takođe, ovaj proces konstantno stvara metaboličke proizvode esencijalne za biosintezu makromolekula i ćelijski rast i deobu (Mazurek i Eigenbrodt, 2003). Povećan ulazak glukoze u ćeliju štiti ćeliju od apoptoze i omogućava tumorskoj ćeliji nezavisnost od faktora rasta (Plas i Thompson, 2002). Obzirom da su reaktivni kiseonični radikali (RKR) proizvodi mitohondrijalne proliferacije, pokazano je da konverzija glukoze u laktat štiti ćeliju od oksidativnog stresa (Brand i Hermfisse, 1997). Laktat oslobođen u anaerobnom metabolizmu, pomoću monokarboksilnog

transportera izlazi iz tumorske ćelije i dovodi do acidifikacije ekstraćelijskog matriksa (EĆM). Nizak pH mikrosredine tumora dovodi do razvoja agresivnog malignog fenotipa karcinoma dojke, tako što povećava ćelijsku invaziju i metastatski potencijal (Rozhin i sar., 1994; Martinez-Zigulian i sar., 1996). Štaviše, pokazano je da acidifikacija EĆM značajno smanjuje efikasnost hemioterapeutika (Stubbs i sar., 2000).

LDH je polimorfan enzim koga čini 5 izoenzima nastalih kombinacijom 2 polipeptidna lanca (M i H lanac), a koji su kodirani različitim genima (A i B geni). Tako se LDH1 sastoji od 4 H, a LDH 5 od 4M subjedinice (Koukourakis i sar., 2009). Što je broj M subjedinica veći u odnosu na H subjedinice, to LDH izoforma postaje efikasnija u konverziji piruvata u laktat (LDH5), dok porast broja H subjedinica u odnosu na M (LDH1) smanjuje efikasnost prevodjenja piruvata u laktat, zbog čega se piruvat usmerava i konvertuje u acetil koenzim A, koji dalje ulazi u Krebsov ciklus. Distribucija izoenzima LDH zavisi od metaboličkih zahteva pojedinačnog tkiva (Koukourakis i sar., 2003).

Aktivnost LDH je povišena u serumu obolelih od karcinoma dojke i koristi se kao marker stažiranja bolesti i prognoze. Laktat dehidrogenaza A (LDH-A) je jedna od glavnih izoformi LDH enzima eksprimiranog u tkivu karcinoma dojke. U jednoj studiji je pokazano da je aktivnost LDH5 izoenzima povećana u kancerskim ćelijama u odnosu na okolno tkivo, dok je aktivnost LDH1 izoforme smanjena u ćelijama kancera dojke u odnosu na peritumorsko tkivo (Koukourakis i sar., 2009).

U terapiju karcinoma dojke su uvedeni hemioterapeutici koji inhibirajući LDH-A dovode do povećanja produkcije RKR u ćeliji, što tumorsku ćeliju uvodi u proces apoptoze. Takođe je pokazano da je LDH-A medijator u razvoju rezistencije na Taxol, koji je jedan od najznačajnijih hemioterapeutika u lečenju pacijentkinja sa karcinomom dojke (Zhou i sar., 2010). Iz tih razloga, u ovom istraživanju ispitivali smo aktivnost LDH i MDH u tumorskom i peritumorskom tkivu i povezanost sa kliničkopatološkim parametrima (klinički stadijum bolesti, zahvaćenost limfnih čvorova, steroidni hormonski receptorski status, HER2 status).

LDH igra značajnu ulogu u rastu i progresiji ćelija kancera dojke (Fantin i sar., 2006). Onkogeni kao što su Src, Ras i humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2) posredstvom HIF1 $\alpha$  dovode do povećanog stvaranja enzima aerobne glikolize, kao što su LDH i MDH, kao i transpotera glukoze, Glut1 i Glut3 (Semenza i sar., 2001). Pokazano je da su procesi

aerobne glikolize i mitohondrijalne respiracije usko povezani. Istraživanja su pokazala da blokiranjem LDH dolazi do značajnog smanjenja aerobne glikolize što direktno povećava oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijama (Fantin i sar., 2006). Interesantno je da je nivo RKR u proliferišćim ćelijama na istom nivou, kao i u ćelijama koje se ne dele. Pored povećanja nivoa laktata, kao krajnjeg proizvoda aerobne glikolize, u tumorskim ćelijama se povećava i nivo piruvata (Brand i Hermfisse, 1997). Obzirom da je utvrđeno da je piruvat snažan antioksidans, manje stvaranje RKR u tumorskim ćelijama sa aerobnom glikolizom, objašnjava se antioksidativnom aktivnošću piruvata. Drugi način na koji tumorska ćelija sa aerobnom glikolizom kupira RKR jeste smanjena oksidativna fosforilacija u mitohondrijama što dovodi do smanjene produkcije RKR (Brand i Hermfisse, 1997).

### ***1.1.2. Uloga malat dehidrogenaze u karcinomu dojke***

Važan enzim metabolizma ćelije, MDH je enzim koga čine subjedinice molekulskih masa od 30-35 kDa. MDH je uključen u Krebsov ciklus i glukoneogenezu (Musrati i sar., 1998). MDH je vrši reverzibilnu konverziju oksaloacetata u malat, saglasno reakciji:



Postoje dve izoforme MDH enzima u ćelijama: c-MDH, koja se predominantno nalazi u citoplazmi i m-MDH izoforma koja se nalazi u mitohondrijama. mMDH je dimer koga čine 2 subjedinice istih molekulskih masa. Većina mitohondrijalnih enzima se sintetišu kao prekursori, uključujući i MDH. MDH sadrži N-terminalnu sekvencu koju odvajaju specifične peptidaze nakon ulaska u mitohondrije. Ulazak m-MDH u mitohondrije zavisi od transmembranskog potencijala mitohondrijalne membrane (Musrati i sar., 1998). Pokazano je da je transmebranski potencijal mitohondrijalne membrane poremećen u tumorskim ćelijama sa "glikolitičkim fenotipom" (Fantin i sar., 2006), što objašnjava razliku u distribuciji izoenzima MDH u tumorskim i zdravim ćelijama. c-MDH je homodimer koga čine subjedinice istih molekulskih masa (35kDa). c-MDH prenosi



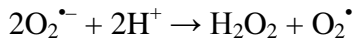
NADH nastao u citoplazmi u mitohondrije preko malat/aspartat sistema za prenos elektrona, pa se smatra da tkiva sa povećanom aktivnošću c-MDH efikasno stvaraju energiju. mMDH učestvuje u produkciji ATP jer omogućava redukciju  $\text{NAD}^+$  u NADH. Povećana aktivnost mMDH pokazana je u leukocitima trkačkih konja i tumorskih ćelija, koje imaju povećane potrebe za energijom (Washizu i sar., 2005). Takođe, pokazano je da tumorska tkiva pacijenata sa karcinomima glave i vrata imaju povećanu aktivnost MDH koja korelira sa gustinom novonastalih krvnih sudova tumora. Na taj način, bolja vaskularizacija tumora obezbeđuje kiseonik tumorskim ćelijama, koji aktivira MDH da indirektno stvara povećane količine ATP neophodne tumorskim ćelijama (Ross i sar., 2000).

## **1.2. Enzimi antioksidativne zaštite u karcinomu dojke**

U karcinomu dojke RKR imaju ulogu kako u ranim mutagenim promenama, tako i u fazi inicijacije i karcinogeneze tumora (Rajneesh i sar., 2008). Ćelije karcinoma ostaju permanentno pod uticajem oksidativnog stresa. Markeri konstantnog oksidativnog stresa su detektovani u uzorcima *in vivo* pacijentkinja sa karcinomom dojke (Kattan i sar., 2008, Weydert i sar., 2010). Superoksid anjon se generiše u mitohondrijama, nakon čega se redukuje u vodonik-peroksid i hidroksi radikal. Kao odbranu od RKR i ćelijske smrti, ćelije poseduju antioksidativni odbrambeni sistem. Ovaj sistem čine neenzimski antioksidanti, kao što su tokoferol, karotenoidi, askorbat, glutation, i antioksidativni enzimi kao što su SOD, CAT, peroksidaza (PX), glutation-peroksidaza (GPx), glutation-reduktaza (GR) i glutation-S-transferaza (GST) (Kattan i sar., 2008).

### **1.2.1. Uloga superoksid dismutaze u karcinomu dojke**

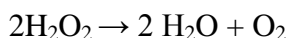
Kao prva linija odbrane od RKR, SOD katališe konverziju superoksidnog radikala u kiseonik ( $\text{O}_2$ ) i manje reaktivni vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), kao što pokazuje reakcija:



Vodonik peroksid se dalje razlaže pomoću CAT i/ili GPx i prevodi u vodu i kiseonik. Postoje tri izoforme SOD enzima u ćelijama:  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  SOD, koja se predominantno nalazi u citoplazmi, ekstraćelijska  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  SOD i  $\text{Mn}^{2+}$ SOD izoforma koja se nalazi u mitohondrijama (Tsanou E i sar., 2004 ; Matés i sar., 1999).  $\text{Mn}^{2+}$ SOD izoforma je homotetramer (96 kDa) koji sadrži  $\text{Mn}^{2+}$  u svom jezgru koji prelazi iz  $\text{Mn}^{2+}$  u  $\text{Mn}^{3+}$  i ponovo u  $\text{Mn}^{2+}$  tokom konverzije superoksida.  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  SOD se sastoji od 2 subjednice istih molekulskih masa (32 kDa) (Matés i sar., 1999).  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  SOD i  $\text{Mn}^{3+}$ SOD enzimi su uključeni u procese ćelijske proliferacije (Zhang i sar., 1999), invazivnosti tumorskih ćelija, ali i u zaštiti ćelija od letalnih uticaja faktora kao što su  $\text{TNF}\alpha$ , hemioterapeutici i jonizujuće zračenje (Hirose i sar., 1993).  $\text{Mn}^{2+}$ SOD predstavlja jedan od najznačajnijih antioksidativnih enzima čija je povećana ekspresija pokazana u tumorskim tkivima mnogih karcinoma kao što su karcinom bubrega, ovarijuma, tiroideje, kolorektalni karcinom i karcinom dojke (Schadendorf i sar., 1995; Yang i sar., 1995). Maligne ćelije karcinoma dojke zadržavaju svoju sposobnost da proizvode  $\text{Mn}^{2+}$ SOD i na taj način se štite od oštećenja ćelije reaktivnim kiseoničnim radikalima. Publikovane studije su pokazale da povećanje ekspresije SOD korelira sa stepenom povećanja rasta tumorskih ćelija (Zhang i sar., 1999). Takođe, pokazano je da je visok nivo ekspresije  $\text{Mn}^{2+}$ SOD povezan sa većim invazivnim i metastatskim potencijalom tumorskih ćelija (Tsanou E i sar., 2004).

### ***1.2.2. Uloga katalaze u karcinomu dojke***

Katalaza je tetramer koga čine 4 subjedice od 60 kDa, a koji efikasno vrši konverziju  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2$ . Reakcija koju katalizuje katalaza:



Pokazano je da dodavanje  $\text{H}_2\text{O}_2$  ćeliji uzrokuje dozno-zavisno povećanje iRNK za CAT u proliferišućim ćelijama (Matés i sar., 1999). Sa druge strane povećana ekspresija SOD i

nizak nivo  $O_2^-$  dovodi do smanjenja ekspresije CAT (Kelner i Bagnell, 1990). Kod normalnih netumorskih ćelija povećanje RKR unutar ćelije dovodi do indukcije apoptoze, dok je tumorska ćelija rezistentna na RKR-indukovanu apoptozu jer povećava ekspresiju za membranu vezane CAT. Naime, pokazano je da tumorske ćelije prilagodjavaju nivo ekspresije CAT dovoljan da blokira RKR koji bi mogli indukovati apoptozu (Bauer i sar., 2012). Povećana ekspresija CAT pokazana je u tumorskim tkivima karcinoma dojke u odnosu na benigno i normalno tkivo (Tsanou E i sar., 2004). Obzirom, da je CAT uključena u procese izbegavanja ćelijske smrti i proliferacije, u novije vreme ispituje se kao meta za nove terapeutike u karcinomu dojke (Bauer i sar., 2012). Iz tih razloga, u ovom istraživanju ispitivali smo aktivnost CAT i SOD u tumorskom i peritumorskom tkivu i povezanost sa kliničkopatološkim parametrima (klinički stadijum bolesti, zahvaćenost limfnih čvorova, steroidni hormonski receptorski status, HER2 status).

### **1.3. Mamografske karakteristike i poremećaji LDH, CAT i SOD**

U zapadnim zemljama raste incidenca karcinoma dojke dok mortalitet opada, dok u zemljama koje nemaju skrining, kao što je naša zemlja, mortalitet raste (Puliti i sar., 2012; Boyd i sar., 2011). Mamografija kao skrining metod u detekciji karcinoma dojke se široko koristi za ranu detekciju supkliničkih karcinoma dojke. Implementacija mamografije za skrining karcinoma dojke dovela je do povećanja broja *in situ* detektovanih karcinoma dojke. Mamografija predstavlja najadekvatniji pregled dojki za detekciju karcinoma dojki, posebno za grupu žena preko 40 godina, starosnoj grupi sa najvećom incidencom ove bolesti (Boyd i sar., 2011). Tipični mamografski nalazi koji se javljaju u skriningu žena za karcinom dojke su: grupisane kalcifikacije koje po morfologiji nose rizik za malignitet, zatim fokalna asimetrija, narušena arhitektonika, tumorske senke manje od 1cm, i drugi.

Na mamografijama masno tkivo se vidi kao radiološke polusenke (sa stanovišta optike siva polja), dok se fibroglandularno tkivo vidi kao radiološke senke (bela polja). Zastupljenost senki na mamografijama u odnosu na polusenke naziva se denzitet parenhima dojki, izražava se u procentima i predstavlja važan nezavisan prediktor za

nastanak karcinoma dojke (Boyd, 2011). Mamografije se opisuju prema Američkoj organizaciji radiologa (eng. American College of Radiology, ACR) tzv. BIRADS (eng., Breast Imaging Reporting and Data system) leksikonu (Burnside i sar., 2009). Mamografije se klasifikuju prema procentu denziteta parenhima u celoj dojci koristeći 4 kategorije stukture dojki (ACR1<25%, ACR2<50%, ACR3>50% i ACR4>75%). Prema BIRADS kategorizaciji za lezije okarakterisane kao BI-RADS 4a, b, c i 5 se smatraju suspektnim na malignitet i one se dalje histopatološki ispituju. Sa povećanjem BI-RADS kategorije raste verovatnoća da je tumorska lezija maligna. Biološka osnova za povećani rizik za pojavu karcinoma dojke, uslovljena povećanom mamografskom gustinom, nije razjašnjena. Detaljna patofiziologija veće mamografske gustine u tkivu kancera nije dovoljno ispitana. U tom smislu, ni povezanost molekularnih parametara u tumorskom tkivu sa mamografskim nalazima pacijentkinja sa karcinomom dojke nije istraživana do sada.

Prethodne studije su pokazale da mutageni utiču na povećanje procenta denziteta parenhima. Nekoliko publikovanih studija pokazalo je da postoji povezanost između mutagena malondialdehida (MDA), pokazatelja oksidativnog stresa i povećane mamografske gustine (Boyd i Mcguire, 1990), što nam sugeriše da radiološka gustina dojki može da korelira sa mutacijama koje dovode do oštećenja DNK (Basu i Marnett, 1983) i povećanja ćelijske proliferacije (Jaganjac i sar., 2012). SOD i CAT su antioksidativni enzimi koji imaju ulogu antiapoptotskih faktora u oksidativnom stresu. Novije studije pokazuju da ćelije karcinoma dojke imaju visok nivo i povećanu aktivnost SOD (Tsanou i sar., 2004). Visoka aktivnost SOD često je udružena sa izraženim invazivnim i metastatskim karakteristikama ćelija karcinoma. Štaviše, klinička ispitivanja pokazuju da aktivnost SOD i CAT pozitivno korelira sa gradusom tumora kod pacijentkinja sa karcinomom dojke i posebno, sa invazivnim i metastatskim fenotipom pacijentkinja u odmaklim stadijumuma (Jaganjac i sar., 2012; Kumaraguruparan i sar., 2002). Povećana produkcija RKR i antioksidativnih faktora u ćelijama karcinoma dojke se objašnjava specifičnim mehanizmom metabolizma estrogenih hormona u kojem učestvuje laktoperoksidaza (Brown i Bicknell, 2001). Obzirom da je pokazano da su procesi karcinogeneze i metastaziranja delimično uzrokovani oksidativnim stresom, ispitivanje povezanosti antioksidativnih enzima u tkivu karcinoma dojke sa

mamografskim karakteristikama predstavlja važan podatak u definisanju agresivnijih podtipova karcinoma dojke.

Marker anaerobnog metabolizma, LDH-A predstavlja jednu od glavnih izoformi LDH koja je eksprimirana u tumorskom tkivu dojke. LDH omogućava ćelijama karcinoma dojke da proliferišu u uslovima hipoksije (Fantin i sar., 2006). Novije studije ukazuju da LDH ima važnu ulogu u razvoju rezistencije ćelija karcinoma dojke na Taksol, kao i da je veća aktivnost LDH u tumorskom tkivu povezana sa visoko invazivnim karcinomom dojke (Zhou i sar., 2010; Konjević i sar., 2001). Takodje, pokazano je da je visok nivo i povećana aktivnost LDH i MDH udružena sa visokim proliferativnim indeksom (De Berardinis i sar., 2008). Veći broj ćelija i visoka proliferativna aktivnost predstavljaju karakteristike veoma invazivnog i metastatskog karcinoma dojke (Ursin i sar., 2005). U ovom istraživanju ispitivali smo povezanost aktivnosti enzima oksidativnog stresa i anaerobnog metabolizma sa mamografskim karakteristikama.

Pozitivnost receptora za HER2 u tumoru je dobro utvrđen prognostički marker u karcinomu dojke i predstavlja metu hemioterapeutika za rani i odmakli kancer dojke (Filipits i sar., 2011; Wang i sar., 2008). U ovom istraživanju ispitivali smo da li radiološke karakteristike mamografija (senke, grupisane kalcifikacije) mogu biti povezane sa HER2 statusom. Obzirom da denzitet parenhima predstavlja faktor rizika (Wang i sar., 2008), jedan od ciljeva istraživanja je bio određivanje enzimskog profila tkiva sa većim denzitetom parenhima.

#### **1.4. Poremećaji MMP-2 i MMP-9 u karcinomu dojke**

Matriks metaloproteinaze (MMP) predstavljaju familiju od 23 strukturno povezane  $Zn^{2+}/Ca^{2+}$  zavisne endopeptidaze koje imaju sposobnost da degradiraju EĆM i razgradjuju bazalnu membranu (BM). Metaloproteinaze razgradjujući EĆM posreduju u mnogobrojnim fiziološkim procesima kao što su reprodukcija, involucija materice, embrionalni razvoj, angiogeneza, ali i u patološkim procesima.

Bazalna membrana i intersticijalna stroma izgrađene su od različitih proteina kao što su kolagen, elastin, zatim glikoprotein laminin, fibronektin, entaktin, kao i brojni

proteoglikani i glikozaminoglikani (Woessner, 1991). Sinteza i razgradnja komponenti ekstraćelijskog matriksa je strogo regulisana. Na osnovu njihove strukture, substratne specifičnosti i ćelijske lokalizacije metaloproteinaze su podeljene u pet podgrupa:

- 1) kolagenaze (MMP-1 i MMP-8), razgradjuju fibrilarni kolagen
- 2) želatinaze (MMP-2 i MMP-9) deluju na kolagen tipa IV kao i na denaturisani kolagen (želatin)
- 3) stromelizine (MMP-3, MMP-7, MMP-10) koji imaju širi spektar supstrata kao što su proteoglikani, laminin i fibronektin
- 4) matrilizine (MMP-7) koja ima najširi spektar supstrata EĆM,
- 5) MMP vezane za membranu (MT-MMP) koji predstavljaju proteine vezane za ćelijsku membranu sposobne da aktiviraju MMP-2 (Tabela 1) (Christiansen i Rajasekaran, 2006).

Metaloproteinaze se sekretuju kao solubilni proenzimi koji se aktiviraju zahvaljujući jonu  $Zn^{2+}$  koji se nalazi u središtu molekula i spoljnom prisustvu jona  $Ca^{2+}$  (Freije i sar., 1994). Enzimska aktivnost metaloproteinaza je strogo kontrolisana na više nivoa i disregulacija ove aktivnosti dovodi do nekontrolisane razgradnje EĆM koja je u osnovi procesa tumorskog metastaziranja (Freije i sar., 1994; Woessner, 1991). Najčešće povezivane metaloproteinaze sa procesom metastaziranja su MMP-2 (želatinaza A) i MMP-9 (želatinaza B), zbog njihove sposobnosti da razlažu kolagen tipa IV, glavnu komponentu bazalne membrane krvnih sudova.

Enzimska aktivnost metaloproteinaza je strogo regulisana na nivou genske ekspresije, stabilnosti iRNK, aktivacije proenzima i inhibicije enzimske aktivnosti njihovim endogenim tkivnim inhibitorima. Konstitutivna ekspresija MMP je niska, ali u određenim fiziološkim i patološkim uslovima koji podrazumevaju razgradnju EĆM, njihova ekspresija se povećava.

Iako imaju iste supstrate regulacija ekspresije MMP-2 i MMP-9 na transkripcionom nivou je različita. Tako na primer, MMP-9 poseduje na svom promotoru vezujuća mesta za NFκB i SP-1 protein, zahvaljujući kojim TNFα (eng. Tumor Necrosis Factor α, TNFα) indukuje ekspresiju MMP-9 (Ries C i Petrides, 1995). Važnu ulogu u kontroli njihove ekspresije imaju transkripcioni faktori koji se vezuju AP-1 (aktivator protein-1) i

pripadaju porodici *jun* i *fos*. Karakteristično je da MMP-2 poseduje nekoliko regulatornih sekvenci, specifičnih samo za ovaj enzim, i njegova ekspresija je regulisana pre svega aktivatorima (Woessner, 1991).

**Tabela 1. Članovi MMP porodice i njihovi supstrati**

Grupa	Oznaka	Supstrati ekstracelularnog matriksa
<b>Kolagenaze</b>		
Intersticijalne kolagenaze	MMP-1	Kolagen tipa I, II, III, VII i X, entaktin, agrekan, tenascin, proMMP-1,-2
Neutrofilne kolagenaze	MMP-8	Kolagen tipa I, II i III
Kolagenaza-3	MMP-13	Kolagen tipa I, II, III, VI i X, agrekan, fibronektin, laminin, tenascin, proMMP-9,-13
<b>Želatinaze</b>		
Želatinaza A	MMP-2	Kolagen tipa I, IV, V, VI, VII, X i XI, fibronektin, laminin, vitronektin, entaktin, proMMP-1, 9,-13
Želatinaza B	MMP-9	Kolagen tipa I, IV, V, VI, X i XI, fibronektin, elastin, vitronektin, entaktin, agrekan
<b>Matrilizini</b>		
Matrilizin	MMP-7	Kolagen tipa III, IV, IX, X i XI, fibronektin, elastin, fibrin, entaktin, laminin, tenascin, proMMP-2,-7
<b>Stromelizini</b>		
Stromelizin-1	MMP-3	Kolagen tipa III, IV, V,VI, IX, X i XI, proMMP-1,-3,-7,-9,-13, fibronektin, osteonektin, proteoglikani
Stromelizin-2	MMP-10	Kolagen tipa III, IV, V i IX, fibronektin, laminin, proteoglikani
Stromelizin-3	MMP-11	Kolagen tipa IV, fibronektin, laminin, agrekan, 1 $\alpha$ inhibitor proteinaza
<b>MMP vezane za membranu</b>		
MT1-MMP	MMP-14	Kolagen tipa I, II i III, fibrin, fibronektin, proMMP-2, 13, laminin, agrekan, 1 $\alpha$ inhibitor proteinaza
MT2-MMP	MMP-15	ProMMP-2, fibronektin, laminin, agrekan, proteoglikani, entaktin, tenascin
MT3-MMP	MMP-16	ProMMP-2, kolagen tipa III, fibronektin, laminin, agrekan, vitronektin
MT4-MMP	MMP-17	Fibronektin, fibrinogen
MT5-MMP	MMP-24	ProMMP-2, fibronektin, proteoglikani
MT6-MMP	MMP-25	Pro-MMP-2, fibronektin, fibrinogen, fibrin, proteoglikani
<b>Druge</b>		
Metaloelastaza makrofaga	MMP-12	Kolagen tipa I i V, elastin, fibronektin, osteonektin, 1 $\alpha$ inhibitor proteinaza, vitronektin
Enamelizin	MMP-20	Agrekan, amelogenin

Ćelije (monociti, limfociti, tumorske ćelije) sekretuju metaloproteinaze u latentnoj formi, kao zimogene (proMMP). Aktivacija zimogena zahteva specifični aktivacioni proces koji se naziva „cisteinsko prekopčavanje“ (vezivanje cisteinskog ostatka prodomena za jon Zn<sup>2+</sup> koji se nalazi u aktivnom mestu enzima) (Newby, 2005). Proteolitička aktivacija se odigrava u ekstracelularnom prostoru preko plazmina i urokinaza plazminogen aktivatora (uPA) ili preko drugih članova MMP porodice, kao što su MMP-11 i MT-MMP. MT1-MMP je lokalizovana na površini ćelije i osim što aktivira MMP-2 (Pucci-Minafra i sar., 2001), ona je neophodna za proces ćelijske migracije.

Aktivnost MMP je modulirana porodicom sopstvenih prirodnih tkivnih inhibitora (TIMP eng., Tissue Inhibitor of Matrixmetaloproteinases), koji su homologni po svojoj strukturi (TIMP-1 do TIMP-4). TIMP-1, prvi član ove porodice, je glikoprotein molekulske mase 29 kDa, koji vezuje aktivnu formu MMP-1 i stromelizin-1 (MMP-3) (Hofmann i sar.,

2005), latentnu i aktivnu formu MMP-9, kao i njihove dimere. Fibroblasti, makrofagi i različite tumorske ćelije sekretuju i eksprimiraju istovremeno sve navedene enzime i TIMP-1. TIMP-1 se eksprimira kad su ćelije stimulirane faktorima rasta, hormonima i citokinima (Hofmann i sar., 2005). Nizak nivo TIMP-2 (inhibitor MMP-2) je, paradoksalno svom nazivu, neophodan za aktivaciju proMMP-2, gde TIMP-2 služi kao most između proMMP-2 i MT1-MMP. MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2 kompleks se aktivira zahvaljujući dodatnom molekulu MT1-MMP. Visok nivo TIMP-2 blokira MT1-MMP (Woessner, 1991) .

Ravnoteža između metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora je veoma značajna, jer narušavanje te ravnoteže vodi nekontrolisanoj razgradnji EĆM u različitim patološkim stanjima. Proces metastaze, iako opasan, je veoma neefikasan sa mnogobrojnim ćelijama koje podležu apoptozi i klinički su irelevantne. Ćelije koje proliferišu i dormantne ćelije su klinički odgovorne za rekurentnost karcinoma (Gotzmann i sar., 2004). Dormantnost tumora je kompleksan i slabo razjašnjen fenomen, istraživani kod ljudi i u životinja, i povezan je sa nedovoljnim kapacitetom stvaranja krvnih sudova (Townson i Chambers, 2006). Događaj, nazvan „angiogenezni prekidač“, određen poremećajem ravnoteže između pro- i anti-angiogeneznih faktora, pod uticajem dva proteolitička sistema, uPA i MMP, menja dormantno stanje ćelija i pokreće invazivni rast tumora. MMP-2 i MMP-9 su neophodne za tzv. “angiogenic switch” “angiogenezni prekidač” i njihova povećana ekspresija može biti prediktivna za prelaz ne-angiogeničnog, mikroskopskog, dormantnog tumora u angiogenični i invazivni oblik (Polyak i Hahn, 2006).

Maligni tumori za razliku od benignih, imaju sposobnost invazije i razaranja okolnog tkiva i stvaranja metastatskih fokusa. Zbog toga invazivnost i metastaziranje predstavljaju važne biološke karakteristike malignih tumora.

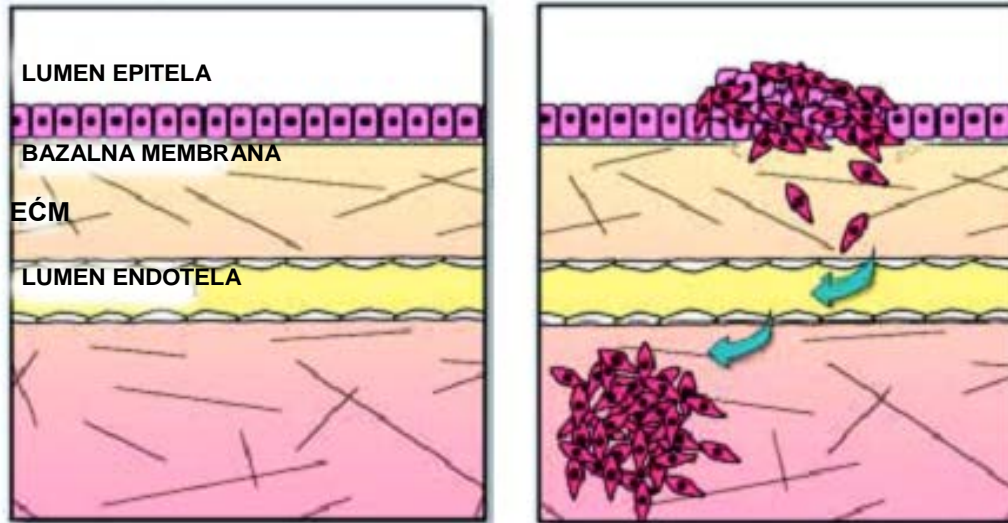
Prvu fazu metastatske kaskade predstavlja lokalna invazija tkiva domaćina (Devita i sar., 2004). Da bi otpočele invaziju tumorske ćelije moraju da se razdvoje jedna od druge. Normalne ćelije su međusobno i sa okolnom stromom povezane pomoću adhezivnih molekula, procesima homotipske ćelijske adhezije i kontaktne inhibicije. Endotelni kadherini (E-kadherin) predstavljaju familiju transmembranskih glikoproteina, pomoću kojih endotelne ćelije ostaju vezane za okolnu stromu (Bracke i sar., 1996). Gubitak E-kadherina i E-kadherin-katenin kompleksa dovodi morfološki do poremećaja strukture



citoskeleta i omogućava ameboidne pokrete i motilitet ćelija, remeti ćelijski ciklus i pospešuje ćelijsku proliferaciju. Smanjenje adhezivnih veza ubrzava odvajanje tumorskih ćelija od primarne mase tumora (Birchmeier i Behrens, 1994).

Konstitutivna ekspresija aktivnih MMP u epitelnim ćelijama dojke dovodi do proteolitičke razgradnje E-kadherina i progresivnih promena fenotipa *in vitro*, uključujući gubitak katenina u međućelijskim vezama, smanjenje citokeratina i povećanje ekspresije vimentina i MMP-9. Ove promene uslovljavaju promenu stabilnog epitelnog ćelijskog fenotipa u nestabilni mezenhimalni fenotip. *In vivo* ekspresija stromelizina (MMP-3) pokreće karcinogenezu ćelija dojke, koja podrazumeva određene promene u genomu ćelije, čime se objašnjava povezanost smanjene ćelijske adhezije sa malignom transformacijom (Lochter i sar., 1997).

U mnogim karcinomima, progresija u malignitet je povezana sa gubitkom epitelne diferencijacije i promenom u mezenhimalni fenotip. Ovaj proces, poznat kao epitelno-mezenhimna tranzicija (EMT), povećava pokretljivost i invazivnost različitih ćelijskih tipova i smatra se ključnim događajem u kasnoj fazi tumorogeneze i početku tumorske infiltracije i metastaziranja. EMT predstavlja mehanizam kojim se epitelne ćelije oslobadaju međućelijskih veza i stiču pokretljivost (Lochter i sar., 1997; Christiansen i Rajasekaran, 2006). Tranzicija iz dobro diferentovanog fenotipa u invazivni mezenhimalni fenotip podrazumeva različite molekularne mehanizme koji nezavisno pospešuju pokretljivost i invazivnost tumorskih ćelija. EMT karakteriše proteolitička promena E-kadherina u N-kadherin. Mezenhimalne ćelije koje su izgubile uske spojeve tzv. tight junctions, gube i apikalno-bazalni polaritet. Mezenhimalne ćelije sekretuju MMP-2 i MMP-9, koje degradiraju BM i pomažu proces invazije (Woessner, 1991).



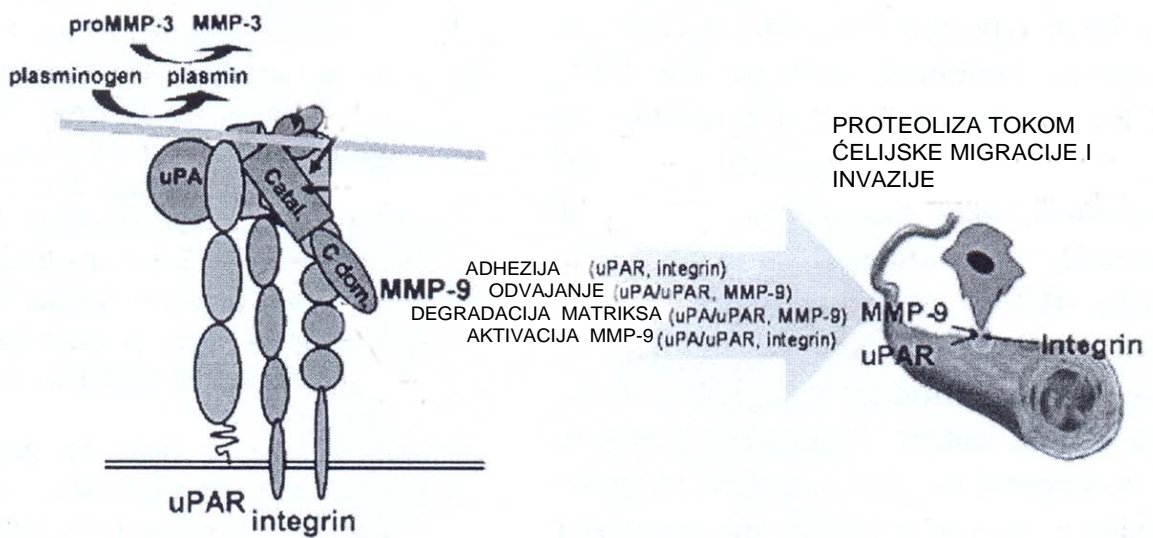
Slika 1. Endotelno-mezenhimna tranzicija (EMT) u malignom procesu (Christiansen i Rajasekaran, 2006).

Transformišući faktor rasta ( $TGF\beta$ ) je ključni molekul u procesu EMT različitih epitelnih ćelijskih tipova. Tokom EMT povećani nivoi Src kinaze, integrinima vezane kinaze, MMP-11, MMP-12 i MMP-14 indukuju citoskeletne promene i pospešuju ćelijski motilitet. Plastičnost malignih ćelija omogućava nekompletnu tranziciju, reverziju u epitelni fenotip i kolektivnu migraciju ćelija zahvaljujući različitim molekularnim mehanizmima koji posreduju u procesu EMT. Svi ovi mehanizmi se dešavaju u seriji nezavisnih i reverzibilnih koraka. EMT predstavlja jedan od ključnih mehanizama u procesu metastaziranja karcinoma. Gubitak p53 utiče na povećanu ekspresiju MMP-2 i sniženje ekspresije E-kadherina i tako pomaže procese invazije i metastaziranja ćelija karcinoma (Christiansen i Rajasekaran, 2006).

U procesu razgradnje EĆM tumorske ćelije koriste dva proteolitička sistema, plazminogen i MMP. Pretpostavlja se da kaskada proteolitičkih enzima raščišćava put tumorskim ćelijama na napredujućim ivicama tumora koje tako kreću u invaziju. Inaktivne, proforme enzima (zimogena) su sekretovane lokalno i aktiviranjem njihovih regulatornih enzima, koje proizvode ili tumorske ćelije ili stroma, postaju aktivne (Laufs i sar., 2006).

MMP-2 i MMP-9 su proenzimi koji se aktiviraju ekstraćelijski, a plazminogen sistem kontroliše njihovu aktivaciju. Obe želatinaze su vezane za površinu ćelije i aktiviraju se vezivanjem uPA i plazminogena za ćelijsku površinu. Inhibicija aktivacije plazminogena zaustavlja aktivaciju želatinaza. Plazmin u solubilnoj formi razgradjuje obe želatinaze, ali u zavisnosti od doze i koncentracije plazminogena i uPA, može da aktivira želatinaze (Laufs i sar., 2006).

Razgradnja EĆM predstavlja strogo kontrolisan proces koji zavisi od koncentracije sekretovanih proenzima, njihovih aktivatora i inhibitora. Tumorske ćelije stiču sposobnost kretanja i ako je nivo litičkih enzima koji pomažu invaziju, kao što su MMP-2 i MMP-9 veći od nivoa njihovih inhibitora, proces invazije se nastavlja. Tako se inhibitorima litičkih enzima može zaustaviti proces tumorske invazije (Bracke i sar., 1996).



Slika 2. Uloga MMP i uPA sistema u invaziji (Bracke i sar., 1996).

Ekstraćelijski MMP induktor (EMMPRIN ili CD147) je član familije imunoglobulina i glikoprotein koji se nalazi na površini tumorskih ćelija. Povećana ekspresija EMMPRIN povezana je sa procesima invazije i metastaziranja, rasta i preživljavanja malignih ćelija i uzrok je rezistentnosti tumora na neke hemioterapeutike (Mignatti i Rifkin, 1993). Interakcija između tumora i EĆM kreira mapu ekspresije proteolitičkih enzima MMP-2 i

MMP-9, delimično, tako što indukuje ekspresiju EMMPRIN na pojedinim mestima. Solubilni EMMPRIN deluje parakrino na lokalne ćelije strome, ali i na stromalne ćelije u udaljenim tumorskim fokusima da dalje luče MMP i tako vrše invaziju tkiva (Christiansen i Rajasekaran, 2006).

Obzirom na porast incidence karcinoma dojke u svetu, javlja se sve veća potreba za tumor markerom koji bi pouzdano mogao da identifikuje mali, duktalni karcinom dojke sa mogućom tendencijom recidiva (Chabottaux i sar., 2006). Postoje podaci koji pokazuju da marker prognoze za karcinom dojke može biti među proteinima koji učestvuju u procesu tumorske progresije u karcinomu. U moguće kandidate koji bi bili pouzdani tumor markeri spadaju i MMP-2 i MMP-9, kao i njihovi inhibitori.

MMP-2 i MMP-9 su uključene u inicijaciju, rast i metastaziranje tumora, usled njihove specifičnosti za kolagen tip IV, glavne komponente BM krvnih sudova. Obzirom na njihovu ulogu u progresiji tumora, MMP-2 i MMP-9 su ispitivane kao tumor markeri za mnoge karcinome kao što su karcinom kolona, karcinom dojke, želuca, pluća, bubrega, zatim u malignitetima ginekološke regije (Mignatti i Rifkin, 1993).

Ispitivanja aktivnosti MMP-2 i MMP-9 u serumu i tumorskom tkivu pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke pokazuju da je nivo aktivnosti ovih enzima značajno veći u bolesnica nego kod zdravih. Takođe aktivnost ovih enzima u serumu bolesnica korelira sa TNM stadijumom bolesti (LaRocca i sar., 2004). U tumorima se MMP-2 i MMP-9 nalaze u svojim proformama, kao zimogeni (proMMP-2 i proMMP-9), ali i u aktivnim formama (aMMP-2 i aMMP-9). Takođe, i kao proforme one su sposobne da razlažu denaturisani kolagen (želatin). Aktivnost aMMP-2 i aMMP-9 u tumorskom tkivu može se koristiti u praćenju i prognozi pacijentkinja sa karcinomom dojke i visoka aktivnost želatinaza u tumorima je povezana sa nižom stopom preživljavanja (Ranuncolo i sar., 2003).

Tendencija porasta aktivnosti MMP-9 prisutna je kod bolesnica obolelih od karcinoma dojke sa estrogen pozitivnim receptorima. Aktivni estrogenski receptori učestvuju u progresiji tumora, stimulišu ćelijski rast i invazivnost povećavajući ekspresiju MMP, uključujući MMP-9 (Stanković i sar., 2010). Aktivnost MMP-9 raste sa porastom limfovaskularne mreže u tumoru, što ukazuje na moguću ulogu MMP-9 u razgradnji

bazalne membrane i intravazaciji ćelija karcinoma u krvne sudove i samim tim na povezanost MMP-9 i procesa angiogeneze.

Prekomerna ekspresija transkripcionog faktora aktivator proteina 2 (AP-2) i HER2 onkogeni povezana je sa progresijom bolesti i povećanim invazivnim kapacitetom karcinoma dojke, delimično zbog sposobnosti ovih molekula da aktiviraju MMP. Pokazano je da u ranoj fazi karcinoma dojke HER2 indukuje ekspresiju i aktivaciju MMP-2 i MMP-9 u stromi, što vodi daljoj progresiji bolesti i stvaranju metastaza (Stanković i sar., 2010).

Prikazana povezanost porasta aktivnosti MMP-2 i MMP-9 u serumu i kliničkog stadijuma ukazuje na korisnost ovih parametara kao tumor markera, u praćenju i prognozi pacijentkinja sa karcinomom dojke. Može se zaključiti da aktivnost MMP-2 i MMP-9 može biti marker

- praćenja (povezanosti sa kliničkim stadijumom)
- prognoze (prognostički marker za mnoge karcinome)
- preživljavanja.

Karcinom dojke je po novoj molekularnoj podeli klasifikovan na bazalni, luminalni A, luminalni B i HER2 pozitivni podtip sa razlikama u prognozi i odgovorima na terapiju tumora (Reis-Filho i Tutt, 2008). Tumori dojke koji imaju bazalni fenotip, karakterišu se prisustvom ćelija koje pokazuju sličnost sa mamarnim progenitorskim ćelijama i smatra se da imaju lošiju prognozu i da su rezistentni na standardnu hemioterapiju (Reis-Filho i Tutt, 2008). Ovi podaci su u skladu sa teorijom da je izostanak dejstva na stem ćelije karcinoma uzrok neuspeha nekih hemioterapeutika (Weigelt i Reis-Filho, 2009). Nove publikacije pokazuju da genski zapis "wound response" tj. geni uključeni u "zaceljivanje rana", sadrži gene koji su uključeni u procese remodeliranja EĆM i angiogeneze. Ovi geni inače imaju fiziološku ulogu u remodeliranju EĆM i angiogenezi, ali pod određenim uslovima oni se menjaju i pomažu rast tumora. Konstitutivno aktivan komplet gena "wound response" pokazuje sličnosti sa genskim zapisom koji ima bazaloidni tip karcinoma dojke, što bi se moglo iskoristiti u terapiji ovog tipa tumora (Polyak i Hahn, 2006).

Angiogeneza je proces neophodan u embriogenezi, procesu zarastanju rana, ali i u patološkim procesima, kao što je rast tumora. Pokazano je da postoji povezanost između

procesa zarastanja rana i progresije bolesti različitih epitelnih tumora. Mnogi od normalnih reparativnih procesa mogu biti konstitutivno aktivni u tumoru i ključni u lokalnoj invaziji tumora i metastaziranju u udaljene organe (Devita i sar., 2004).

Pokazano je da neutralizacija vaskularnog endotelnog faktora rasta (eng. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), kao i inhibicija MMP, sintetičkim MMP inhibitorima širokog spektra, smanjuje formiranje, tumorima indukovanih, novih tubularnih formacija. Neke studije su pokazale da MMP, posebno MT-MMP, igraju ključnu ulogu u formiranju tubularnih struktura sličnih kapilarima u stromi sa kolagenom i fibrinom *in vitro* i na taj način mogu biti značajne i u angiogenezi *in vivo* (Brenton i sar., 2005).

### **1.5. Poremećaj funkcije TIMP1 u karcinomu dojke**

U novije vreme ispituje se više prognostičkih markera za pacijentkinje sa karcinomom dojke kao što su markeri proliferacije (mitotski indeks, Ki-67, ciklin D1, HER2), markeri apoptoze (Bcl<sub>2</sub>, TIMP1, p53, Bax) i markeri angiogeneze (VEGF, MMP-2 i MMP-9). Nekoliko studija je pokazalo da se TIMP1 može koristiti kao prognostički marker i pokazatelj odgovora na terapiju za pacijentkinje sa karcinomom dojke (Thomson i sar., 2003).

Pokazano je da TIMP1 pored svojih efekata inhibicije MMP-9, stimuliše rast tumora, kao i da povećava proliferaciju kako normalnih tako i tumorskih ćelija (Yamashita i sar, 1996). TIMP1 stimuliše proliferaciju na MMP nezavisan i na MMP zavisan način (Murphy i sar., 2002). Ćelije karcinoma dojke imaju na svojoj površini receptore za TIMP1 (CD63). Vezivanje TIMP1 za CD63- integrin  $\beta$ 1 kompleks dovodi do intraćelijske signalizacije, odnosno aktivacije mitogenima aktivirane protein kinaze (MAPK) što dalje rezultira proliferacijom ćelija. MAPK signalni put aktiviraju faktori rasta i dovode do ćelijske proliferacije. Studije su pokazale da TIMP1 različito deluje na ćelije u zavisnosti od različite ekspresije receptora za TIMP1 na membrani ćelije. Povećana ekspresija CD63 je povezana sa stepenom maligniteta. TIMP1 takodje, aktivira Ras koji dalje dovodi do aktivacije MAPK signalnog puta tirozin specifičnom fosforilacijom (Jung i sar., 2006). Pored navedenog MMP nezavisnog načina na koji TIMP1 stimuliše ćelijsku proliferaciju, TIMP1 i preko MMP može uticati na proliferaciju

(Murphy i sar., 2002). Pokazano je da TIMP1 blokirajući konstitutivno aktivne MMP, onemogućava razgradnju nosivih faktora rasta aktivnim MMP i tako omogućava faktorima rasta da stimuliraju proliferaciju ćelije (Wen i sar., 1999).

Pored efekata na proliferaciju ćelija, pokazano je da TIMP1 ima antiapoptotski efekat. Utvrđeno je da visok nivo ekspresije TIMP1 indukuje konstitutivnu aktivaciju FAK (eng. Focal Adhesion Kinase, FAK). FAK je aktivator PI(3) kinaze koja reguliše Bcl<sub>2</sub>, protein koji omogućava preživljavanje ćelije i izbegavanje apoptoze. Bcl<sub>2</sub> i Bcl<sub>XL</sub> su proteini mitohondrijalne membrane koji blokiraju Bax, protein koji oslobadja citohrom c iz mitohondrija. Obzirom da citohrom c aktivira kaspaze, glavne posrednike u apoptozi, zadržavanjem citohroma c u mitohondrijama sprečava se apoptoza. Takođe, pokazano je da TIMP1 povećava ekspresiju Bcl<sub>2</sub> i Bcl<sub>XL</sub>. Zbog navedenog mehanizma, dolazi do smanjene senzitivnosti tumorskih ćelija sa visokim nivoom ekspresije TIMP1 na hemioterapeutike koji deluju indukujući apoptozu (Würtz i sar., 2008).

U početku se smatralo da TIMP1 ima antiangiogeneza dejstva, ali vremenom je pokazano da TIMP1 pospešuje angiogenezu. Naime, pokazano je da je stvaranje endostatina i angiostatina, inhibitora angiogeneze, posredovano MMP. MMP oslobadaju endostatin i angiostatin iz kolagena, tako što razlažu kolagen (Wen i sar., 1999). Na taj način, inhibirajući MMP, TIMP1 sprečava stvaranje endostatina i angiostatina, što pomaže angiogenezu tumora. Takođe, pokazano je da tumori dojke kod pacova sa visokom ekspresijom TIMP1 rastu veći i imaju bolju vaskularizaciju u poredjenju sa kontrolama (Yoshiji i sar., 1998). Pored toga, pokazano je da TIMP1 direktno stimuliše VEGF, koji omogućava stvaranje krvnih sudova tumora. Mehanizam kojim TIMP1 stimuliše VEGF i tako pomaže angiogenezu još uvek nije razjašnjen.

U nekoliko studija pokazano je da je ekspresija TIMP1 povećana u tkivu kancera dojke u poredjenju sa benignim ili normalnim tkivom dojke (Brummer i sar., 1999). Pored toga, utvrđeno je da je ekspresija iRNK i proteina TIMP1 statistički značajno veća u malignom u odnosu na benigno tkivo dojke. Pokazano je da se iRNK ekspresija TIMP1 povećava sa invazivnim potencijalom transformisanih ćelija. TIMP1 je slabo ekspimiran u normalnom tkivu, više u kanceru *in situ*, a najviše u invazivnom karcinomu dojke (Nakopoupoulou i sar., 2002). Jones sa saradnicima je pokazao da je protein TIMP1 najzastupljeniji u fibroblastima i zidovima malih krvnih sudova, a manje u tumorskim

ćelijama (Jones i sar., 1999). Navedeni podaci sugerišu da TIMP1 proizvode uglavnom ćelije strome.

### **1.6. Poremećaj funkcije STAT3 u karcinomu dojke**

Pored svoje osnovne uloge u ostvarivanju dejstva citokina, nedavno je pokazano da signalni prenosiooci i aktivatori transkripcije (eng. Signal Transducer and Activators of Transcription, STAT) mogu imati veliku ulogu u nastanku tumora i smatraju se potencijalnim onkogenima. Konstitutivna aktivacija STAT familije, naročito članova STAT3 i STAT5, kao i gubitak STAT1 signala, pokazana je kod nekoliko vrsta tumora, uključujući i karcinom dojke (Calo i sar., 2003). Rezultati ukazuju da STAT proteini regulišu brojne puteve koji su uključeni u karcinogenezu, kao što je progresija ćelijskog ciklusa, apoptoza, angiogeneza, invazivnost tumora, metastaziranje, i izbegavanje imunskog odgovora. Iz tih razloga, STAT proteini postaju terapijske mete za nove lekove u onkologiji, jer se direktnim ili indirektnim blokiranjem ovih molekula može uticati na zaustavljanje malignog procesa (Haura i sar., 2005).

Značajno je da se po opštem načinu delovanja STAT proteini mogu podeliti u dve grupe koje se medjusobno veoma razlikuju. Grupu koju čine STAT2, STAT4 i STAT6 aktivira mali broj citokina i ona učestvuje u razvoju T ćelija i efektu interferona. Sa druge strane, druga grupa koju čine STAT1, STAT3 i STAT5 se aktivira u mnogim tkivima i vrstama ćelija od strane velikog broja citokina i različitih hormona i faktora rasta i, preko njih se, pored imunskih reakcija, regulišu brojni važni opšti procesi kao što su ćelijska proliferacija, diferencijacija i preživljavanje u embriogenezi, ali i fiziološki razvoj dojke (Calo i sar., 2003). U tom smislu, druga grupa STAT proteina značajna je u malignoj transformaciji. Pokazano je da je STAT3 proto-onkogen koji aktivira onkogene, *c-myc*, ciklin D i antiapoptotski Bcl-2 protein, olakšava prolazak kroz G1/S kontrolnu tačku i tako pored sprečavanja apoptoze, pospešuje ćelijsku proliferaciju i transformaciju (Konjević, 2009).

Konstitutivna aktivacija STAT3 dovodi do proliferacije tumorskih ćelija i sprečava apoptozu, kao i produkciju brojnih proinflamatornih citokina i hemokina i dovodi do



sekrecije faktora koji sprečavaju sazrevanje dendritičnih ćelija (DĆ). U tom smislu pokazano je da STAT3 sprečava uspostavljanje adaptivne antitumorske imunosti. Za invazivne tumore je poznato da je neophodno da moduliraju ekspresiju gena na način koji ometa aktivnost urođjene i stečene imunosti u procesu imunskog nadzora (Dunn i sar., 2002). STAT3 pozitivni tumori to postižu tako što sprečavaju produkciju proinflamatornih citokina, odn. “signala za opasnost” (“danger signals”), kao i inhibicijom funkcionalnog sazrevanja DĆ. U fiziološkim uslovima aktivacija STAT3 je od suštinskog značaja u toku remodeliranja tkiva u procesu „zarastanja rana“ (Haura i sar., 2005; Konjević, 2009). Kako rast tumora, takođe, predstavlja oštećenje tkiva u kontekst tumora se prenosi ova uloga STAT3 koja usled disregulacije ima neželjen efekat koji umesto zarastanja dovodi do daljeg razaranja tkiva, kao i do izbegavanja imunskog odgovora.

STAT3 je onkogen jer reguliše mehanizme koji omogućavaju proliferaciju malignih ćelija (Wang i sar., 2004). Osnovna uloga STAT3 je sprečavanje apoptoze što se postiže povećanjem ekspresije antiapoptotskog molekula, bcl-2, ili uticajem na progresiju ćelijskog ciklusa povećanjem ekspresije c-myc i ciklina D1 koji potpomažu prolazak kroz G1/S kontrolnu tačku. Ovo je pokazano na tumorskim ćelijskim linijama sa delecijom STAT3 gena (STAT3 <sup>-/-</sup>) u kojima usled neaktivnosti STAT3 dolazi do pojave apoptoze jer se povećava nivo kaspaza, a smanjuje nivo bcl-2, dok se proliferacija smanjuje usled sniženja nivoa ciklina D i c-myc onkogenena. Pored toga, STAT3 utiče na invazivnost tumorskih ćelija povećanjem produkcije matriks metaloproteinaza (MMP-2 i MMP-9) (Konjević i sar., 2011). Značajan je podatak da hiperaktivan STAT3 dovodi do povećane produkcije VEGF što pospešuje angiogenezu. S obzirom da do povećane aktivnosti STAT-ova može doći i usled aktivnosti onkogenena iz familije nerekceptorskih tirozinskih kinaza, novija izučavanja STAT3 u različitim malignitetima ukazuju na njegovu značajnu povezanost sa malignom transformacijom, naročito onom prouzrokovanom *src* onkogenom.

U karcinomu dojke pokazana je hiperaktivnost STAT3 i STAT5. S obzirom da je STAT3 preko receptora za endotelni faktor rasta (eng. Endothelial Growth Factor Receptor, EGFR) uključen u fiziološki razvoj dojke, na ćelijskim linijama karcinoma dojke i primarnim tumorima pokazano je da mutacije ovog receptora, ali i *src* proto-

onkogena, dovode do hiperaktivnosti i onkogenog svojstva STAT3. Pored toga blokiranje STAT3, kao posledica mutacije EGFR u ovom malignitetu, pokazalo je povezanost sa proliferacijom (Townsend i sar., 2005).

Kako se u malignitetima pored standardne hemioterapije, zračne i hirurške terapije, danas sve više uvode novi vidovi lečenja koji se zasnivaju na molekularnom profilu tumora, u terapiju različitih tumora se uvode i agensi koji na direktan ili indirektan način blokiraju aktivnost STAT3 (Turkson, 2004). Pokazano je da je za onkologiju najrelevantniji STAT3 negativan fenotip i ovaj model se koristi za utvrđivanje njegovih onkogenih karakteristika. Pored istraživanja na eksperimentalnim životinjama brojni onkogeni efekti STAT3 su otkriveni u *in vitro* eksperimentima korišćenjem različitih tumorskih linija, kao i na svežim primarnim tumorima. Mnogobrojne studije su pokazale da je moguće na više direktnih načina blokirati STAT-ove. Jedan je smanjenjem ekspresije STAT gena preko antisens oligonukleotida (DNK i RNK) ili blokiranjem samih signalnih proteina putem malih inhibitornih molekula i peptidnih analoga (mimetika) (Konjević i sar., 2010). S druge strane, hiperaktivni STAT molekuli mogu se blokirati i indirektno inhibicijom uzvodnih, bilo receptorskih ili slobodnih, nereceptorskih, tirozinskih kinaza koje fosforilišu STAT-ove i dovode do uspostavljanja hiperaktivnog stanja ovih molekula. U tom smislu, pored inhibitora JAK enzima, preparata trifostina, AG490, koriste se inhibitori *src* onkogena, preparat gefitinib kao inhibitor enzimske aktivnosti receptora za epidermalni faktor rasta (eng. Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) (Haura i sar., 2005).

S obzirom da inhibicija STAT3 dovodi do zaustavljanja u rastu i do apoptoze tumorskih ćelija, ovakav pristup može biti značajan pored terapije i u hemoprevenciji tumora. Pored toga, STAT3 se može smatrati molekularnim markerom za ranu detekciju određenih tipova tumora i kao prognostički faktor za određivanje agresivnosti tumora i odgovora na različite vrste terapije.

## 1.7. Poremećaj funkcije Bcl-2 u karcinomu dojke

Fiziološki apoptoza predstavlja proces koji služi za uklanjanje neželjenih nefunkcionalnih ili istrošenih ćelija. Igra važnu ulogu u embriološkom razvoju, razvoju određenih hormon zavisnih tkiva, regulaciji gustine normalnih ćelijskih populacija i starenju. Međutim, apoptozu nekada indukuje ćelijsko oštećenje (virusne infekcije, jonizujuće zračenje), a supresija ćelijske smrti osnova je patogeneze mnogih tumora uključujući i karcinom dojke. Proces se odvija u 4 stadijuma: stadijum inicijacije, stadijum kontrole i integracije, izvršni stadijum i stadijum uklanjanja mrtvih ćelija. Stadijum inicijacije obuhvata sve promene u ćeliji koje dovode do aktivacije apoptoze. Inicijacija apoptoze ćelije nastaje na 3 načina:

1. Vezivanjem molekula-liganda za receptore na membrani ćelije ili jedra (TNF-alfa, limfotoksin, TGF-beta, FasL, glukokortikoida)
2. Odsustvom faktora rasta (npr. faktori rasta neurona), hormona (estrogeni, progesteroni, testosteron) ili citokina (IL-2, IL-5) neophodnih za preživljavanje ćelije
3. Dejstvom oštećujućih agenasa (hipoksija, slobodni radikali, jonizujuće zračenje i dr.) koji izazivaju umereno oštećenje ćelije, nedovoljno da izazove nekrozu.

Stadijum kontrole i integracije se odvija uz pomoć specifičnih proteina koji povezuju "signal smrti" sa efektornim mehanizmima (Krajevski i sar., 1999). Postoje dva puta koji su uključeni u aktivaciju apoptoze. Spoljašnji put (put receptora smrti) predstavlja apoptozu indukovanu spoljašnjim signalima. Unutrašnji put (mitohondrijalni) se pokreće internim signalima kao što su odsustvo faktora rasta ili oštećenje DNK (Cory i sar., 2003).

Spoljašnja mitohondrijska membrana zdravih ćelija normalno eksprimira protein Bcl-2 koji ima antiapoptotsku ulogu. U odsustvu faktora rasta neophodnih za preživljavanje ćelije, proapoptotički članovi Bcl-2 familije proteina se premeštaju iz citosola ka mitohondrijskoj površini, menjajući odnos pro- i anti-apoptotskih Bcl-2 proteina i

insercijom u spoljašnju membranu formiraju pore dovodeći do hiperpermeabilnosti membrane, “curenja” citohroma C i posredne aktivacije smrtonosne proteolitičke kaskade.

Mitohondrijalni i put receptora smrti predstavljaju dva glavna puta koja dovode do programirane ćelijske smrti (Green, 2005). Mitohondrijalni put igra glavnu ulogu u odgovoru na hemioterapeutike i posredovan je Bcl-2 familijom proteina. Do sada je opisano više od 20 članova familije Bcl-2 proteina. Pozitivan odnos između pro- i antiapoptotskih članova Bcl-2 familije vodi oslobadjanju citohroma C iz mitohondrija, koji aktivira kaskadu kaspaza što dovodi do ćelijske smrti. Bcl-2 i Bcl-xL su antiapoptotski članovi Bcl-2 familije proteina, dok je Bax proapoptotski član familije proteina. Bag-1 je protein koji blokira ćelijsku smrt i interaguje sa proteinima Bcl-2 familije. Gen za Bcl-2 protein se smatra proto-onkogenom. Njegova disregulacija ili mutacija uključena je u patogenezu kancera dojke (Cory i sar., 2003).

Poslednjih godina, sintetisani su novi hemioterapeutici za karcinom dojke delujući pre svega tako što indukuju ćelijsku smrt. Smatra se da je lekovima indukovana ćelijska smrt odgovor ćelije na oštećenje DNK ili druga oštećenja i da zavisi od sposobnosti ćelije da detektuje i odgovori na oštećenja. Prekliničke studije su pokazale da mutacije pokazatelja ćelijske smrti dovode do rezistencije tumora na hemioterapeutike (Dawson i sar., 2010). Iz tih razloga, praćenje ekspresije pokazatelja ćelijske smrti pruža dodatne informacije o odgovoru pacijenata na hemioterapeutike.

Pokazano je da estrogeni regulišu ekspresiju Bcl-2 gena u epitelnim ćelijama dojke i estrogen pozitivnim ćelijskim linijama kancera dojke. Pored toga, istraživanja su potvrdila da je ekspresija Bcl-2 merena imunohistohemijom pokazana u 80% tumorskih tkiva kancera dojke. Takođe, pokazano je da ekspresija Bcl-2 pozitivno korelira sa pozitivnošću estrogenskih (ER) i progesteronskih steroidnih receptora (PR) (Barbareschi i sar., 1996). Pokazano je da je ekspresija Bcl-2 povezana u tumorskom tkivu sa boljom prognozom i preživljavanjem pacijentkinja sa karcinomom dojke u poredjenju sa Bcl-2 negativnim pacijentkinjama (Krajewski i sar., 1999). Ovi rezultati, obzirom na antiapoptotsku ulogu Bcl-2 u kancerogenezi, iznenadjuju. Literaturni podaci ukazuju da antiproliferativno dejstvo Bcl-2 i regulacija Bcl-2 ekspresije estrogenima delimično

objašnjavaju povoljan efekat Bcl-2 na tok bolesti ovih pacijentkinja (Zhang i sar., 1997; Zhang i sar., 1998). Transfekcija gena za Bcl-2 u ćelijskim linijama kancera dojke dovodi do povećanja rezistencije na ćelijsku smrt, što sugerise da Bcl-2 učestvuje u izbegavanju apoptoze tumorskih ćelija, u određenim uslovima (Zhang i sar., 1998).

### **1.8. Poremećaj funkcije Ciklina D1 u karcinomu dojke**

Savremena onkologija traži adekvatan biološki marker koji bi u kliničkoj praksi pomogao u stratifikaciji pacijentkinja sa nižim rizikom za relaps bolesti. Stratifikacija pacijentkinja sa karcinomom dojke omogućila bi adekvatan terapijski pristup u lečenju pacijentkinja sa karcinomom dojke.

Ciklini predstavljaju grupu proteina jedra uključenih u ćelijski ciklus. Ciklin D1 je protein molekulske mase 36 kDa koji pripada familiji ciklina i uključen je u G1 fazu ćelijskog ciklusa. Ciklin D1 formira kompleks sa ciklin zavisnim kinazama 4 i 6 (eng., cyclin dependent kinase 4 i 6, cdk4 i cdk6), koji aktiviraju cdk aktivirajuće kinaze (eng., cdk-activating kinase, cak). Aktiviran kompleks ciklin D1/cdk4/6 zajedno sa kompleksom Ciklin E/cdk2 uključen je u fosforilaciju proteina retinoblastoma (pRb) (Barnes, 1997). Nefosforilisana forma pRB deluje inhibitorno na deobu, odnosno fosforilacija pRb omogućava ćeliji da prodje kritičnu restrikcionu tačku (R tačka) i udje u S fazu ćelijskog ciklusa. Intereakcija ciklina D1 sa pRb je važna za funkcionisanje ciklina D1, jer je pokazano da ciklin D1 nema ulogu u ćelijama sa inaktiviranim pRb (Bates i Peters, 1995).

U normalnim ćelijama, ciklin D1 protein je strogo regulisan i njegova aktivnost varira u zavisnosti od spoljašnjih stimulusa. Tako npr, faktori rasta i estrogeni mogu povećati nivo ovog proteina u G1 fazi ćelijskog ciklusa što stimuliše proliferaciju. Ipak, ulazak u S fazu može biti zaustavljen inhibicijom Ciklin D1/Cdk/pRb kompleksa pomoću dve grupe

proteina male molekulske mase (Pusch i sar., 1996). Prvu grupu proteina predstavljaju cdk inhibitori (cdki), uključujući i p16 tumor supresorni gen koji specifično inhibira cdk 4 i cdk6. Druga grupa proteina ima široku specifičnost i može da inhibira bilo koji ciklin/cdk kompleks. Važan član ove grupe je p21 protein koji zaustavlja progresiju ćelijskog ciklusa nakon DNK oštećenja (Waldman i sar., 1996).

Na transformisanim ćelijskim linijama je pokazano da gubitak pRb ili prekomerna ekspresija c-myc uzrokuje smanjenje ekspresije ciklina D1 i dalja progresija ćelijskog ciklusa ne zavisi više od fluktuacija nivoa ciklina D1. Studije na ćelijskim linijama kancera dojke su pokazale da povećanje nivoa ciklina D1 dovodi do povećanja broja ćelija koje prolaze kroz G1 fazu, kao i do povećanja broja ćelija koje prolaze iz G1 u S fazu (Caldon i dr, 2008). Studije su pokazale da je ciklin D1 slab onkogen i da njegova kombinacija sa drugim onkogenima kao što su ras i myc može povećati njegov maligni potencijal. Pokazano je da miševi sa delecijom gena za ciklin D1 (ciklin D1<sup>-/-</sup>) imaju sledeće poremećaje: ozbiljnu retinopatiju koja je uzrokovana oštećenjima u razvoju retine tokom embriogeneze i nemogućnost laktacije, odnosno ćelije epitela dojke ne mogu da proliferišu, iako su miševi imali normalan nivo hormona jajnika (Fantl i sar., 2000). Ovi rezultati ukazuju da ciklin D1 posreduje u proliferaciji ćelija epitela dojke indukovanoj estrogenom i progesteronom, što je veoma važno za proliferaciju ćelija kancera dojke.

Iako je pokazano da ciklin D1 pospešuje proliferaciju ćelija kancera dojke, povećana ekspresija ciklina D1 u tkivima karcinoma dojke je povezana sa dobrom prognozom. Studije su pokazale da je amplifikacija CCND1 gena (gen za Ciklin D1) prisutna u 15-20% karcinoma dojke, dok je povećana ekspresija proteina ciklina D1 prisutna u 50% slučajeva (Lundgren i sar., 2012). Očigledno je da postoje različiti mehanizmi kojim ćelija povećava ekspresiju ciklina D1 od onih koji regulišu amplifikaciju gena. Podaci pokazuju da je povećana ekspresija ciklina D1 povezana sa pozitivnošću estrogenskih i progesteronskih receptora, kao i sa manjom veličinom tumora (Quintayo i sar., 2012). Pored toga, pokazano je da pacijentkinje sa povećanom ekspresijom ciklina D1 i ER u tumorima imaju bolji odgovor na Tamoksifen. Kada su u pitanju pacijentkinje sa niskom ekspresijom ova dva proteina samo 10% pacijentkinja su imale pozitivan odgovor na terapiju (Lin i sar., 2013). Takodje, pacijentkinje sa visokom ekspresijom ciklina D1

imaju bolje preživljavanje u odnosu na one sa niskom ekspresijom ciklina D1 (Lundgren i sar., 2012).

Pokazano je da se ciklin D1 vezuje za ER zajedno sa kofaktorom SRC-1 i aktivira ga. Pored toga, estrogene aktiviraju ciklin D1 preko povećanja transkripcije ciklin D1 gena. Watts sa saradnicima je pokazao da inhibitori estrogene deluju antiproliferativno tako što blokiraju ciklin d1/cdk4/cdk6/pRb komplekse i onemogućavaju ulazak u S fazu ćelijskog ciklusa (Watts i sar., 1995). Ako je ovaj mehanizam kritičan za dejstvo inhibitora estrogene, onda je nedostatak odgovora na Tamoksifen kod ER negativnih ciklin D1 negativnih bolesnica sa kancerom dojke logičan.

Lenferink je sa saradnicima pokazao da aktivirani HER2 može povećati transkripciju gena za ciklin D1 preko Ras/MAPK signalnog puta. Pored toga, aktivirani HER2 može zaustaviti razgradnju ciklina D1 preko PI3K/Akt signalnog puta (Lenferink i sar., 2001). Iz tih razloga, ispitali smo ekspresiju ciklina D1 u odnosu na pozitivnost HER2 receptora i pozitivnost steroidnih seksualnih receptora pacijentkinja sa karcinomom dojke.

## 2. CILJEVI

Jedna od najvažnijih karakteristika tumorskih ćelija je proces aerobne glikolize. Glavni enzim aerobne glikolize, LDH, uključen je u procese inicijacije, invazivnosti i metastaziranja tumora dojke. Pored toga, pokazano da je LDH medijator u razvoju rezistencije na Taxol, koji je jedan od najznačajnijih hemioterapeutika u lečenju pacijentkinja sa karcinomom dojke (Zhou i sar., 2010). Obzirom da je aktivnost MDH povezana sa procesima proliferacije i neovaskularizacije, određivanje distribucije izoenzima doprinelo bi razjašnjavanju metabolizma tumorske ćelije. Dugo se smatralo da enzimi antioksidativne zaštite, kao što su SOD i CAT, štite ćelije od kancerogeneze. Međutim, pokazano je da su CAT i SOD uključene u procese izbegavanja ćelijske smrti i proliferacije, zbog čega predstavljaju važne medijatore u biologiji karcinoma dojke. Obzirom da mamografska gustina predstavlja faktor rizika za karcinom dojke, određivanje enzimskog profila tkiva sa većom mamografskom gustinom pružilo bi dodatne informacije koje bi pomogle selekciju pacijentkinja sa agresivnijim fenotipom tumora.

Imajući u vidu porast incidence karcinoma dojke u svetu, javlja se sve veća potreba za tumor markerom koji bi pouzdano mogao da identifikuje karcinom dojke sa mogućom tendencijom recidiva (Chabottaux i sar., 2006). Postoje podaci koji pokazuju da marker za karcinom dojke može biti među proteinima koji učestvuju u procesu tumorske progresije u karcinomu dojke. U moguće kandidate koji bi bili pouzdani tumor markeri spadaju i MMP-2, MMP-9 i TIMP1. Pored toga, obzirom da STAT3 učestvuje u progresiji ćelijskog ciklusa i da sprečava apoptozu, može se smatrati molekularnim markerom za ranu detekciju određenih tipova tumora i kao prognostički faktor za određivanje agresivnosti tumora i odgovora na različite vrste terapije. Takođe, ciklin D1 kao marker proliferacije i Bcl-2 kao marker apoptoze, mogu biti korišćeni kao pokazatelji odgovora na terapiju za pacijentkinje sa karcinomom dojke.



Utvrđivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT), anaerobnog metabolizma (LDH, MDH), invazivnosti (MMP-2, MMP-9) i nivoa ekspresije pokazatelja ćelijske smrti (TIMP1, pSTAT3, bcl-2, Ciklin D1) u tumorskom tkivu i njihov odnos sa kliničko-patološkim karakteristikama tumora bolesnica, kao i sa mamografskim nalazom bolesnica sa karcinomom dojke.

Ciljevi ovog rada su sledeći:

1. Identifikacija i utvrđivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT) i anaerobnog metabolizma (LDH, MDH) u tumorskom i okolnom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke.
2. Identifikacija i utvrđivanje aktivnosti MMP-2 i MMP-9 i ekspresije TIMP1 u tumorskom i okolnom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke.
3. Identifikacija i utvrđivanje nivoa ekspresije pokazatelja ćelijske smrti (STAT3, Ciklin D1, bcl-2) u tumorskom i okolnom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke.
4. Ispitivanje povezanosti aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT), anaerobnog metabolizma (LDH), invazivnosti (MMP-2 i MMP-9) i ekspresije pokazatelja ćelijske smrti (TIMP1, pSTAT3, Ciklin D1, bcl-2) u tumorskom tkivu sa kliničko-patološkim parametrima i mamografskim karakteristikama pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke.

### **3. MATERIJAL I METODE**

Istraživanje je sprovedeno u Laboratoriji za eksperimentalnu imunologiju na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije i na Institutu za hemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Analizirano je tumorsko (n=75) i okolno peritumorsko (n=75) tkivo 75 bolesnica sa histopatološki potvrđenim karcinomom dojke.

#### **3.1. Kriterijumi za uključivanje bolesnica u studiju**

U istraživanje su bile uključene bolesnice starije od 18 godina sa histopatološki potvrđenim resektabilnim karcinomom dojke bez udaljenih metastaza (TNM: T1-4). Takođe, sve bolesnice su bile upoznate sa protokolom i dale pisani pristanak informisanog pacijenta za učešće u projektu.

#### **3.2. Kriterijumi za isključivanje bolesnica iz studije**

Iz studije su bile isključene bolesnice koje su prethodno primale hemio ili radioterapiju, bolesnice sa sekundarnim malignitetom, i one sa teškim fizičkim ili mentalnim poremećajima (npr. nestabilna kardiološka oboljenja i pored terapije, infarkt miokarda u poslednjih 6 meseci, aktivna diseminovana intravaskularna koagulacija, neurološke i mentalne bolesti).

#### **3.3. Priprema uzorka**

Zamrznuto tkivo (100 mg) je brzo izmereno i homogenizovano na ledu. Homogenizovano tkivo je tretirano sa 100 µl pufera za liziranje, sa dodatkom koktel inhibitora (1mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 1mg/ml aprotinin, i 1 mg/ml leupeptin), 1 sat na 4°C. Nakon centrifugiranja na 10,000 rpm na 4°C, 10 minuta, izdvojen je supernatant koji predstavlja ukupni ćelijski lizat. Supernatanti su alikvotirani i čuvani do upotrebe na -70°C. Na ovaj način izolovani su proteini iz tumorskog i

peritumorskog tkiva. Ukupna koncentracija proteina je merena Bradfordovim metodom (Bradford, 1976).

### **3.4. Odredjivanje koncentracije proteina metodom Bradforda**

U 0,2 mL lizata tumorskog i okolnog tkiva dodaje se 1 mL Bradfordovog reagensa, koji je pripremljen rastvaranjem 100 mg Commasie Brilliant Blue G-250 boje u 50 mL 95 % (w/w) etanola i 100 mL 85 % (w/w) fosforne kiseline dopunjen do 1 L destilovanom vodom i profiltriran. Nakon 15 minuta meri se apsorbance na 595 nm, uz slepu probu koja umesto lizata sadrži istu zapreminu dejonizovane vode. Koncentracija proteina se određuje na osnovu izmerene apsorbance iz standardne krive dobijene na osnovu rastvora govedjeg serum albumina čije su koncentracije poznate, a pomoću jednačine  $A = a \times c + b$ , gde je A – apsorbance rastvora, c – koncentracija rastvora, a- nagib prave, b-odsečak na y osi (Bradford, 1976).

### **3.5. Odredjivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze**

Aktivnost LDH određivana je u lizatima tumorskog i peritumorskog tkiva spektrofotometrijski merenjem smanjenja apsorbance na 340 nm u toku oksidacije NADH metodom po Weydert i Cullenu. Inkubaciona smesa sadrži: 2,90 mL fosfatnog pufera koncentracije 0,1 mol/L u dejonizovanoj vodi, pH 7,0; 0,1 mL natrijum-piruvata koncentracije 23 mmol/L u dejonizovanoj vodi, 0,05 mL NADH koncentracije 14 mmol/L u dejonizovanoj vodi, 0,01 mL uzorka lizata tumorskog tkiva. Promena apsorbance u prvih 5 minuta reakcije na 25 °C prati se na 340 nm. 1 U LDH aktivnosti katalizuje transformaciju 1 μmol NADH u minuti u uslovima testa (Weydert i Cullen, 2010).

### **3.6. Odredjivanje izoenzima laktat dehidrogenaze**

Određivanje distribucije izoenzima LDH vršeno je metodom direktne elektroforetske zimografije po Cunninghamu (Cunningham i sar., 1965). Nativna poliakrilamid gel

elektroforeza se izvodi na 10 % nativnom poliakrilamidnom gelu, na koji se nanosi po 20  $\mu\text{L}$  uzoraka lizata tumorskog tkiva. Po završetku elektroforetskog razdvajanja gelovi se ispiraju u dejonizovanoj vodi, a zatim inkubiraju u rastvoru koji sadrži: 0,2 natrijum-laktata, 15 mg  $\text{NAD}^+$ , 0,5 mg PMS i 10 mg NBT u TRIS-Gly puferu koncentracije 0,1 mol/L, pH 8,3. Nakon inkubacije od 30 minuta u odsustvu svetlosti izoenzimi se pojavljuju na gelu kao tamno plave trake koje nastaju kao rezultat bojenja sa formazanom koji nastaje nakon redukcije boje tetrazolijum nitro plavo (eng. Nitro Blue Tetrasolium, NBT) u prisustvu prenosioca elektrona fenazin metosulfata na koenzim  $\text{NAD}^+$ . Aktivnost pojedinačnih izoenzima je semikvantitativno procenjena u odnosu na ukupnu aktivnost LDH (relativna aktivnost)

### 3.7. Odredjivanje aktivnosti malat dehidrogenaze

Aktivnost MDH u uzorcima lizata tumorskog tkiva određivana je spektrofotometrijski (Frieden i sar., 1975). U reakcionu smešu koja sadrži 2,9 mL fosfatnog pufera, koncentracije 0,1 mol/L, pH 7,5 dodaje se 100  $\mu\text{L}$  oksaloacetata koncentracije 15 mmol/L koji je pripremljen rastvaranjem u 0,1 mol/L fosfatnom puferu, pH 7,5; 50  $\mu\text{L}$  rastvora NADH, koncentracije 14 mmol/L koji je pripremljen rastvaranjem u redestilovanoj vodi. Nakon inkubiranja reakcione smeše 4 minuta na 25  $^{\circ}\text{C}$ , dodaje se 10  $\mu\text{L}$  lizata tumorskog tkiva i meri smanjenje  $A_{340\text{ nm}}$  u prvih 5 minuta reakcije. Jedinica enzimske aktivnosti (U), katalizuje konverziju 1  $\mu\text{mola}$  supstrata u minuti, u uslovima testa. Za izračunavanje jedinice enzimske aktivnosti koristi se Lambert-Beer-ov zakon:  $A = \epsilon \times l \times C$ , gde je  $A$  - apsorbanca ( $\text{mol}^{-1}/\text{L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $l$  - dužina puta svetlosti, odnosno debljina kivete (1 cm),  $C$  - koncentracija enzima (mol/L) i  $\epsilon$  - molarni ekstinkcioni koeficijent. Za NADH  $\epsilon = 6,2 \times 10^3 \times \text{mol}^{-1}/\text{L}^{-1} \times \text{l}$ . Enzimska aktivnost MDH se računa prema konačnom obrascu:  $\text{U/mL} = 8,05 \times \Delta A/\text{min}$ .

### **3.8. Odredjivanje izoenzima malat dehidrogenaze**

Određivanje relativnih aktivnosti izoenzima MDH rađeno je po metodi Strumilo i saradnika. Izoenzimi MDH su razdvajani na 10 % nativnom poliakrilamidnom gelu. Uzorci lizata tumorskog tkiva, u kojima je koncentracija proteina određena metodom Bradforda, nanošeni su na gel u odgovarajućim zapreminama, tako da sadrže istu koncentraciju proteina. Nakon završenog elektroforetskog razdvajanja, gelovi su inkubirani 10 minuta, na 37 °C u 20 mL puferskog rastvora koji sadrži: 10 mL fosfatnog pufera koncentracije 0,2 mol/L pH 7,1 i 10 mL rastvora natrijum-maleata koncentracije 0,01 mol/L pH 6,9 u koji je dodato 0,015 g NAD<sup>+</sup>, 0,01 g boje NBT, i 0,5 mg fenazin metasulfata. Nakon inkubiranja, gelovi su inkubirani tokom 10 minuta u redestilovanoj vodi, u odsustvu svetlosti. Izoenzimi se pojavljuju kao dve trake: citosolna (c-MDH) i mitohondrijalna (m-MDH). Aktivnost pojedinačnih izoenzima je semikvantitativno procenjena u odnosu na ukupnu aktivnost MDH (relativna aktivnost) (Strumilo i sar., 2006).

### **3.9. Odredjivanje aktivnosti katalaze**

Aktivnost CAT u uzorcima lizata tumorskog tkiva određivana je spektrofotometrijski, po metodi Roland i Irwin. U reakcionu smešu koja sadrži 1,0 mL 0,18 % vodenog rastvora vodonik-peroksida koji je pripremljen rastvaranjem u fosfatnom puferu koncentracije 0,05 mol/L, pH 7,0, dodavano je 2,0 mL fosfatnog pufera koncentracije 0,05 mol/L, pH 7,0 i 200 µL lizata tumorskog tkiva, u kome je koncentracija proteina, određena po Bradford-u (0,2 µg/mL) (Bradford,1976). Meri se promena apsorbance usled razlaganja vodonik-peroksida u toku prva dva minuta reakcije na 240 nm (Roland i Irwin, 1952). Jedinica enzimske aktivnosti (U) je ona količina enzima koja katalizuje razlaganje 1 µmol vodonik-peroksida u minuti, u uslovima testa.

### **3.10. Odredjivanje aktivnosti superoksid dismutaze**

Aktivnost SOD je određivana po metodi koju su opisali Sun i Zigman. U reakcionu smešu koja sadrži 100  $\mu\text{L}$  lizata tumorskog tkiva, dodaje se 100  $\mu\text{L}$  rastvora adrenalina koji je pripremljen rastvaranjem 18 mg adrenalina (SIGMA) u 10 mL 0,1 mol/L rastvora hlorovodonične kiseline, 1,8 mL TRIS-Cl pufera, koncentracije 0,05 mol/L, pH 10,2. Slepa proba sadrži 100  $\mu\text{L}$  0,9 % rastvora NaCl, umesto lizata tumorskog tkiva. Aktivnost SOD u lizatima tumorskog tkiva je merena spektrofotometrijski kao promena apsorbance na 340 nm, pri autooksidaciji adrenalina u adrenohrom (Sun i Zigman, 1978). Jedinica enzimske aktivnosti (U) je promena apsorbance za 0.001 u minuti ( $\Delta A/\text{min}$ ) na 25  $^{\circ}\text{C}$ , u uslovima testa.

### **3. 11. Odredjivanje izoenzima superoksid dismutaze**

Određivanje relativnih aktivnosti izoenzima SOD rađeno je po metodi Flohe i Otting (Flohe i Otting, 1984). Izoenzimi SOD su razdvajani na 10 % nativnom poliakrilamidnom gelu, metodom reverzne zimografije. Uzorci lizata tumorskog tkiva, u kojima je koncentracija proteina određena metodom Bradforda, nanošeni su na gel u odgovarajućim zapreminama, tako da sadrže istu koncentraciju proteina (Bradford, 1976). Nakon završenog elektroforetskog razdvajanja, gelovi su potapani u rastvor boje NBT, a vizualizacija pojedinačnih izoformi vršena je bojenjem sa tetrametiletilendiaminom (eng. Tetramethylethylendiaminom, TEMED). Izoenzimi se pojavljuju kao dve trake: citosolna (c-SOD) i mitohondrijalna (m-SOD) izoforma. Aktivnost pojedinačnih izoenzima je semikvantitativno procenjena u odnosu na ukupnu aktivnost SOD (relativna aktivnost).

### **3.12. Metoda želatin zimografije**

Želatin zimografija je jednostavna i visoko osetljiva metoda, koja omogućava detekciju matriksnih metaloproteinaza, tačnije jedne grupe-želatinaza (MMP-9 i MMP-2), i njihovu aktivnost u biološkim uzorcima.

Metoda se zasniva na sposobnosti želatinaza da razlažu želatin (denaturisani kolagen). Uzorci koji sadrže MMP su podvrgnuti razdvajanju proteina natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidnom elektroforezom (eng. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) u gelu koji sadrži ko-polimerizovan supstrat za proteaze kao što je želatin (0,1%). Nakon razdvajanja u gelu proteaze se renaturišu i hidrolizuju supstrat u gelu. Prisustvo i aktivnost MMP u uzorku se tako određuje usled smanjenja bojenja sa CBB (eng. Comassie Brilliant Blue) razloženog želatina na mestima aktivnosti MMP (Jinga i sar., 2006).

Uzorci lizata tumorskih tkiva su pomešani sa puferom za tretiranje i podvrgnuti elektroforezi (20 $\mu$ l po bunarčiću). Pufer za tretiranje sadrži 0,125 M Tris-HCl; pH 6,8; 20% glicerol; 10% SDS i 0,25% brom fenol plavog. Nakon elektroforetskog razdvajanja proteina pri U=125V, I=2mA, gelovi su isprani 3x20 min. u puferu za renaturaciju (2,5% Triton X-100), a zatim inkubirani 48h na 37°C u puferu za enzimski test (50mM Tris-HCl; 0,2M NaCl; 5mM CaCl<sub>2</sub>; 0,05% NaN<sub>3</sub>; pH 7,5). Nakon inkubacije gelovi su bojeni sa CBB G-250 bojom, koncentracije 0,05% u smesi metanol:sirćetna kiselina:voda (2,5:1:6,5) i obezbojeni u 4% metanolu sa 8% sirćetne kiseline. Za bolju senzitivnost gelovi su dalje obezbojeni u rastvoru 1% Triton X-100 (1-2 h). Pojava svetlih zona na tamnoj pozadini gela koji je obojen CBB G-250 bojom ukazuje na mesta aktivnosti želatinaza.

### **3.13. Denzitometrijsko određivanje aktivnosti enzima na gelovima**

Gelovi koji su dobijeni na prethodno opisan način (određivanje izoenzima LDH, MDH i SOD, metoda želatin zimografije) su skenirani i dobijeni dokument je preveden u tif

format. Ova slika je zatim analizirana u Image J programu gde je ispitivana debljina i intenzitet traka ispitivanog proteina.

### **3.14. Metoda Imunoblota**

#### ***3.14.1. Priprema uzorka za elektroforezu***

Uzorci proteina u RIPA (eng. radioimmunoprecipitation assay, RIPA) puferu su pomešani sa puferom za nanošenje uzoraka ( Tris pH 6.8, glicerol, 10% SDS, 2-merkaptoetanol, 1% Bromphenol-blue) u zapreminskom odnosu uzorak:pufer 1:1 (V/V) i nakon toga denaturisani kuvanjem 5 min na 100°C a zatim hlađeni na ledu (Van Kooten i sar., 2001).

#### ***3.14.1. Elektroforeza proteina***

Proteini su razdvajani SDS denaturišućom elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu. Nakon polimerizacije 8% gela za razdvajanje (5.3 ml 1.5M Tris pH 8.8, 5.3 ml 30 % bis/akrilamid (29:1), 200 µl 10% SDS, 200µl 10% amonijum–persulfat (APS), 12 µl TEMED, 9.3ml destilovane vode) naliven je 5% gel za koncentrisanje (6.8 ml 1.5M Tris pH 6.8, 1.7 ml 30 % bis/akrilamid (29:1), 100 µl 10% SDS, 100 µl 10%APS, 10µl TEMED) nakon čije polimerizacije je u bunarčiće naneto po 25 µg proteina po uzorku. Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu pH 8.3 (Tris baza 25 mM, glicin 192 mM i 0.10% SDS) razblaženom 10 puta u destilovanoj vodi na 100 V.



### ***3.14.2. Elektrotransfer proteina na membranu***

Nakon završene elektroforeze, odsečen je gel za koncentrisanje, a gelovi sa razdvojenim proteinima su kao i nitrocelulozna membrana čija površina odgovara dimenzijama gela potopljeni u pufer za transfer pH 8.3 (25mM Tris baza, glicin 192 mM) sa 20% metanola koji je 10 puta razblažen u destilovanoj vodi. Da bi se obavio elektrotransfer proteina, nitrocelulozna (NC) membrana i gel su orijentisani tako da je gel koji je bliži negativnoj elektrodi u sistemu za elektrotransfer. Transfer je vršen 1 sat u ohlađenom puferu za transfer pri naponu od 100 V uz hlađenje.

Da bi se proteini čvrsto vezali za NC membranu, membrana je uranjana u vodeni rastvor za fiksaciju koji sadrži 45% metanol i 7% glacijalne sirćetne kiseline i nakon 15 min inkubacije isprana destilovanom vodom. Da bi se proverila uspešnost transfera proteina sa poliakriamidnog gela na NC membranu, vršeno je reverzibilno bojenje 1% Ponceau-S bojom sa 5% glacijalne sirćetne kiseline, 2 do 3 minuta na sobnoj temperaturi na mešalici. Na taj način sve trake proteina su nespecifično obojene crveno, a nakon bojenja NC membrane su ispirane destilovanom vodom (Van Kooten i sar., 2001).

### ***3.14.3. Imunodetekcija proteina***

#### ***3.14.3.1. Blokiranje nespecifičnog vezivanja***

Da bi se sprečila pojava nespecifičnog vezivanja antitela za proteine, NC membrane su potopljene u rastvor 5% obranog mleka u prahu (Sigma) u TBST-u (eng. Tris-Buffered Saline Tween 20, TBST) i inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi uz mešanje. Na taj način protein kazein iz mleka sprečava nespecifično vezivanje antitela za protein.

#### *3.14.3.2. Inkubacija sa primarnim antitelom*

Inkubacija NC membrane sa primarnim antitelom je vršena preko noći u hladnoj sobi na mešalici. Monoklonska antitela rastvorena su u 1 x TBST-u zapremini rastvarača od 150  $\mu$ l po  $\text{cm}^2$  površine nitrocelulozne membrane. Praćena je indukcija fosforilisanih formi STAT3, ciklin D1, bcl2 i TIMP1 signalnih molekula. Korišćena su sledeća monoklonska antitela u odgovarajućim razblaženjima: mišje anti-ciklin D1 (proizvođač Sigma) razblaženo 0.5 : 1000 puta; mišje anti-Bcl<sub>2</sub> izotipa IgG1 (proizvođač Sigma) razblaženo 1:2000 puta; mišje anti-STAT3 (proizvođač Becton Dickinson Biosciences) specifično za fosforilisanu formu STAT3 molekula (PY701) razblaženo 1:1000; mišje anti-TIMP1 (proizvođač Becton Dickinson Transduction laboratories) specifično za fosforilisanu formu TIMP1 molekula razblaženo 1:1000. Nakon toga membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST-u na sobnoj temperaturi na mešalici.

#### *3.14.3.3. Inkubacija sa sekundarnim antitelom*

Korišćeno je anti-mišje IgG sekundarno antitelo proizvedeno u zecu konjugovano sa peroksidazom rena (proizvođač Sigma-Aldrich, kataloški broj A9044) rastvoreno u TBST-u razblaženo 1:5000.

#### *3.14.3.4. Detekcija hemiluminiscencijom*

Detekcija proteina hemiluminiscencijom (koji su obeleženi odgovarajućim primarnim antitelom) zasniva se na emitovanju svetlosnog signala koji nastaje usled reakcije enzima peroksidaze koja je vezana za sekundarno antitelo i supstrata vodonik peroksida i luminola. Ukratko, nakon ispiranja viška sekundarnog antitela sa nitrocelulozne membrane TBST-om i odlivanja viška tečnosti, preko nje je ravnomerno naneta tečnost za detekciju. Korišćen je reagens za hemiluminiscenciju SuperSignal West PICO (proizvođač TMO Pierce Protein, kataloški broj 34080) koji sadrži supstrat za enzim peroksidazu, kao i luminol. Nakon inkubacije u trajanju od 60 s u odsustvu svetlosti sa

površine membrane odliven je višak reagensa, NC je zatim uvijena u providnu celofansku foliju i prekrivena je rentgen filmom (Kodak X-Omat Blue) odgovarajuće veličine i vršena je ekspozicija u trajanju od 1 do 5 min. Film je nakon ekspozicije uronjen u rastvor za razvijanje filma dok nisu uočene trake sa specifičnim proteinima, a nakon toga film je potopljen u rastvor za fiksaciju (Van Kooten i sar., 2001).

#### *3.14.3.5. Densitometrijsko određivanje intenziteta fluorescence*

Filmovi koji su dobijeni na prethodno opisan način su skenirani i dobijeni dokument je preveden u tif format. Ova slika je zatim analizirana u Image J 1.43s programu i tako je određena debljina i intenzitet traka ispitivanog proteina. Trake ispitivanih proteina upoređivane su sa trakama koje sadrže  $\beta$  aktin, kao kontrolu nanošenja uzorka.

### **3.15. Kliničko-patološki parametri ispitivanih bolesnica**

Kliničko-patološki parametri bolesnica sa karcinomom dojke (klinički stadijum, patohistološki tip tumora, pozitivnost steroidnih seksualnih hormonskih receptora, pozitivnost HER2 receptora, zahvaćenost limfnih čvorova) preuzeti su iz istorija bolesti bolesnica sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

### **3.16. Analiza mamografija**

Retrospektivno su analizirani mamografski snimci prema ACR BI-RADS leksikonu. Mamografije su klasifikovane u odnosu na strukturu dojki kao: ACR1<25%, ACR2<50%, ACR3>50% i ACR4>75%. Lezije su definisane kao: tumorska senka, fokalna asimetrija parenhima, narušena arhitektonika i grupisane kalcifikacije. Kalcifikacije su prema obliku opisivane kao pleomorfne, granajuće, linearne, amorfne i punktiiformne. Grupisane kalcifikacije (>10 po mm<sup>2</sup>) koje su pleomorfne, granajuće,

linearne, amorfne i punktiformne se smatraju malignim. Lezije koje su klasifikovane kao BIRADS 4a, b, c i 5 se smatraju suspektnim i indikovane su za histopatološko ispitivanje.

### **3.17. Statistička obrada podataka**

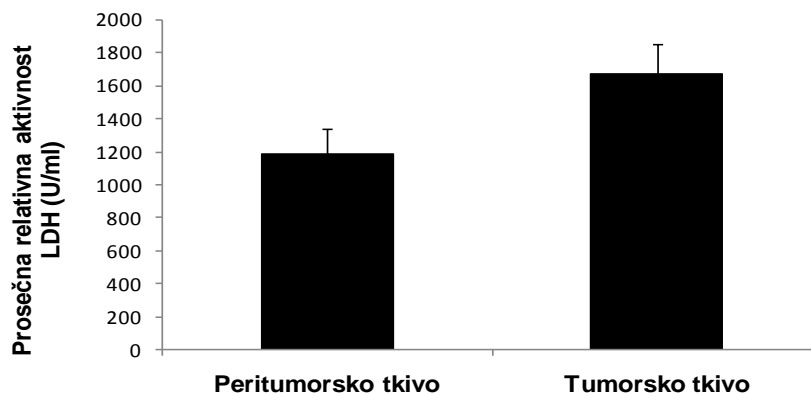
Za ispitivanje normalnosti raspodele podataka korišćen je *Kolmogorov-Smirnov test* i *Šapiro-Vilk test*. Za ispitivanje razlike između eksperimentalnih grupa parametarskih podataka korišćen je *T test*, dok je za ispitivanje razlike između eksperimentalnih grupa neparametarskih podataka korišćen *Wilcoxon test sume rangova* i *Mann Whitney test*. Rezultati koji su dobijeni spektrofotometrijski izražavani su kao srednje vrednosti pojedinih grupa uz standardnu grešku ( $X \pm SE$ ). Verovatnoća nulte hipoteze manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Aktivnosti enzima anaerobnog metabolizma i antioksidativne zaštite kod pacijentkinja sa karcinomom dojke

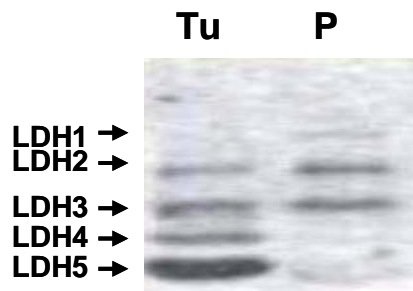
#### 4.1.1. Aktivnost LDH u tumorskom i peritumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke

Detaljna analiza aktivnosti LDH pokazala je veću prosečnu aktivnost LDH u tumorskom tkivu u odnosu na peritumorsko tkivo bolesnica sa karcinomom dojke, iako nije bilo statističke značajnosti ( $1675 \pm 152,6$  U/ml vs.  $1189 \pm 174,7$  U/ml,  $p > 0.05$ , Wilcoxon test) (Slika 1).



**Slika 1.** Aktivnost LDH u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke. ( $p > 0.05$ , Wilcoxon test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za tumorsko i peritumorsko tkivo.

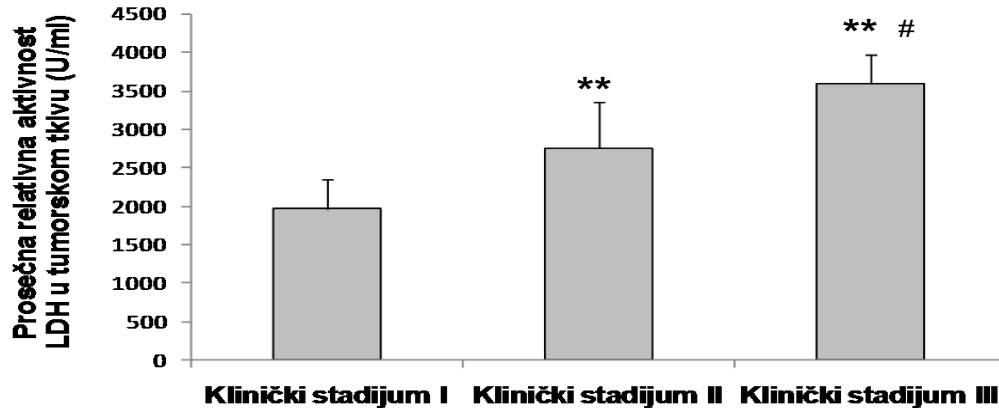
Daljim ispitivanjem pokazali smo da je u tumorskim tkivima veća aktivnost LDH5 izoforme. Na slici 2. je prikazana distribucija izoenzima LDH u tumorskom i peritumorskom tkivu. Uočava se da se LDH1-LDH4 detektuju u tumorskom i peritumorskom tkivu, dok se LDH5 izoforma detektuje samo u tumorskom tkivu.



**Slika 2.** Tipični zimogrami na kojima se uočava distribucija izoformi LDH u tumorskom (Tu) i peritumorskom (P) tkivu. LDH5 izoformu imaju samo tumorska tkiva.

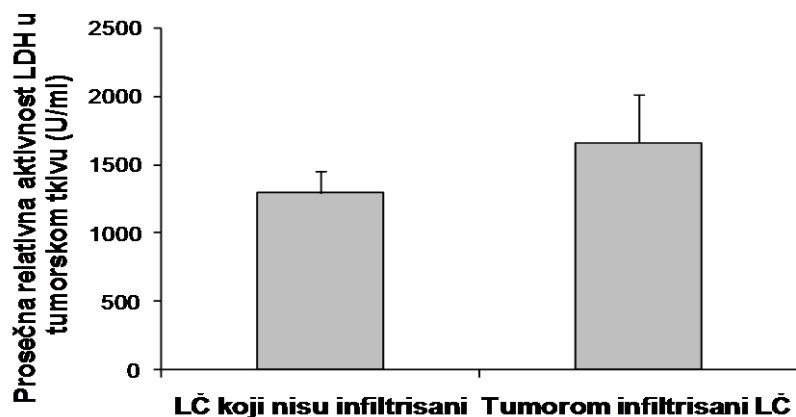
***4.1.2. Aktivnost LDH u odnosu na kliničko-patološke parametre  
bolesnica sa karcinomom dojke***

Analiza aktivnosti LDH u tumorskom tkivu pokazuje statistički značajno veću prosečnu aktivnost LDH u tumorskom tkivu kod bolesnica sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu III u poredjenju sa bolesnicama u kliničkom stadijumu II, dok obe grupe bolesnica pokazuju značajno veći nivo u poredjenju sa bolesnicama sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu I, kao što je pokazano na slici 3 ( I vs. II  $p=0.007$ ; I vs. III  $p=0.004$ ; II vs. III  $p=0.048$ , Mann Whitney test).



**Slika 3.** Promena aktivnosti LDH u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke zavisno od kliničkog stadijuma ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška aktivnosti pacijentkinja u kliničkim stadijumima I, II i III.

Analizirali smo aktivnost LDH u odnosu na infiltrisane limfne čvorove i pokazali smo da nema razlike u aktivnosti LDH u tumorima kod pacijentkinja sa infiltrisanim limfnim čvorovima ( $N_+$ ) u poredjenju sa grupom pacijentkinja sa neinfiltrisanim limfnim čvorovima ( $1663 \pm 349$  U/ml vs.  $1294 \pm 157,2$  U/ml,  $p > 0.05$ , Mann Whitney test) (Slika 4). Iako je uočeno da pacijentkinje sa limfnim čvorovima (LČ) infiltrisanim tumorom imaju veće prosečne relativne aktivnosti LDH u tumorskom tkivu u poredjenju sa pacijentkinjama sa neinfiltrisanim LČ, razlika nije statistički značajna.



**Slika 4.** Aktivnost LDH u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na infiltrisanost LČ tumorom ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za LČ infiltrisane tumorom i LČ koji nisu infiltrisani tumorom.

Obzirom da hormonski i HER2 receptorski status predstavljaju veoma značajne parametre u lečenju i patogenezi karcinoma dojke, analizirali smo aktivnost LDH u odnosu na hormonski i HER2 status. Pokazali smo da nema razlike u aktivnosti LDH između pacijentkinja sa hormonski pozitivnim receptorima ( $1612 \pm 255$  U/ml) u poredjenju sa pacijentkinjama sa negativnim hormonskim receptorima ( $1790 \pm 432.6$  U/ml,  $p=0.56$ , Mann Whitney test) (Tabela 2). Ispitivanja HER2 statusa pokazala su da pacijentkinje koje imaju HER2 negativne receptore imaju statistički značajno ( $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test) veću aktivnost LDH ( $1865 \pm 248.2$  U/ml) u tumorima u poredjenju sa pacijentkinjama koje imaju HER2 pozitivne receptore ( $792.8 \pm 277.9$  U/ml) (Tabela 2).

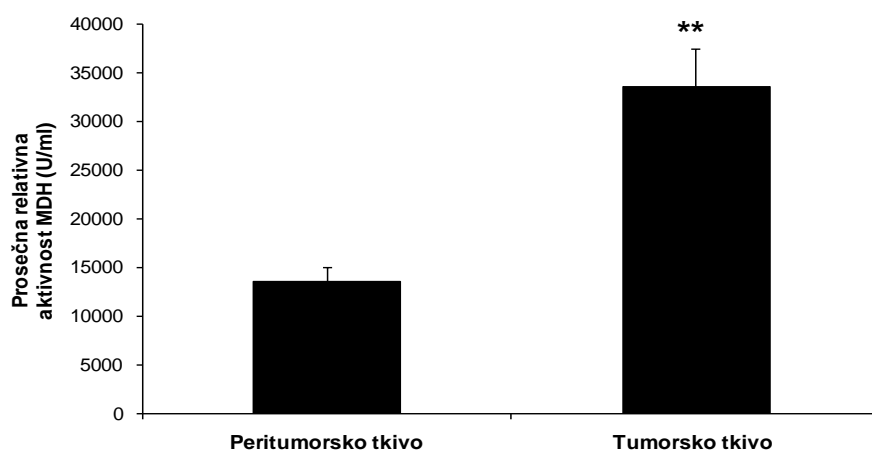
**Tabela 2. Aktivnost LDH i MDH u tumorskom tkivu u odnosu na karakteristike tumora**

Karakteristike	Aktivnost LDH i MDH u tumorskom tkivu			
	LDH (U/ml)	<i>p</i>	MDH (U/ml)	<i>p</i>
<b>Hormonski receptorski status</b>				
Negativni	1790		36632	
Pozitivni	1612	0.56	26682	0.73
<b>HER2 receptorski status</b>				
Negativni	1865		30234	
Pozitivni	792.8	0.05*	12833	0.01*



#### 4.1.3. Aktivnost MDH u tumorskom i peritumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke

Metodom spektrofotometrije pokazali smo prosečno veću relativnu aktivnost MDH u tumorskom tkivu u poredjenju sa peritumorskim tkivom bolesnica sa karcinomom dojke ( $27557 \pm 3173$  U/ml vs.  $27633 \pm 5158$  U/ml,  $p=0.01$ , Wilcoxon rank test). Na slici 5 se vidi da je prosečna relativna aktivnost MDH u tumorskom tkivu veća u poredjenju sa aktivnošću MDH u peritumorskom tkivu, pri čemu postoji visoko statistički značajna razlika.



**Slika 5.** Aktivnost MDH u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke ( $p \leq 0.01$ , Wilcoxon rank test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za tumorsko i peritumorsko tkivo.

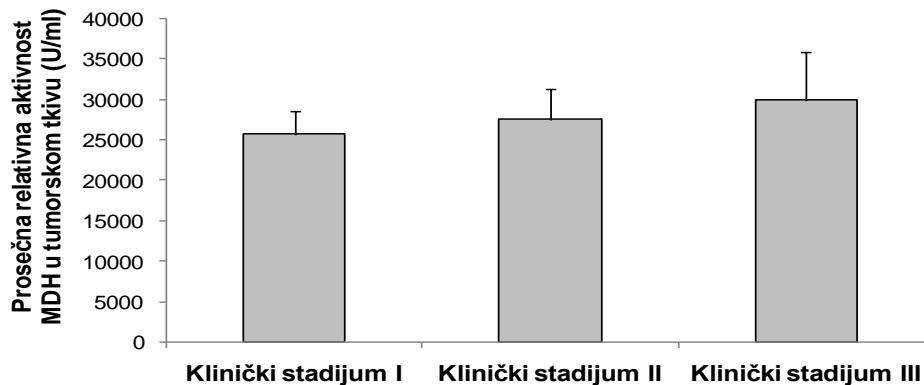
Metodom direktne zimografije detektovane su m-MDH-mitohondrijalna i c-MDH-citosolna izoforma MDH. Aktivnost m-MDH izoforme je veća kod svih tumorskih tkiva pacijentkinja u odnosu na peritumorsko tkivo dok c-MDH pokazuje sličnu aktivnost i u tumorskom i u peritumorskom tkivu (Slika 6).



**Slika 6.** Tipični zimogrami distribucije izoformi MDH u tumorskom (Tu) i peritumorskom (P) tkivu.

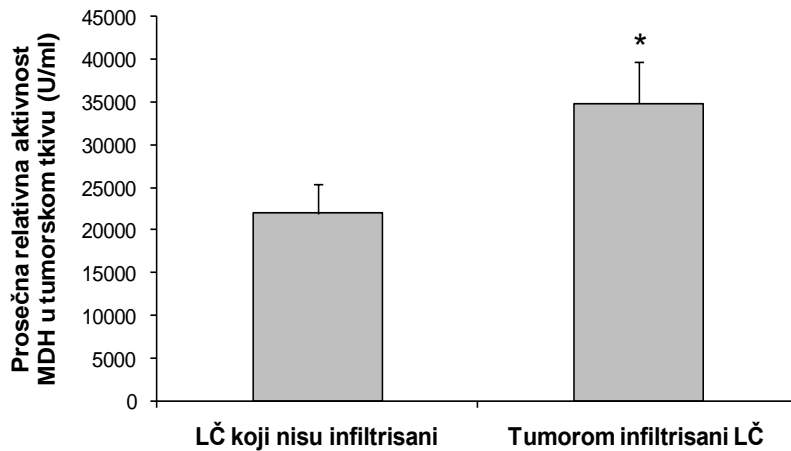
#### **4.1.4. Aktivnost MDH u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke**

Analiza aktivnosti MDH u tumorskom tkivu pokazuje da nema statistički značajne razlike u prosečnoj aktivnosti MDH u tumorskom tkivu kod bolesnica sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu III u poredjenju sa bolesnicama u kliničkom stadijumu II ili I, kao ni izmedju bolesnica u kliničkom stadijumu II u poredjenju sa bolesnicama sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu I ( I vs. II  $p=0.81$ ; I vs. III  $p=0.7$ ; II vs. III  $p=0.95$ , Mann Whitney test) (Slika 7).



**Slika 7.** Aktivnost MDH u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u kliničkim stadijumima I, II i III ( $p>0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška aktivnosti MDH.

Analizirali smo aktivnost MDH u odnosu na infiltrisanost limfnih čvorova Mann Whitney testom koji je pokazao da pacijentkinje sa infiltrisanim limfnim čvorovima ( $34819 \pm 4848$  U/ml) imaju značajno veću aktivnost MDH u tumorima u poredjenju sa pacijentkinjama sa neinfiltisanim limfnim čvorovima ( $22036 \pm 3420$  U/ml,  $p=0.02$ ) (Slika 8).

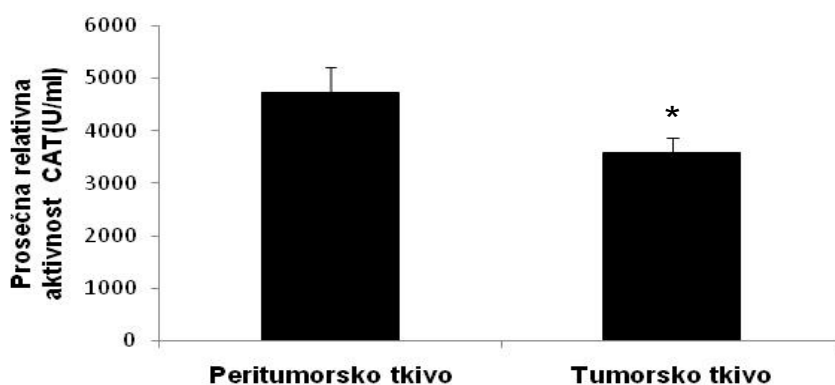


**Slika 8.** Aktivnost MDH u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na infiltrisanost LČ tumorom ( $*p \leq 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška aktivnosti MDH.

Takodje, analizirali smo aktivnost MDH u odnosu na hormonski i HER2 status. Pokazali smo Mann Whitney testom da nema razlike ( $p=0.56$ ) u aktivnosti MDH kod pacijentkinja sa hormonski pozitivnim receptorima ( $26682 \pm 2110$  U/ml) u poredjenju sa pacijentkinjama sa negativnim hormonskim receptorima ( $36632 \pm 18274$  U/ml) (Tabela 2). Analiza aktivnosti MDH u odnosu na HER2 status pokazala su da pacijentkinje koje imaju HER2 negativne receptore imaju statistički značajno ( $p=0.01$ , Mann Whitney test) veću aktivnost MDH ( $30234 \pm 3430$  U/ml) u tumorima u poredjenju sa pacijentkinjama koje imaju HER2 pozitivne receptore ( $12833 \pm 2627$  U/ml) (Tabela 2).

#### ***4.1.5. Aktivnost CAT u tumorskom i peritumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke***

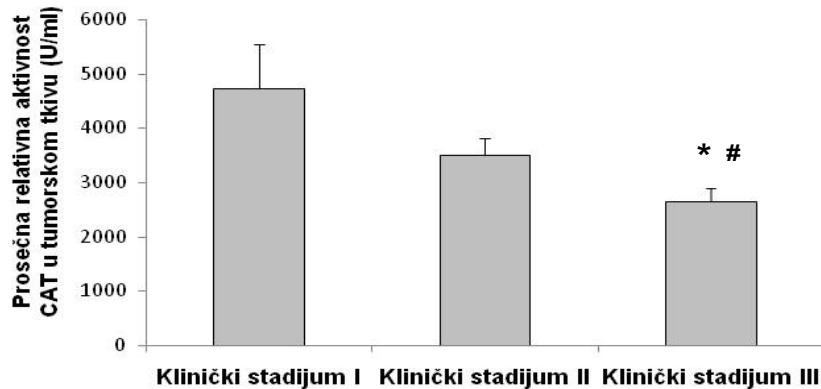
Analiza aktivnosti CAT pokazuje statistički značajno veću prosečnu aktivnost CAT u peritumorskom tkivu u odnosu na tumorsko tkivo bolesnica sa karcinomom dojke ( $4737 \pm 481,8$  U/ml vs.  $3587 \pm 278,5$  U/ml,  $p=0.05$ , Wilcoxon rank test) (Slika 9).



**Slika 9.** Aktivnost CAT u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke (\* $p \leq 0.05$ , Wilcoxon rank test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za tumorsko i peritumorsko tkivo.

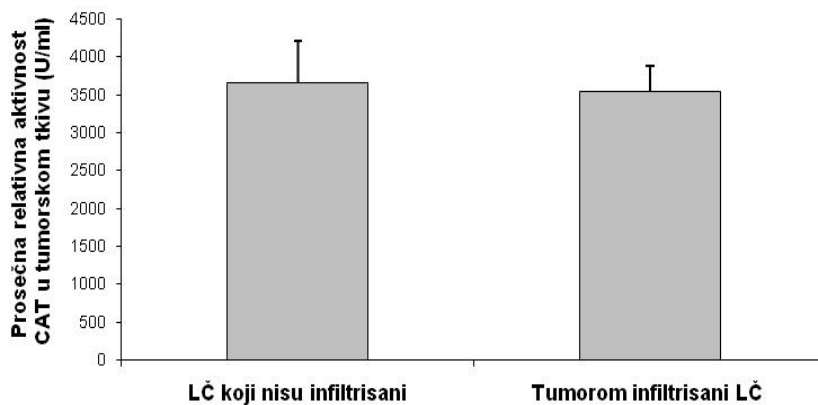
#### ***4.1.6. Aktivnost CAT u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke***

Analiza nivoa aktivnosti CAT u tumorskom tkivu pokazuje statistički značajno nižu prosečnu aktivnost CAT u tumorskom tkivu kod bolesnica sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu III u poredjenju sa bolesnicama u kliničkom stadijumu II i u odnosu na one u kliničkom stadijumu I ( I vs. II  $p=0.12$ ; I vs. III  $p=0.047$ ; II vs. III  $p=0.03$ , Mann Whitney test) (Slika 10).



**Slika 10.** Aktivnost CAT u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u kliničkim stadijumima I, II i III (III vs. I \*  $p \leq 0.05$ , III vs II #  $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška aktivnosti CAT pacijentkinja u kliničkim stadijumima I, II i III.

Dalje smo analizirali aktivnost CAT u odnosu na infiltrisane limfne čvorove Mann Whitney testom koji je pokazao da nema razlike ( $p > 0.05$ ) u aktivnosti CAT u tumorima kod pacijentkinja sa infiltrisanim limfnim čvorovima ( $3550 \pm 326.6$  U/ml) u poredjenju sa grupom pacijentkinja sa neinfiltrisanim limfnim čvorovima ( $3663 \pm 547.6$  U/ml) (Slika 11).



**Slika 11.** Aktivnost CAT u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na infiltrisanost LČ tumorom ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška aktivnosti CAT za obe grupe pacijentkinja.

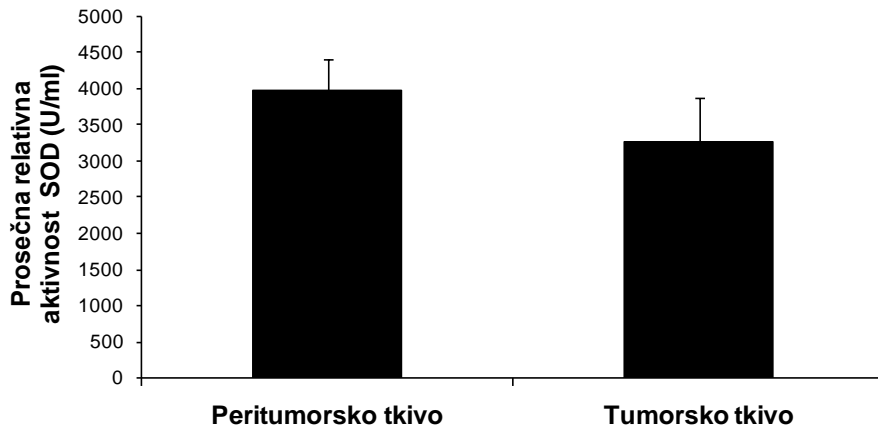
Nadalje, analizirali smo aktivnost CAT u odnosu na hormonski i HER2 receptorski status. Primenom Mann Whitney testa pokazali smo da nema razlike ( $p=0.91$ ) u aktivnosti CAT kod pacijentkinja sa hormonski pozitivnim receptorima ( $3583\pm 314.5$  U/ml) u poredjenju sa pacijentkinjama sa negativnim hormonskim receptorima ( $3696\pm 903.7$  U/ml) (Tabela 3). Analiza aktivnosti CAT u odnosu na HER2 status pokazala je da pacijentkinje koje imaju HER2 negativne receptore imaju veću aktivnost CAT ( $3673\pm 312.2$  U/ml) u tumorima u poredjenju sa pacijentkinjama koje imaju HER2 pozitivne receptore ( $2963\pm 177.4$  U/ml) iako nije bilo statistički značajne razlike ( $p=0.7$ , Mann Whitney test). Na Tabeli 3. prikazane su prosečne relativne aktivnosti SOD i CAT u tumorskom tkivu pacijentkinja sa pozitivnim i negativnim hormonskim i HER2 receptorima.

**Tabela 3. Aktivnost CAT i SOD u tumorskom tkivu u odnosu na patološke karakteristike tumora**

Karakteristike	Aktivnost CAT i SOD u tumorskom tkivu			
	CAT (U/ml)	<i>p</i>	SOD (U/ml)	<i>p</i>
<b>Hormonski receptorski status</b>				
Negativni	3696		1494	
Pozitivni	3583	0.91	3485	0.25
<b>HER2 receptorski status</b>				
Negativni	3673		2745	
Pozitivni	2963	0.7	6493	0.02*

#### ***4.1.7. Aktivnost SOD u tumorskom i peritumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke***

Analizom srednjih vrednosti aktivnosti SOD pokazali smo da nema statistički značajne razlike u prosečnoj aktivnosti SOD u tumorskom i peritumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke ( $3981\pm 449,4$  U/ml vs.  $3256\pm 623,6$  U/ml,  $p=0.32$ , Wilcoxon rank test) (Slika 12).



**Slika 12.** Aktivnost SOD u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke ( $p > 0.05$ , Wilcoxon rank test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za tumorsko i peritumorsko tkivo.

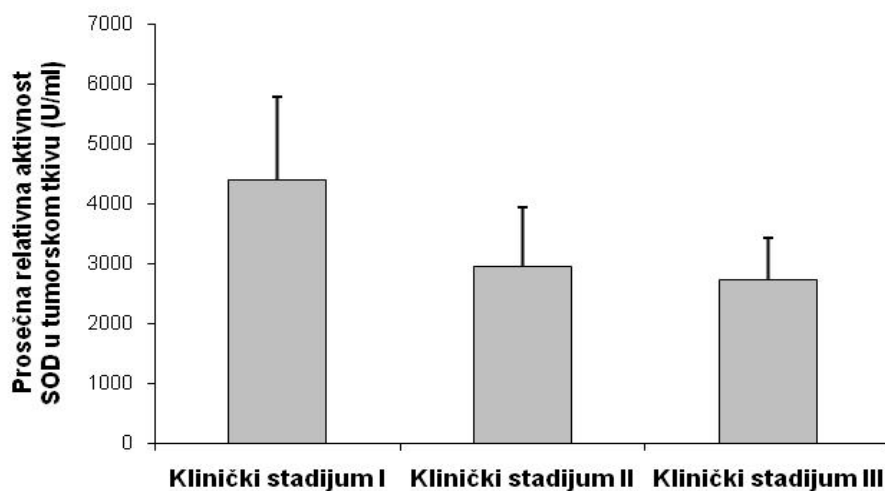
Metodom reverzne zimografije detektovane su dve izoforme SOD:  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -SOD i  $\text{Mn}^{2+}$ -SOD.  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -SOD izoforma je identifikovana kao traka brže elektroforetske pokretljivosti, dok je  $\text{Mn}^{2+}$ -SOD izoforma identifikovana kao traka sporije elektroforetske pokretljivosti. Aktivnost  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -SOD izoforme je povišena kod svih peritumorskih tkiva pacijentkinja u odnosu na tumorsko tkivo (Slika 13). Na slici 13. prikazani su tipični zimogrami na kojima se vidi da je aktivnost  $\text{Mn}^{2+}$ -SOD izoforme veća u tumorskom u odnosu na peritumorsko tkivo.



**Slika 13.** Tipični zimogrami distribucije izoformi SOD u tumorskom (Tu) i peritumorskom (P) tkivu.

#### 4.1.8. Aktivnost SOD u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke

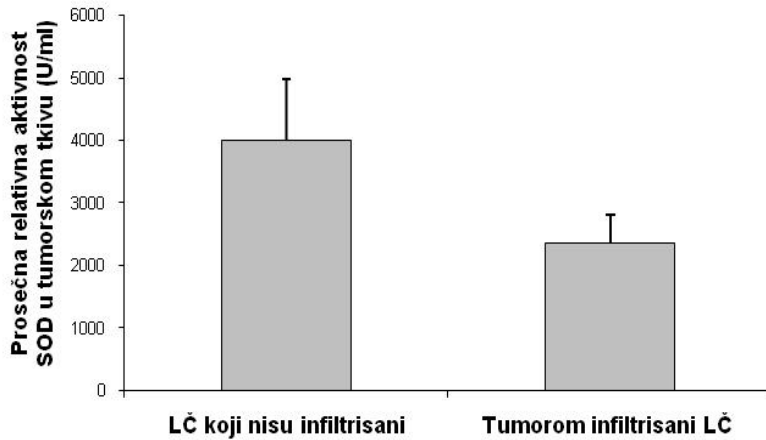
Analiza nivoa aktivnosti SOD u tumorskom tkivu pokazuje da nema statistički značajne razlike u prosečnoj aktivnosti SOD u tumorskom tkivu kod bolesnica sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu III u poredjenju sa bolesnicama u kliničkom stadijumu II ili I, ( I vs. II  $p=0.31$ ; I vs. III  $p=0.75$ ; II vs. III  $p=0.89$ , Mann Whitney test) (Slika 14).



**Slika 14.** Aktivnost SOD u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u kliničkim stadijumima I, II i III ( $p>0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška aktivnosti pacijentkinja u kliničkim stadijumima I, II i III.

Analizirali smo aktivnost SOD u odnosu na infiltrisane limfne čvorove Mann Whitney testom koji je pokazao da nema statistički značajne razlike ( $p>0.05$ ) u aktivnosti SOD u tumorima kod pacijentkinja sa infiltrisanim limfnim čvorovima ( $2363\pm 435.1$  U/ml) u poredjenju sa grupom pacijentkinja sa limfnim čvorovima koji nisu infiltrisani ( $4005\pm 976.4$  U/ml) (Slika 15). Na slici 15 prikazan je histogram na kome se vidi da pacijentkinje sa neinfiltisanim LČ imaju veće prosečne relativne aktivnosti SOD u tumorskom tkivu u poredjenju sa pacijentkinjama sa LČ infiltrisanim tumorom, iako razlika nije bila statistički značajna.





**Slika 15.** Aktivnost SOD u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na infiltrisanost LČ tumorom ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška aktivnosti SOD za tumor neinfiltrisane i tumor infiltrisane LČ.

Nadalje, analizirali smo aktivnost SOD u odnosu na hormonski i HER2 status. Primenom Mann Whitney testa pokazali smo da pacijentkinje sa hormonski pozitivnim receptorima imaju veću aktivnost SOD ( $3485 \pm 664.8$  U/ml) u poredjenju sa pacijentkinjama sa negativnim hormonskim receptorima ( $1494 \pm 317.3$  U/ml), iako nije bilo statistički značajne razlike ( $p > 0.05$ ) (Tabela 3). Analiza aktivnosti SOD u odnosu na HER2 status pokazala je da pacijentkinje koje imaju HER2 pozitivne receptore ( $6493 \pm 312.2$  U/ml) imaju veću aktivnost SOD ( $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test) u tumorima u poredjenju sa pacijentkinjama koje imaju HER2 negativne receptore ( $2745 \pm 177.4$  U/ml) (Tabela 3).

## 4.2. Aktivnost LDH, SOD i CAT u odnosu na mamografske karakteristike

### 4.2.1. Mamografski nalazi

Mamografije 75 pacijentkinja sa patohistološki povrdjenim karcinomom dojke su analizirani prema ACR BI-RADS leksikonu. Analiza je pokazala da je na osnovu procenta denziteta parenhima bilo: 26 žena ACR1 denziteta parenhima, 19 pacijentkinja

ACR2 denziteta parenhima, 16 pacijentkinja ACR3 denziteta parenhima i 14 pacijentkinja sa ACR4 denziteta parenhima. Sve ispitivani mamogrami su bili klasifikovani kao BIRADS 4a, 4b, 4c i 5 prema tipu lezije, obliku, konturi i intenzitetu senke i morfološkim karakteristikama kalcifikacija. Detaljna analiza mamograma ispitivanih pacijentkinja pokazala je da je bilo 42 pacijentkinje sa senkama bez kalcifikacija, 8 pacijentkinja sa senkama udruženim sa grupisanim kalcifikacijama, 7 pacijentkinja sa visoko suspektnim kalcifikacijama, 10 pacijentkinja sa fokalnom asimetrijom i 8 pacijentkinja sa narušenom arhitektonikom. U grupi pacijentkinja sa karcinomom dojke koje su imale na mamogramima senke, 37 pacijentkinja je imalo konturu sa spikulama po obodu, dok je 13 imalo senku neoštre konture. Kada je u pitanju oblik senke, 40 bolesnica je imalo senku nepravilnog oblika, dok je 10 pacijentkinja imalo kružni ili ovalni oblik senke (Tabela 4).

U grupi ispitivanih pacijentkinja bilo je 15 pacijentkinja sa grupisanim kalcifikacijama sa i bez senki: 11 pacijentkinja sa pleomorfnim kalcifikacijama, jedna pacijentkinja sa punktifornim kalcifikacijama, 2 pacijentkinje sa granajućim kalcifikacijama i jedna pacijentkinja sa linearnim tipom kalcifikacija.

**Tabela 4. Mamografske karakteristike pacijentkinja sa karcinomom dojke**

Karakteristike	Pacijenti, broj (%)
<b>Denzitet parenhima</b>	
ACR1(<25%)	26 (34,66%)
ACR2(<50%)	19 (25,33%)
ACR3(>50%)	16 (21,33%)
ACR4(>75%)	14 (18,66%)
<b>Mamografski nalazi</b>	
Senke bez kalcifikacija	42 (56%)
Senke sa kalcifikacijama	8 (10,66%)
Grupisane suspektne kalcifikacije	7 (8%)
Fokalne asimetrije	10 (13,3%)
Narušene arhitektonike	8 (10,66%)
<b>Kontura senki</b>	
Neoštra kontura	13 (26%)
Spikulirana	37 (74%)
<b>Oblik senki</b>	
Kružni ili ovalni	10 (20%)
Neppravilni	40 (80%)
<b>Kalcifikacije</b>	
Pleomorfne	11 (14,66%)
Amorfne	0 (0%)
Punktiformne	1 (1,33%)
Granajuće	2 (2,66%)
Linearne	1 (1,33%)

Grupu pacijentkinja koje su na mamogramima imale samo grupisane suspektne kalcifikacije činile su pacijentkinje sa grupisanim pleomorfnim kalcifikacijama (5 pacijentkinja) i pacijentkinje sa granajućim suspektnim kalcifikacijama (2 pacijentkinje). Mamografski nalazi senke (sa ili bez pridruženih kalcifikacija), suspektnih grupisanih kalcifikacija, fokalne asimetrije ili narušene arhitektonike nisu povezani sa HER2 receptorskim statusom ispitivanih pacijentkinja ( $p=0.56$ ,  $p=0.1$ ,  $p=0.09$ ,  $p=0.99$ ,  $p=0.99$ , Fisher's exact test). Pokazano je da nije bilo značajne povezanosti između prisustva kalcifikacija na mamogramima i HER2 receptorskog statusa ( $p=0.06$ ), iako je 6 (40%) pacijentkinja koje su bile HER2 pozitivne imale kalcifikacije i 9 (15%) pacijentkinja koje su bile HER2 negativne imale kalcifikacije na mamografskim snimcima (Tabela 5).

Takodje smo analizirali povezanost denziteta parenhima sa patohistološkim tipom tumora i pokazali smo da pacijentkinje sa većim denzitetom parenhima (ACR3 ili ACR4) imaju uglavnom duktalni invazivni karcinom (54, 5% duktalni invazivni karcinom vs. 17%

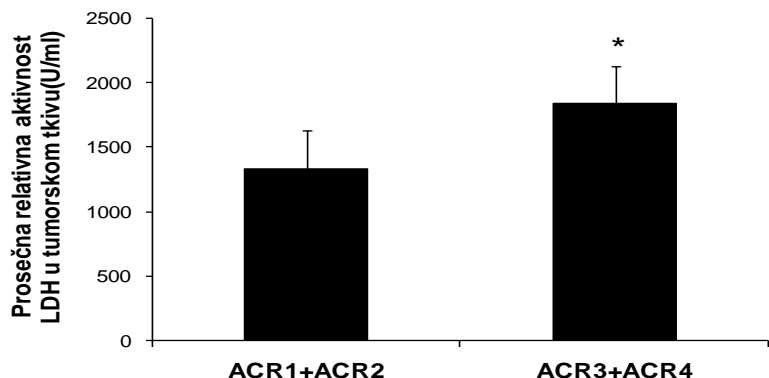
lobularni karcinom), dok pacijentkinje sa ACR1 ili ACR2 imaju uglavnom lobularni karcinom (82% lobularni karcinom vs. 45% duktalni invazivni karcinom).

**Tabela 5. Mamografske karakteristike u odnosu na HER2 status**

Karakteristike	HER2 status		p
	Negativni	Pozitivni	
<b>Mamografski nalazi</b>			
Senke bez kalcifikacija	35(58,33%)	7(46,66%)	0,56
Senke sa kalcifikacijama	5(8,33%)	3(20%)	0,1
Grupisane suspektne kalcifikacije	4(6,66%)	3(20%)	0,09
Fokalne asimetrije	9(15%)	1(6,66%)	0,67
Narušene arhitektonike	7(11,66%)	1(6,66%)	0,99
<b>Kalcifikacije</b>			
Kalcifikacije (izolovane ili sa senkom)	9(15%)	6(40%)	0.06

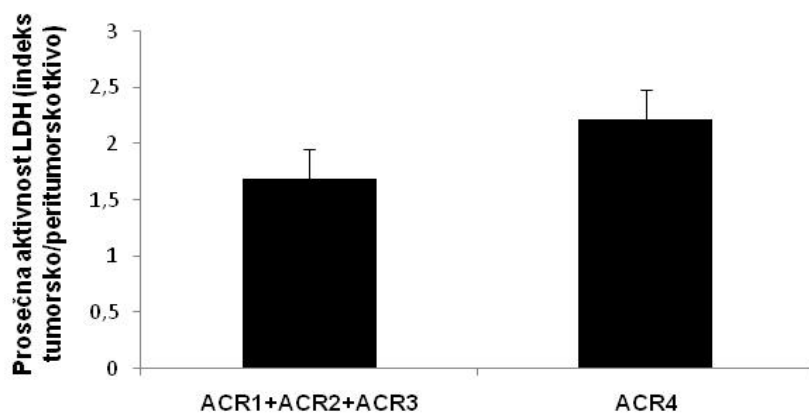
#### **4.2.2. Povezanost aktivnosti LDH, CAT i SOD sa mamografskim karakteristikama**

Analizom aktivnosti LDH u tumorskom tkivu u odnosu na denzitet parenhima, primenom T testa za nezavisne uzorke pokazali smo da pacijentkinje sa većim denzitetom parenhima (ACR3 ili ACR4) imaju statistički značajno veću aktivnost LDH u tumorskom tkivu u poredjenju sa pacijentkinjama sa ACR1 ili ACR2 ( $1836.3 \pm 289.85$  U/ml vs.  $1328.9 \pm 315.16$  U/ml,  $p \leq 0.05$ ) (Slika 16).



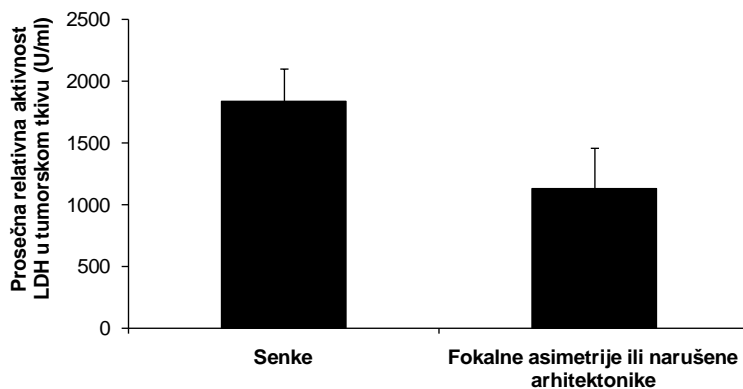
**Slika 16.** Aktivnost LDH u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na denzitet parenhima (\*  $p \leq 0.05$ , T test za nezavisne uzorke). Predstavljene su srednje vrednosti aktivnosti LDH  $\pm$  standardna greška za obe grupe pacijentkinja.

Obzirom da smo ispitivali povezanost denziteta parenhima cele dojke koja je obolela, izračunali smo indeks aktivnosti enzima tako što smo podelili aktivnost enzima u tumorskom tkivu sa aktivnošću enzima u peritumorskom tkivu. Pacijentkinje koje su imale ACR4 strukturu dojki imale su 23.9 % veću aktivnost LDH (odnos tumorsko/peritumorsko tkivo) u poredjenju sa pacijentkinjama sa strukturom ACR1, 2 i 3 ( $2.22 \pm 0.89$  U/ml vs.  $1.69 \pm 0.53$  U/ml,  $p = 0.69$ , T test za nezavisne uzorke) (Slika 17), iako ova razlika nije bila statistički značajna.



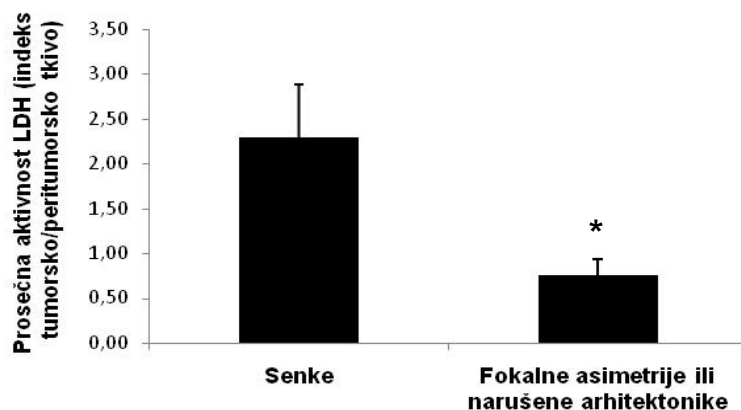
**Slika 17.** Aktivnost LDH predstavljena kao indeks aktivnosti tumorskog i peritumorskog tkiva pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na denzitet parenhima ( $p > 0.05$ , T test za nezavisne uzorke). Predstavljene su srednje vrednosti aktivnosti LDH  $\pm$  standardna greška.

Pacijentkinje koje su imale senke na mamogramima su u tumorskom tkivu imale veću, iako ne statistički značajno veću aktivnost LDH u poredjenju sa pacijentkinjama koje su imale fokalnu asimetriju ili narušenu arhitektoniku ( $1133.91 \pm 330.89$  U/ml vs.  $1838.06 \pm 263.11$  U/ml,  $p > 0.05$ ) (T test za nezavisne uzorke). Na slici 18. prikazan je histogram aktivnosti LDH u tumorskom tkivu kod pacijentkinja koje su na mamografijama imale senku i pacijentkinje koje su imale fokalnu asimetriju ili narušenu arhitektoniku.



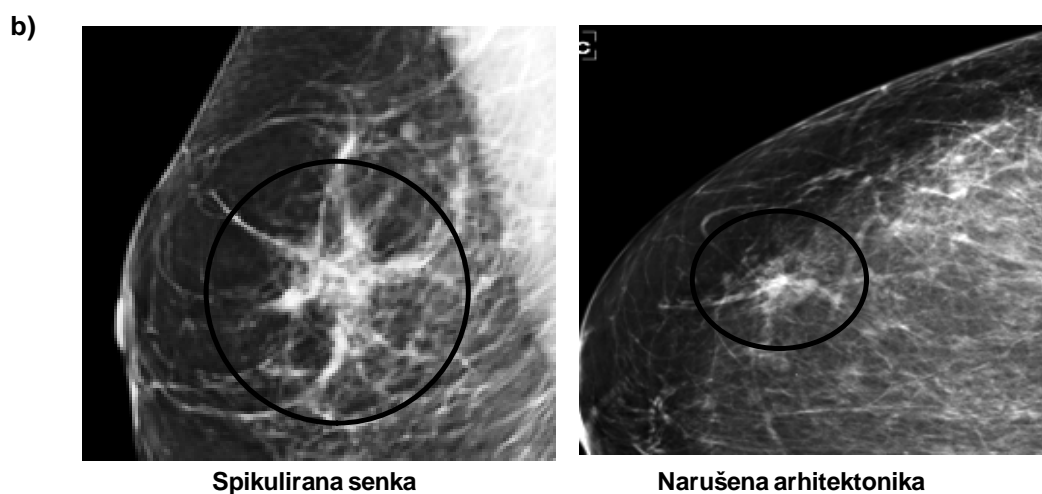
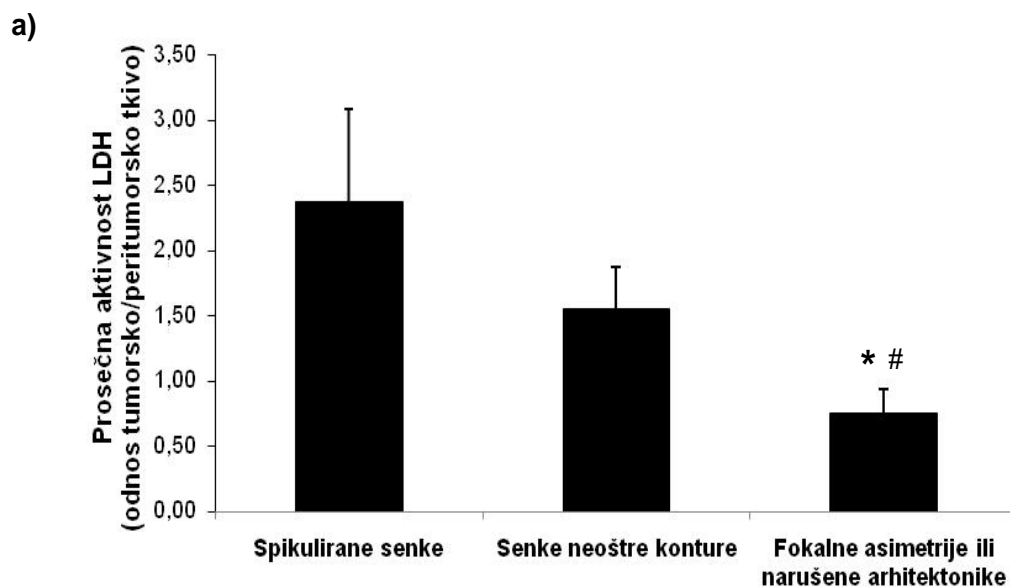
**Slika 18.** Aktivnost LDH u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke sa senkama na mamogramima u odnosu na pacijentkinje sa fokalnom asimetrijom ili narušenom arhitektonikom ( $p > 0.05$ , T test za nezavisne uzorke). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška aktivnosti LDH za obe grupe pacijentkinja.

Daljim ispitivanjem pokazano je da pacijentkinje sa senkom na mamogramu imaju statistički značajno veću aktivnost LDH (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) u poredjenju sa pacijentkinjama koje su imale fokalnu asimetriju ili narušenu arhitektoniku ( $0.76 \pm 0.18$  vs.  $2.29 \pm 0.62$ ,  $p \leq 0.05$ , T test za nezavisne uzorke) (Slika 19).



**Slika 19.** Indeks aktivnost LDH (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa senkama na mamogramima u odnosu na pacijentkinje sa fokalnom asimetrijom ili narušenom arhitektonikom (\* $p \leq 0.05$ , T test za nezavisne uzorke). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška indeksa aktivnosti LDH za obe grupe pacijentkinja.

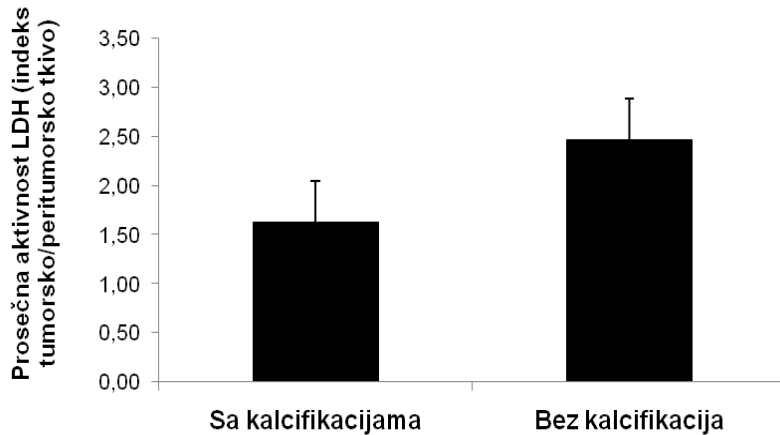
Detaljnija analiza je pokazala da nema statistički značajne razlike u aktivnosti LDH (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) između pacijentkinja sa spikuliranim senkama i onih sa senkama neoštirih kontura na mamogramima ( $1.55 \pm 0.32$  vs.  $2.38 \pm 0.7$ ,  $p = 0.92$ , T test za nezavisne uzorke) kao što je prikazano na slici 20. Takođe, pokazali smo da pacijentkinje sa senkama neoštire konture imaju značajno veću aktivnost LDH u poredjenju sa pacijentkinjama sa fokalnom asimetrijom ili narušenom arhitektonikom ( $1.55 \pm 0.32$  vs.  $0.76 \pm 0.18$ ,  $p = 0.04$ , T test za nezavisne uzorke) (Slika 20). Pacijentkinje sa spikuliranim senkama imale su značajno veću aktivnost LDH (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) u poredjenju sa pacijentkinjama sa fokalnom asimetrijom ili poremećajem arhitektonike ( $2.38 \pm 0.7$  vs.  $0.76 \pm 0.18$ ,  $p = 0.02$ , T test za nezavisne uzorke). Na slici 20 prikazan je histogram prosečne aktivnosti LDH (tumorsko/peritumorsko tkivo) kod pacijentkinja koje su na mamografijama imale spikulirane senke, senke neoštire konture i fokalnu asimetriju ili nerušenu arhitektoniku, kao i reprezentativne mamografije pacijentkinja sa spikuliranom senkom i narušenom arhitektonikom.



**Slika 20.** a) Prosečni indeks aktivnosti LDH (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa spikuliranim senkama, sa senkama neoštre konture i sa fokalnom asimetrijom ili narušenom arhitektonikom (\* $p \leq 0.05$ , # $p \leq 0.05$ , T test za nezavisne uzorke). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška aktivnosti LDH za sve tri grupe pacijentkinja. b) Reprerzentativne mamografije na kojima se vidi primer ispitivane pacijentkinje sa spikuliranom senkom i pacijentkinje sa narušenom arhitektonikom.

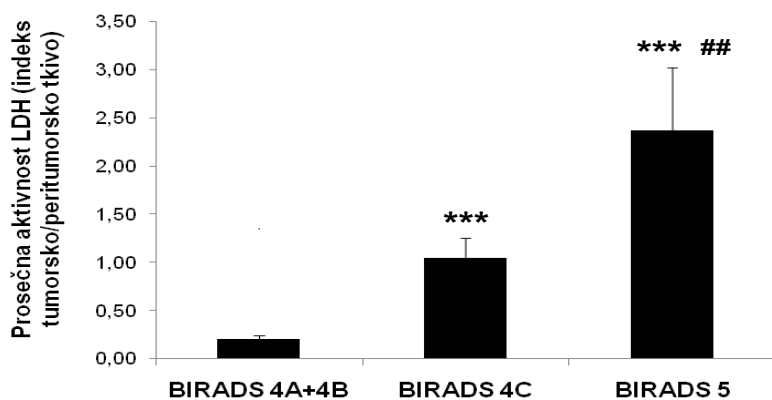


Pokazano je da nije bilo povezanosti između aktivnosti LDH (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) kod pacijentkinja sa kalcifikacijama i pacijentkinja bez kalcifikacija na mamogramima ( $1.62 \pm 0.55$  vs.  $2.47 \pm 0.66$ ,  $p > 0.05$ , T test za nezavisne uzorke) (Slika 21).



**Slika 21.** Aktivnost LDH (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa kalcifikacijama i bez kalcifikacija na mamogramima ( $p > 0.05$ , T test za nezavisne uzorke). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška aktivnosti LDH za obe grupe pacijentkinja.

Medju analiziranim mamogramima 48 pacijentkinja je imalo BIRADS 5 kategoriju, 15 pacijentkinja je imalo BIRADS 4c kategoriju i 12 pacijentkinja je imalo BIRADS 4a ili 4b kategoriju. Pacijentkinje sa BIRADS 5 kategorijom imaju veću aktivnost LDH (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) u poredjenju sa pacijentkinjama sa BIRADS 4c ( $1.05 \pm 0.2$  vs.  $2.37 \pm 0.65$ ,  $p = 0.01$ , T test za nezavisne uzorke) i u poredjenju sa pacijentkinjama sa BIRADS 4a ili 4b ( $0.21 \pm 0.04$  vs.  $2.37 \pm 0.65$ ,  $p = 0.0001$ ). Pacijentkinje sa BIRADS 4c kategorijom imaju statistički značajno veću aktivnost LDH u poredjenju sa pacijentkinjama sa BIRADS 4a ili 4b na mamogramima (Slika 22). To znači da sa povećanjem BIRADS kategorije dolazi do povećanja aktivnosti LDH (tumorsko/peritumorsko tkivo).



**Slika 22.** Prosečni indeks aktivnosti LDH (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) kod pacijentkinja sa karcinomom dojke zavisno od BIRADS kategorije na mamogramima (\*\*\*) $p \leq 0.001$ , ## $p \leq 0.01$ , T test za nezavisne uzorke). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška indeksa aktivnosti LDH za pojedine grupe pacijentkinja.

Analiza aktivnosti CAT u odnosu na mamografske nalaze pokazala je da nema statistički značajne razlike u aktivnosti CAT u tumorskom tkivu između pacijentkinja sa spikuliranim senkama i onih sa senkama neoštire konture na mamogramima ( $8.15 \pm 0.8$  vs.  $8.46 \pm 0.15$ ,  $p = 0.07$ , Wilcoxon test). U Tabeli 6 su date prosečne vrednosti aktivnosti CAT u odnosu na oblik senki i BIRADS kategoriju.

Pacijentkinje koje su imale BIRADS 5 na mamogramima imale su statistički značajno nižu aktivnost CAT (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) u poredjenju sa pacijentkinjama koje su imale BIRADS 4c ( $1.27 \pm 0.15$  vs.  $2.2 \pm 0.24$ ,  $p \leq 0.05$ ) i u poredjenju sa pacijentkinjama koje su imale BIRADS 4a ili 4b ( $0.94 \pm 0.1$  vs.  $2.2 \pm 0.24$ ,  $p \leq 0.01$ , T test za nezavisne uzorke) (Tabela 6). U tom smislu, pacijentkinje koje su imale BIRADS 4c na mamogramima imale su statistički značajno nižu aktivnost CAT (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) u poredjenju sa pacijentkinjama koje su imale BIRADS 4a ili 4b ( $0.94 \pm 0.1$  vs.  $1.27 \pm 0.15$ ,  $p \leq 0.01$ , T test za nezavisne uzorke) na mamogramima (Tabela 6).

**Tabela 6. Prosečna aktivnost CAT i SOD u odnosu na mamografske karakteristike**

Karakteristike	Aktivnost CAT i SOD u tumorskom tkivu (U/ml <sub>log</sub> )			
	CAT	<i>p</i>	SOD	<i>p</i>
<b>Senke</b>				
<b>Spikulirane</b>	8,15		7,83	
<b>Sa neoštrom konturom</b>	8,46	0.07	7,43	0.67
	Indeks aktivnosti CAT i SOD (tumorsko/peritumorsko)			
	CAT	<i>p</i>	SOD	<i>p</i>
<b>BIRADS kategorija</b>				
<b>BIRADS 4a + 4b</b>	0,94		1	
<b>BIRADS 4c</b>	1,27	0.004*	0,33	0,96
<b>BIRADS 5</b>	2,2	0.029*	0,43	0,72

Analiza aktivnosti SOD u odnosu na mamografske nalaze pokazala je da nema statistički značajne razlike u aktivnosti SOD u tumorskom tkivu između pacijentkinja sa spikuliranim senkama i onih sa senkama neoštre konture na mamogramima ( $7.83 \pm 0.35$  vs.  $7.43 \pm 0.37$ ,  $p > 0.05$ , Wilcoxon test) (Tabela 6).

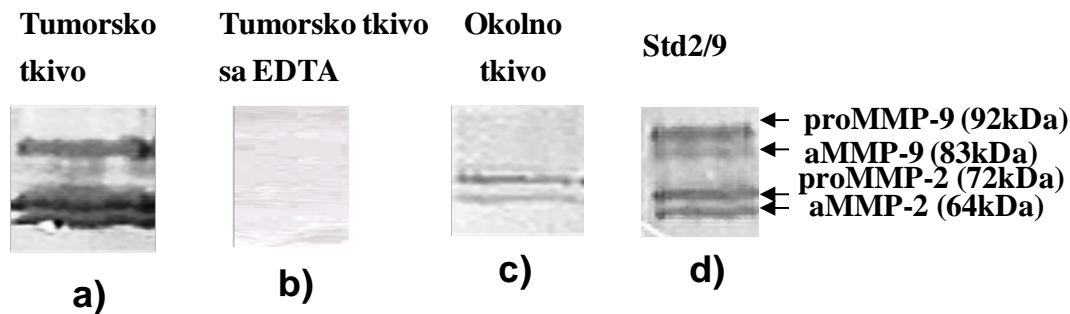
Pokazali smo da nije bilo razlike u aktivnosti SOD (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) između pacijentkinja koje su imale BIRADS 5 na mamogramima i pacijentkinja koje su imale BIRADS 4c ( $0.43 \pm 0.52$  vs.  $1.0 \pm 0.71$ ,  $p = 0.72$ ), kao i u poredjenju sa pacijentkinjama koje su imale BIRADS 4a ili 4b ( $0.43 \pm 0.52$  vs.  $0.33 \pm 0.44$ ,  $p = 0.96$ , T test za nezavisne uzorke) (Tabela 6).

### **4.3. Aktivnost MMP-2 i MMP-9 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke**

#### ***4.3.1. Aktivnost MMP-2 i MMP-9 u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke***

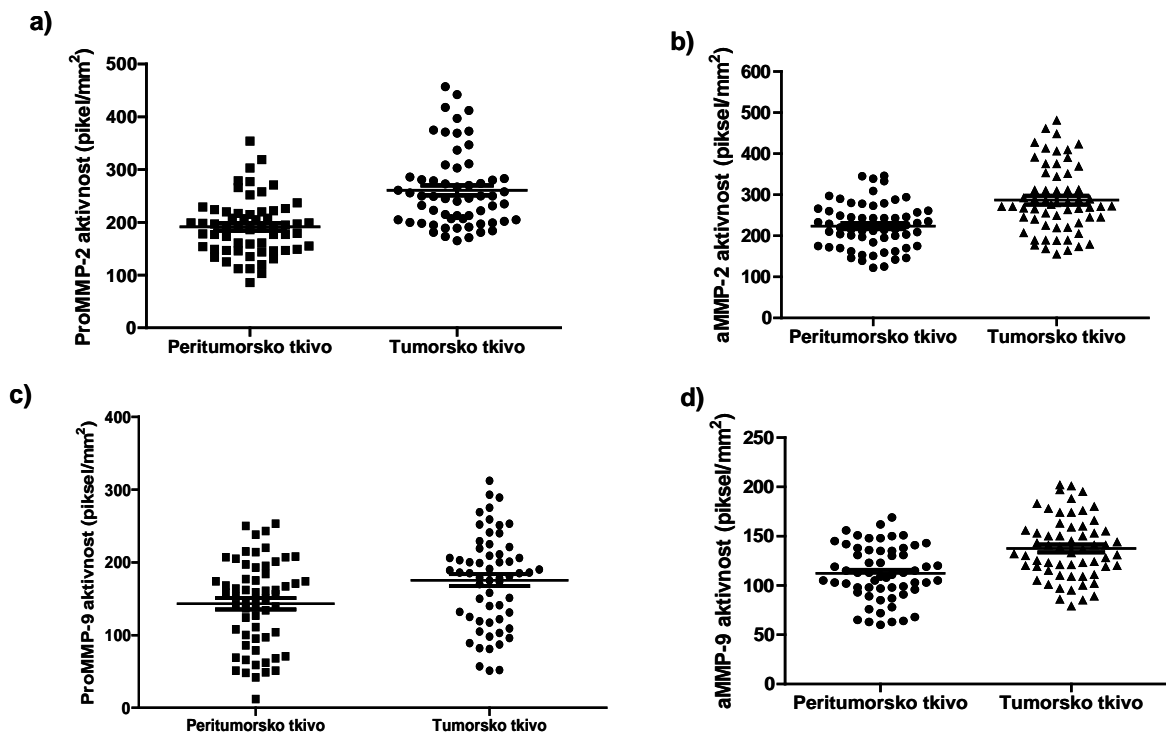
Ispitali smo nivo aktivnosti MMP-2 i MMP-9 u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa lokoregionalnim karcinomom dojke (I, II i III klinički stadijum) metodom želatin zimografije. Želatin zimografija je visoko senzitivna metoda neredukujuće elektroforeze kojom se detektuju matriksne metaloproteinaze zahvaljujući njihovoj sposobnosti da razlažu želatin. U tumorskom tkivu uočavaju se proforme

želatinaza (neaktivne forme, proMMP-2, proMMP-9) i aktivne forme želatinaza (aMMP-2, aMMP-9). Poredjenjem sa standardom koji odgovara njihovoj molekularnoj masi (proMMP-2, 72 kDa; aMMP-2, 64 kDa; proMMP-9, 92 kDa; aMMP-9, 83 kDa) određuju se i semikvantitativno mere želatinaze. Na slici 23 prikazani su tipični zimogrami na kojima se vidi da je aktivnost proMMP-9, aMMP-9, proMMP-2 i aMMP-2 viša u tumorskom u odnosu na peritumorsko tkivo.



Slika 23. Reprezentativni zimogrami aktivnosti latentnih i aktivnih formi MMP-2 i MMP-9 u tumorskom i okolnom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke.

Detaljna analiza prosečne aktivnosti proMMP-2 u tumorskom tkivu u odnosu na peritumorsko tkivo bolesnica sa karcinomom dojke pokazala je da postoji statistički značajno povećanje prosečne aktivnosti proMMP-2 u tumorskom tkivu u odnosu na peritumorsko tkivo ( $139.4 \pm 4.52$  vs.  $112.5 \pm 3.58$ ,  $p=0.001$ , Wilcoxon rank test) (Slika 24a). Prosečna aktivnost aMMP-2 u tumorskom tkivu značajno je veća u poredjenju sa okolnim tkivom obolelih od karcinoma dojke ( $p=0.0001$ , Wilcoxon rank test) (Slika 24b). Analiza srednjih vrednosti nivoa aktivnosti MMP-9 pokazuje statistički značajno veću aktivnost proMMP-9 u tumorskom tkivu u odnosu na peritumorsko tkivo pacijentkinja sa karcinomom dojke ( $179 \pm 8.79$  vs.  $154.4 \pm 8.42$ ,  $p=0.007$ , Wilcoxon rank test) (Slika 24c). Takođe, u tumorskom tkivu izmerili smo statistički značajno veću srednju vrednost aktivnosti aMMP-9 u poredjenju sa aktivnošću aMMP-9 u okolnom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke ( $139.4 \pm 4.52$  vs.  $112.5 \pm 3.58$ ,  $p=0.001$ , Wilcoxon rank test) (Slika 24d).

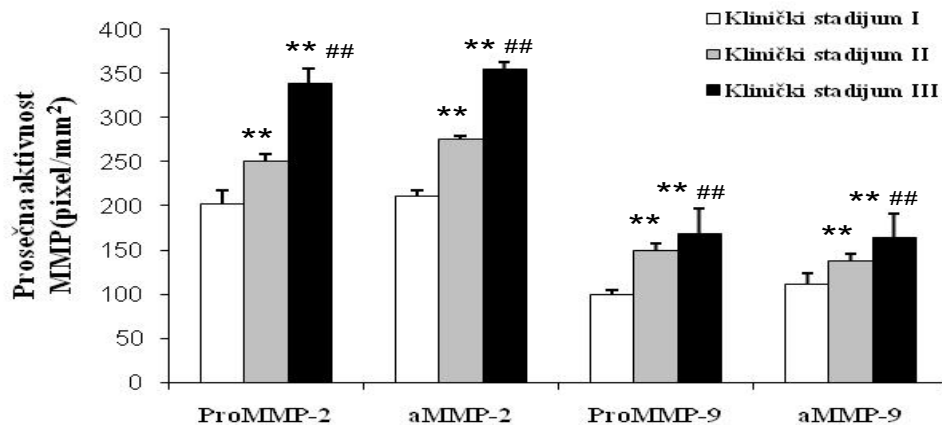


**Slika 24.** Aktivnosti a) proMMP-2, b) aMMP-2, c) proMMP-9 i d) aMMP-9 u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke. Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška aktivnosti želatinaza za tumorsko i peritumorsko tkivo.

#### 4.3.2. Aktivnost MMP-2 i MMP-9 u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke

Analiza aktivnosti MMP-2 i MMP-9 pokazuje statistički značajno veću prosečnu aktivnost proMMP-2 u tumorskom tkivu kod bolesnica sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu III u poredjenju sa bolesnicama u kliničkom stadijumu II, dok obe grupe bolesnica pokazuju značajno veći nivo u poredjenju sa bolesnicama sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu I, kao što je pokazano na slici 25 (proMMP-2:  $p=0.003$ ,  $p=0.008$ , Mann Whitney test). Takođe, u tumorskom tkivu izmerili smo statistički značajno veću srednju vrednost aktivnosti aktivne forme MMP-2 kod bolesnica sa karcinomom dojke u

kliničkom stadijumu III u poredjenju sa bolesnicama u kliničkom stadijumu II, dok obe grupe bolesnica pokazuju značajno veći nivo u poredjenju sa bolesnicama sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu I (aMMP-2:  $p=0.009$  do  $p=0.0168$ , Mann Whitney test) (Slika 25). Prosečna aktivnost proMMP-9 u tumorskom tkivu kod bolesnica u kliničkom stadijumu III značajno je veća u poredjenju sa bolesnicama u kliničkim stadijumima II i I; prosečna aktivnost proMMP-9 u tumorskom tkivu bolesnica u kliničkom stadijumu II je statistički značajno veća u poredjenju sa obolelim u kliničkom stadijumu I ( $229.2 \pm 58.54$  vs.  $157.1 \pm 38.83$ ,  $p < 0.0001$ ,  $229.2 \pm 58.54$  vs.  $99.31 \pm 55.34$ ,  $p < 0.0001$ ,  $164.4 \pm 31.61$  vs.  $137.4 \pm 25.85$ ,  $p = 0.006$ , Mann Whitney test) (Slika 25). Analiza prosečne aMMP-9 aktivnosti pokazuje statistički značajno veću aktivnost aMMP-9 u tumorskom tkivu pacijentkinja u kliničkom stadijumu III u poredjenju sa bolesnicama u kliničkom stadijumu II, dok obe grupe bolesnica pokazuju značajno veću aktivnost u poredjenju sa bolesnicama sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu I ( $229.2 \pm 58.54$  vs.  $99.31 \pm 55.34$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.001$ , Mann Whitney test) (Slika 25). Iz ovoga se može zaključiti da aktivnost MMP-2 i MMP-9 raste uporedo sa progresijom stadijuma bolesti, odnosno da MMP-2 i MMP-9 zaista mogu biti korišćeni kao tumor markeri u praćenju bolesnica sa karcinomom dojke, kao i u njihovoj klasifikaciji u cilju određivanja hemioterapije.



**Slika 25.** Prosečna aktivnost ProMMP-2, aMMP-2, ProMMP-9 i aMMP-9 zavisno od kliničkog stadijuma bolesti (\*\* $p \leq 0.01$ , ## $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za aktivnosti želatinaza pacijentkinja u kliničkim stadijumima I, II i III.

U Tabeli 7 prikazane su kliničke i patološke karakteristike pacijentkinja sa histopatološki potvrđenim karcinomom dojke u čijim tumorima su detektovane želatinaze. Sve pacijentkinje su klasifikovane po TNM i UICC klasifikaciji prema veličini tumora (T) kao pT1 ( $T < 20\text{mm}$ ,  $n=21$ ), pT2 ( $20\text{mm} < T < 50\text{mm}$ ,  $n=32$ ) i pT3 ( $T > 50\text{mm}$ ,  $n=7$ ). Takodje, pacijentkinje su po gore navedenoj klasifikaciji klasifikovane u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova (N) kao pN<sub>0</sub> (sa nezahvaćenim limfnim čvorovima,  $n=31$ ) i pN<sub>+</sub> (sa zahvaćenim limfnim čvorovima,  $n=29$ ). Pacijentkinje su klasifikovane po Blum-Ričardson klasifikaciji u odnosu na histološki gradus tumora (G) kao gradus I (G1,  $n=12$ ), gradus II (G2,  $n=35$ ) i gradus III (G3,  $n=13$ ).

Bolesnice su klasifikovane u odnosu na histološki tip tumora. Najzastupljeniji je bio invazivni duktalni karcinom ( $n=31$ ), zatim invazivni lobularni karcinom ( $n=26$ ) i mešani ili retki tumori (mucinozni, medularni i mešani,  $n=3$ ). Sve pacijentkinje sa karcinomom dojke su klasifikovane u odnosu na hormonski status kao pacijentkinje sa negativnim hormonskim steroidnim receptorima (ER-, PR-,  $n=8$ ) i sa pozitivnim hormonskim receptorima (ER+ ili PR+,  $n=52$ ). Od 60 pacijentkinja koje su analizirane u odnosu na

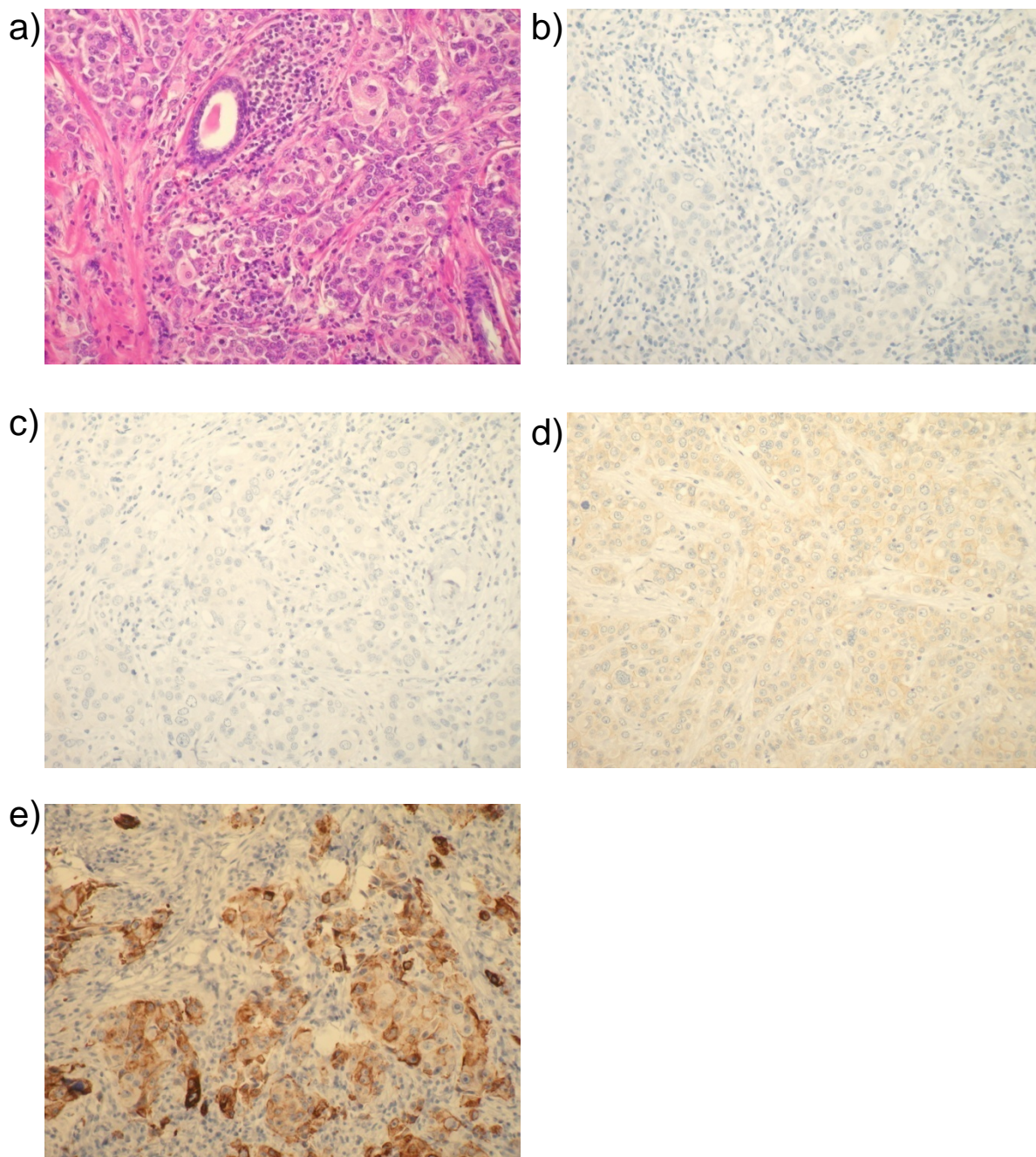
HER2 pozitivnost, 53 je bilo HER2 negativnih (HER2 0-nema prebojenosti membrane tumorskih ćelija ili HER2 1+- slabo nekompletno membransko bojenje u <10% tumorskih ćelija), dok je 7 pacijentkinja imalo HER2 pozitivne tumore (HER2 2+-više od 10% tumorskih ćelija pokazuje kontinuiranu prebojenost ćelijske membrane ili HER2 3+-kompletno intenzivno membransko bojenje u više od 30% tumorskih ćelija) (Tabela 7). Prema statusu receptora i novoj molekularnoj klasifikaciji karcinoma dojke, pacijentkinje su klasifikovane u sledeće grupe: grupa sa bazaloidnim tipom tumora (ER-, PR-, HER2-, CK5/6 pozitivne ili EGFR pozitivne, n=7), grupa sa tipom luminalnim A (ER+, PR+, HER2-, n=46), grupa sa tipom luminalnim B (ER+, PR+, HER2+, n=4) i sa HER2 tipom tumora (ER -, PR-, HER+, n=3).



**Tabela 7. Kliničko-patološke karakteristike pacijentkinja sa karcinomom dojke**

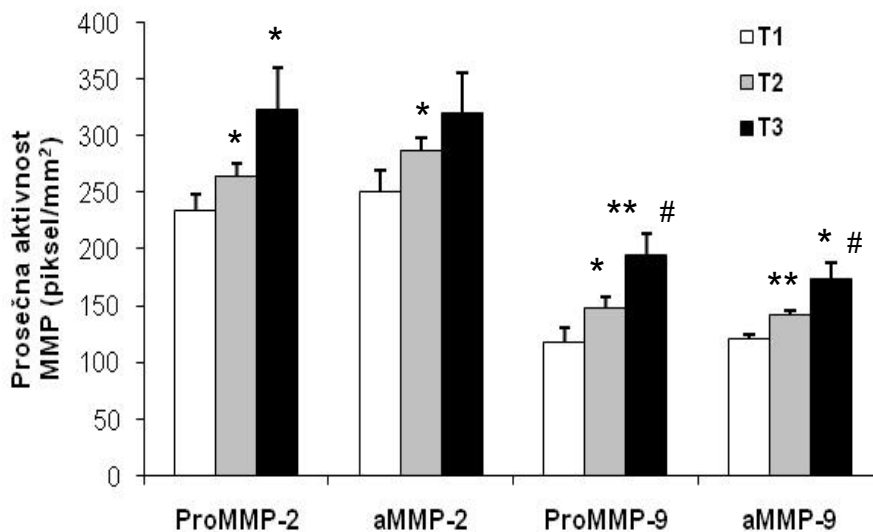
<b>Karakteristike</b>	<b>Pacijentkinje n (%)</b>
<b>Menopauzalni status</b>	
<b>Premenopauzalne</b>	12 (20%)
<b>Postmenopauzalne</b>	48 (80%)
<b>Histološki tip tumora</b>	
<b>Duktalni invazivni karcinom</b>	31 (51,66%)
<b>Lobularni karcinom</b>	26 (43,33%)
<b>Mešani ili retki</b>	3 (5%)
<b>Primarna veličina tumora</b>	
<b>T1</b>	21 (35%)
<b>T2</b>	32 (53,33%)
<b>T3</b>	7 (11,66%)
<b>Gradus tumora</b>	
<b>G1</b>	12 (20%)
<b>G2</b>	35 (58,33%)
<b>G3</b>	13 (21,66%)
<b>Zahvaćenost limfih čvorova</b>	
<b>Negativni</b>	31 (51,66%)
<b>Pozitivni</b>	29 (48,33%)
<b>HER2 status</b>	
<b>Negativni</b>	53 (85%)
<b>Pozitivni</b>	7 (15%)
<b>Status estrogenskih receptora</b>	
<b>Negativni</b>	10 (15%)
<b>Pozitivni</b>	50 (85%)
<b>Status progesteronskih receptora</b>	
<b>Negativni</b>	15 (21,66%)
<b>Pozitivni</b>	45 (78,33%)
<b>Molekularna klasifikacija</b>	
<b>Bazaloidni</b>	7 (11,66%)
<b>HER2 pozitivni tip</b>	3 (5%)
<b>Luminal A</b>	46 (76,66%)
<b>Luminal B</b>	4 (6,66%)

Na slici 26. prikazane su fotomikrografije tumorskih isečaka bazaloidnog tipa tumora jedne od ispitivanih pacijentkinja koje pokazuju tipične morfološke karakteristike bazaloidnog karcinoma dojke kao što su visoko gradusni duktalni karcinom (gradusa 3) udružen sa istaknutim agregatima limfocitima; citološki, prisutne su tumorske ćelije sa naznačenim nuklearnim polimorfizmom, upadljivom mitotskom aktivnošću i intenzivnom ekspresijom C5/6 na membranama tumorskih ćelija.



**Slika 26.** Prikazane su fotomikrografije tumorskih isečaka bazaloidnog tipa tumora jedne od ispitivanih pacijentkinja (uveličanje 20x). Vidi se a) visoko gradusni duktalni karcinom koji ima b) ER negativan c) PR negativan i d) HER2 negativan receptorski status, a koji pokazuje e) CK5/6 visoku pozitivnost receptora.

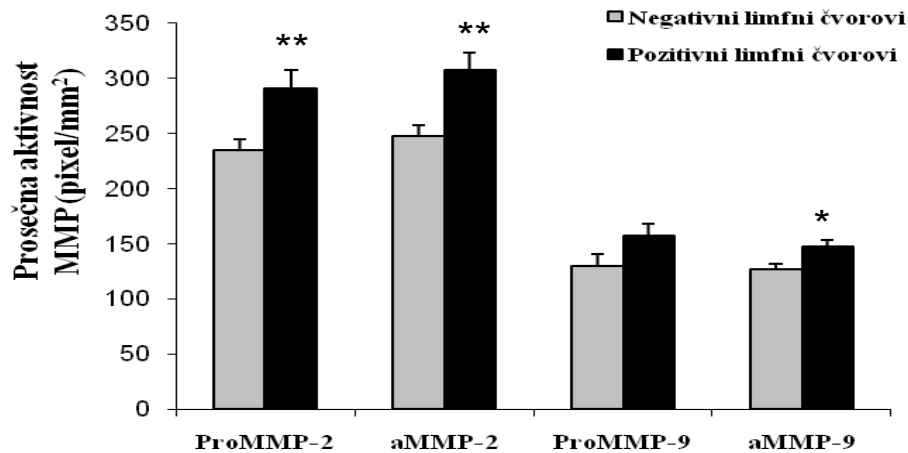
Analizirali smo aktivnost MMP-2 i MMP-9 u odnosu na veličinu tumora i zahvaćenost limfnih čvorova, obzirom da nema dovoljno literaturnih podataka o povezanosti želatinaza sa ovim parametrima. Analiza prosečne proMMP-2 aktivnosti pokazuje statistički značajno veću aktivnost proMMP-2 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa T2 tumorima u poredjenju sa bolesnicama sa T1 tumorima (T2 vs. T1  $p=0.039$ ; T3 vs. T1  $p=0.033$ ; T3 vs. T2  $p=0.18$ , Mann Whitney test). Iste rezultate pokazala je analiza aktivnosti aMMP-2 i veličine tumora (T2 vs. T1  $p=0.01$ ; T3 vs. T1  $p=0.07$ ; T3 vs. T2  $p=0.36$ , Mann Whitney test) (Slika 27). Pacijentkinje sa T3 tumorima imaju prosečno veću aktivnost proMMP-9 u poredjenju sa pacijentkinjama koje su imale T2 i T1 tumore (T2 vs. T1  $p=0.05$ ; T3 vs. T1  $p=0.006$ ; T3 vs. T2  $p=0.043$ , Mann Whitney test) (Slika 27). Takodje, veću prosečnu aktivnost aMMP-9 imaju T3 tumori u poredjenju sa T2 i T1 grupama pacijentkinja (T2 vs. T1  $p=0.002$ ; T3 vs. T1  $p=0.031$ ; T3 vs. T2  $p=0.05$ , Mann Whitney test) (Slika 27).



**Slika 27.** Aktivnost proMMP-2, aMMP-2, proMMP-9 i aMMP-9 kod pacijentkinja sa T1, T2 i T3 veličinom tumora (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , # $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za aktivnosti želatinaza sve tri grupe pacijentkinja.

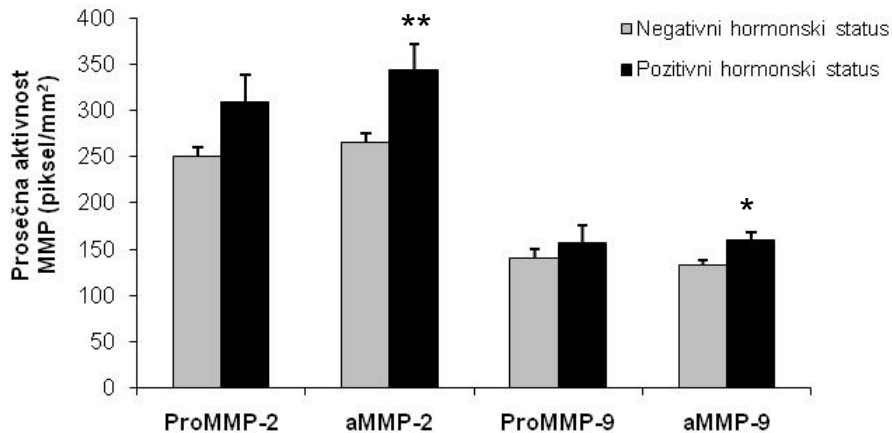
Pokazali smo da pacijentkinje sa zahvaćenim limfnim čvorovima ( $N_+$ ) imaju statistički značajno prosečno veću aktivnost proMMP-2 i aMMP-2 u tumorima (Slika 28) u

poredjenju sa grupom pacijentkinja sa nezahvaćenim limfnim čvorovima ( $p=0.005$ ,  $p=0.007$ , Mann Whitney test). Nismo našli značajnu razliku u aktivnosti proMMP-9 izmedju grupe pacijentkinja sa zahvaćenim aksilarnim limfnim čvorovima i grupe sa nezahvaćenim limfnim čvorovima ( $p=0.1$ , Mann Whitney test). Aktivnost aMMP-9 u tumorskom tkivu je bila statistički značajno prosečno veća u grupi pacijentkinja sa zahvaćenim aksilarnim limfnim čvorovima u poredjenju sa grupom pacijentkinja sa nezahvaćenim limfnim čvorovima ( $p=0.013$ , Mann Whitney test) (Slika 28).



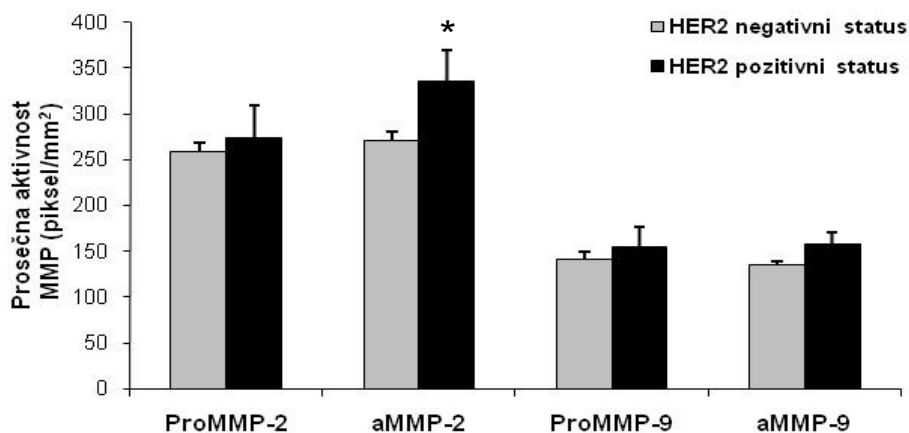
**Slika 28.** Aktivnost proMMP-2, aMMP-2, proMMP-9 i aMMP-9 kod pacijentkinja sa tumorom infiltrisanim i neinfiltrisanim limfnim čvorovima (\*\* $p \leq 0.01$ , \* $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za aktivnosti želatinaza obe grupe pacijentkinja.

Obzirom da status receptora za estrogen i progesteron, kao i HER2 ekspresija u tumorskom tkivu imaju važnu ulogu u terapiji karcinoma dojke, analizirali smo aktivnost MMP-2 i MMP-9 u odnosu na ekspresiju ovih receptora u tumorskim tkivima. Pokazali smo da nema statistički značajne razlike u aktivnosti proMMP-2 i proMMP-9 izmedju grupe pacijentkinja sa pozitivnim hormonskim receptorima i negativnim hormonskim receptorima ( $p=0.074$ ,  $p=0.57$ , Mann Whitney test) (Slika 28). U ovom istraživanju smo pokazali da pacijentkinje sa tumorima sa negativnim hormonskim receptorima imaju statistički značajno veće prosečne aktivnosti aMMP-2 i aMMP-9 ( $p=0.007$ ,  $p=0.013$ , Mann Whitney test) (Slika 29).



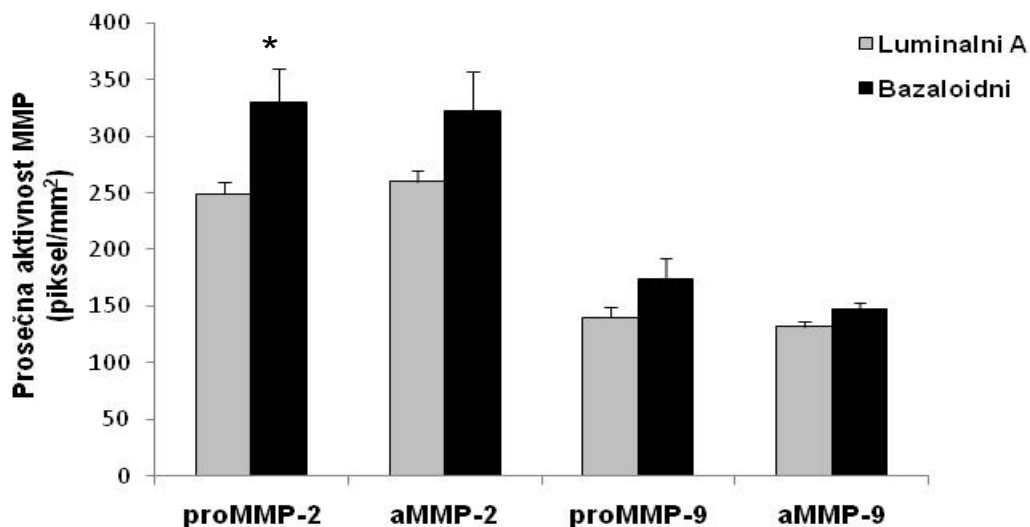
**Slika 29.** Aktivnost proMMP-2, aMMP-2, proMMP-9 i aMMP-9 kod pacijentkinja sa pozitivnim i negativnim steroidnim hormonskim statusom (\*\* $p \leq 0.01$ , \* $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za aktivnosti želatinaza obe grupe pacijentkinja.

Mann Whitney test pokazao je da nema statistički značajne razlike u aktivnosti proMMP-2 ( $p=0.319$ ) i proMMP-9 ( $p=0.912$ ) u odnosu na HER2 ekspresiju u tumorskim tkivima, kao ni razlike u aktivnosti aMMP-9 u odnosu na HER2 pozitivnost pacijentkinja sa karcinomom dojke ( $p=0.31$ ) (Slika 30). Ipak, pokazali smo da pacijentkinje sa HER2 negativnim tumorima imaju statistički značajno veću prosečnu aktivnost aMMP-2 u tumorima u poredjenju sa HER2 pozitivnim pacijentkinjama ( $p=0.035$ , Mann Whitney test) (Slika 30).



**Slika 30.** Aktivnost proMMP-2, aMMP-2, proMMP-9 i aMMP-9 kod pacijentkinja sa pozitivnim i negativnim HER2 statusom (\* $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za aktivnosti želatinaza obe grupe pacijentkinja.

U ovoj studiji pokazali smo da pacijentkinje sa bazaloidnim tumorima imaju značajno veću prosečnu aktivnost proMMP-2 u odnosu na pacijentkinje sa luminalnim A tumorima ( $p=0.015$ , Mann Whitney test) (Slika 31). Sa druge strane, nije bilo razlike u prosečnoj aktivnosti aMMP-2 ( $p=0.07$ ) između pacijentkinja sa bazaloidnim tumorima u odnosu na one sa luminalnim A tumorima, kao ni razlike u prosečnoj aktivnosti ProMMP-9 ( $p=0.21$ ) i aMMP-9 ( $p=0.11$ ) između gore navedenih grupa pacijentkinja prema Mann Whitney testu (Slika 31).



**Slika 31.** Aktivnost proMMP-2, aMMP-2, proMMP-9 i aMMP-9 kod pacijentkinja sa luminalnim A i bazaloidnim tumorima (\* $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za aktivnosti želatinaza obe grupe pacijentkinja.

Analizirali smo aktivnost želatinaza u peritumorskom tkivu u odnosu na status receptora u tumorskom tkivu i pokazali da okolna tkiva pacijentkinja sa negativnim hormonskim receptorima imaju značajno veću prosečnu aktivnost latentne forme MMP-2 i MMP-9 u poredjenju sa pacijentkinjama sa pozitivnim hormonskim receptorima ( $p=0.05$ ,  $p=0.009$ , Mann Whitney test) (Tabela 8). Takodje, veće prosečne aktivnosti aMMP-2 i aMMP-9 u peritumorskom tkivu imale su pacijentkinje sa negativnim hormonskim receptorima u odnosu na pacijentkinje sa pozitivnim hormonskim receptorima ( $p=0.02$ ,  $p=0.003$ , Mann Whitney test). U tom smislu, našli smo značajno višu prosečnu aktivnost aMMP-2 u peritumorskom tkivu kod pacijentkinja sa bazaloidnim tumorima u poredjenju sa pacijentkinjama sa luminalnim A tumorima ( $p=0.04$ , Mann Whitney test) (Tabela 8). Ipak, nije bilo značajne razlike u aktivnosti proMMP-2, proMMP-9 i aMMP-9 u peritumorskom tkivu izmedju pacijentkinja sa bazaloidnim i luminalnim A tumorima ( $p=0.12$ ,  $p=0.16$ ,  $p=0.07$ , Mann Whitney test) (Tabela 8).



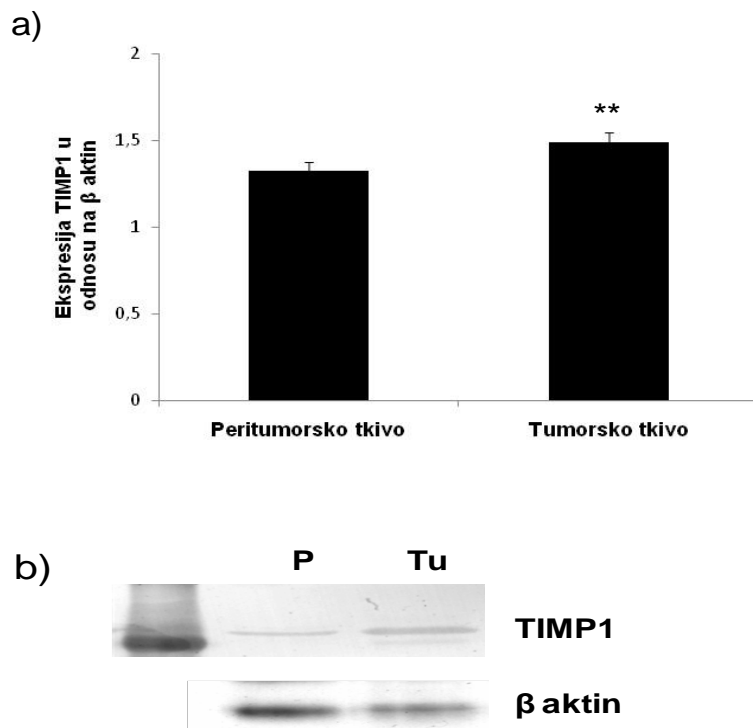
Tabela 8. Aktivnost MMP-2 i MMP-9 u okolnom tkivu u odnosu na status receptora u tumoru

Karakteristike	Aktivnost MMP-2 i MMP-9 u okolnom tkivu (piksel/mm <sup>2</sup> )							
	proMMP-2	p	aMMP-2	p	proMMP-9	p	aMMP-9	p
<b>Molekularna klasifikacija</b>								
<b>Bazaloidni tip</b>	215.4		267.6		196.4		127.7	
<b>Luminal A tip</b>	183.4	0.12	213.7	0.04*	161.8	0.16	107.3	0.07
<b>Status hormonskih receptora</b>								
<b>Negativni</b>	226.1		263.4		225.5		136.7	
<b>Pozitivni</b>	184.5	0.05*	215.8	0.02*	165.4	0.009**	107.6	0.003**

#### 4.4. Ekspresija TIMP1 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke

##### 4.4.1. Ekspresija TIMP1 u tumorskom i peritumorskom tkivu

Ispitali smo ekspresiju TIMP-1 proteina u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke i detektovali TIMP1 u 92% slučajeva metodom Imunoblota. Ekspresija proteina TIMP1 je analizirana u odnosu na ekspresiju  $\beta$  aktina (kontrola). Detaljna analiza ekspresije TIMP-1 pokazala je statistički značajno veću ekspresiju TIMP1 u tumorskom tkivu u odnosu na peritumorsko tkivo bolesnica sa karcinomom dojke ( $1,49 \pm 0,05$  vs.  $1,32 \pm 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ , Wilcoxon test) (Slika 32). Na slici 32 su prikazani reprezentativni Western blot rezultati na kojima se vidi veća ekspresija TIMP1 u tumorskom tkivu u odnosu na peritumorsko tkivo bolesnica.

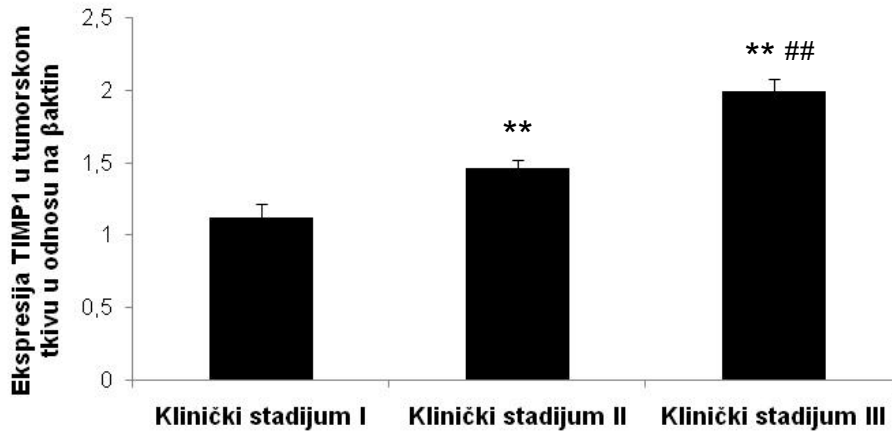


**Slika 32.** a) Prosečna ekspresija TIMP1 u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na  $\beta$  aktin (\*\* $p \leq 0.01$ , Wilcoxon rank test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za tumorsko i peritumorsko tkivo. b) Reprerentativni rezultati imunoblota na kojima se vidi traka koja odgovara TIMP1 u tumorskom (Tu) i peritumorskom (P) tkivu.

#### ***4.4.2. Ekspresija TIMP1 u odnosu kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke***

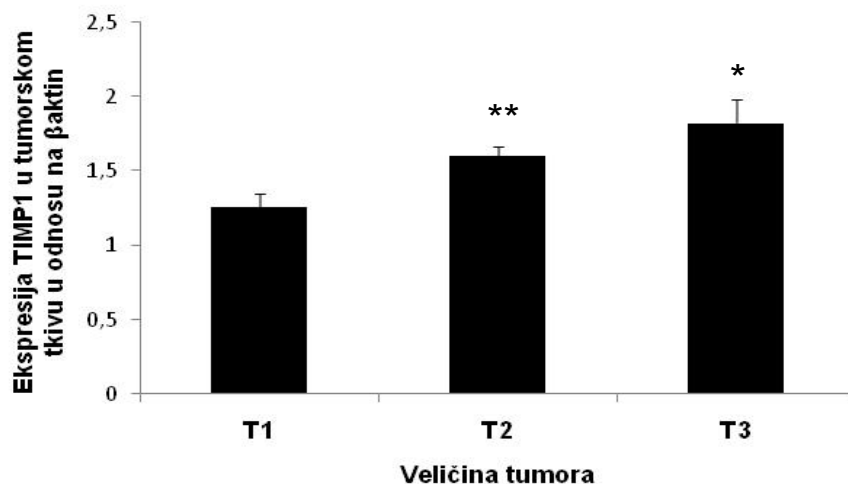
Obzirom da se ekspresija TIMP1 proteina ispituje kao prediktivni parametar i marker stažiranja bolesti, analizirali smo ekspresiju TIMP1 u odnosu na klinički stadijum bolesti. Mann Whitney test je pokazao statistički značajno ( $p \leq 0.01$ ) veću prosečnu ekspresiju TIMP1 u tumorskom tkivu kod bolesnica sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu III ( $1.99 \pm 0.09$ ) u poredjenju sa bolesnicama u kliničkom stadijumu II ( $1.46 \pm 0.05$ ), dok obe

grupe bolesnica pokazuju značajno veći nivo u poredjenju sa bolesnicama sa karcinom dojke u kliničkom stadijumu I ( $1.12 \pm 0.09$ ) ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test). Na slici 33 prikayan je histogram na kome se vidi povećanje ekspresije TIMP1 u tumorskom tkivu uporedo sa progresijom stadijuma bolesti.



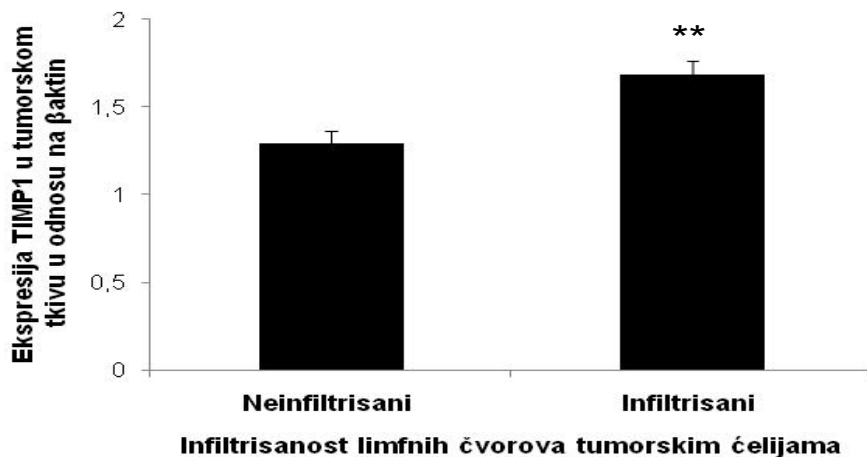
**Slika 33.** Prosečna ekspresija TIMP1 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na  $\beta$  aktin zavisno od kliničkog stadijuma bolesti (\*\* $p \leq 0.01$ , ##  $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije TIMP1 za pacijentkinje u kliničkom stadijumu I, II i III.

Analizirali smo ekspresiju TIMP1 u tumorskom tkivu u odnosu na veličinu tumora i zahvaćenost limfnih čvorova, obzirom da veličina tumora i zahvaćenost limfnih čvorova predstavljaju važne prognostičke parametre za bolesnice sa karcinomom dojke. Analiza ekspresije TIMP1 pokazuje statistički značajno veću ekspresiju TIMP1 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa T3 tumorima ( $1.82 \pm 0.16$ ) u poredjenju sa bolesnicama sa T1 tumorima ( $1.25 \pm 0.09$ ) ( $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test). Pacijentkinje sa T2 tumorima ( $1.6 \pm 0.06$ ) imaju prosečno veću ekspresiju TIMP1 u poredjenju sa pacijentkinjama koje su imale T1 tumore ( $1.25 \pm 0.09$ ) ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test) (Slika 34). Mann Whitney testom je pokazano da nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji TIMP1 proteina izmedju pacijentkinja sa T3 ( $1.82 \pm 0.16$ ) i T2 ( $1.6 \pm 0.06$ ) tumorima ( $p > 0.05$ ).



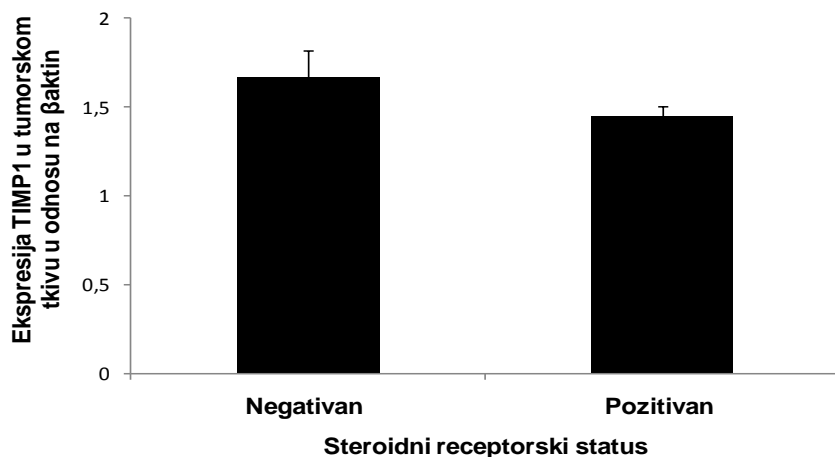
**Slika 34.** Ekspresija TIMP1 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke sa T1, T2 i T3 veličinom tumora u odnosu na  $\beta$  aktin (\*\* $p \leq 0.01$ , \* $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije TIMP1 za sve tri grupe pacijentkinja.

Pored toga, ekspresija TIMP1 u tumorskom tkivu je bila statistički značajno ( $p < 0.01$ , Mann Whitney test) prosečno veća u grupi pacijentkinja sa infiltrisanim aksilarnim limfnim čvorovima ( $1.68 \pm 0.08$ ) u poredjenju sa grupom pacijentkinja sa neinfiltrisanim limfnim čvorovima ( $1.29 \pm 0.07$ ) (Slika 35).



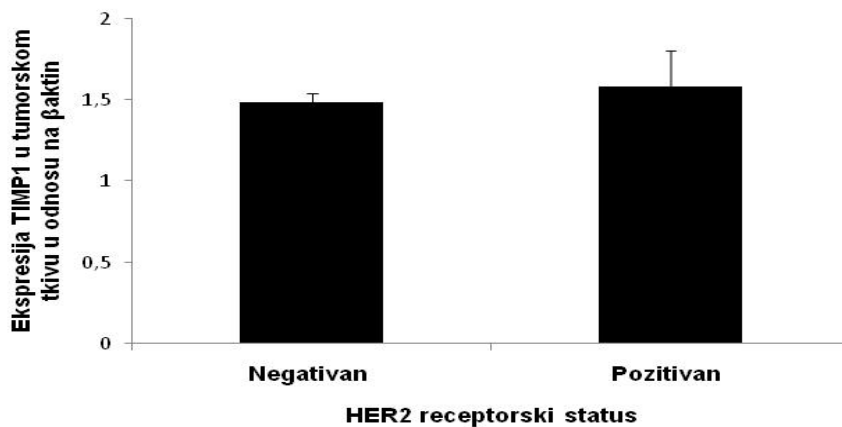
**Slika 35.** Ekspresija TIMP1 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa tumorom infiltrisanim i neinfiltrisanim limfnim čvorovima u odnosu na  $\beta$  aktin (\*\* $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije TIMP1 za obe grupe pacijentkinja.

Obzirom da steroidni hormoni (estrogen i progesteron) i HER2 predstavljaju faktore rasta za ćelije karcinoma dojke, analizirali smo ekspresiju TIMP1 u tumorskom tkivu u odnosu na ekspresiju receptora za estrogen, progesteron i HER2 u tumorima. Pokazali smo da nema statistički značajne razlike u ekspresiji TIMP1 između grupe pacijentkinja sa pozitivnim ( $1.44 \pm 0.06$ ) hormonskim receptorima i negativnim ( $1.67 \pm 0.15$ ) hormonskim receptorima ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test) (Slika 36).



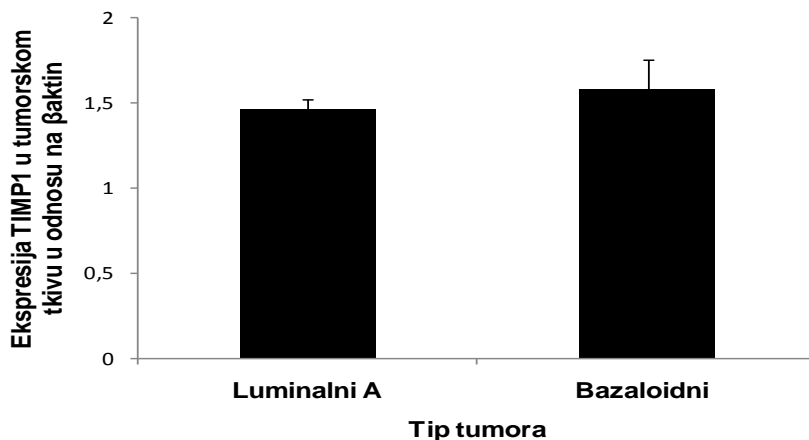
**Slika 36.** Ekspresija TIMP1 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa negativnim i pozitivnim steroidnim receptorskim statusom u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije TIMP1 za obe grupe pacijentkinja.

Slično hormonskim receptorima, analiza ekspresije TIMP1 u odnosu na HER2 receptorski status, pokazala je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji TIMP1 između grupe pacijentkinja sa pozitivnim HER2 receptorima ( $1.58 \pm 0.21$ ) i negativnim HER2 receptorima ( $1.49 \pm 0.05$ ) ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test) (Slika 37).



**Slika 37.** Ekspresija TIMP1 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa negativnim i pozitivnim HER2 receptorskim statusom u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije TIMP1 za obe grupe pacijentkinja.

U novije vreme se sve više ispituje bazaloidni tip karcinoma dojki kao najinvazivniji i tip sa najlošijom prognozom. Iz tih razloga ispitivali smo ekspresiju TIMP1 proteina, antiapoptotskog molekula kod pacijentkinja sa bazaloidnim tipom tumora u odnosu na luminalni A tip i pokazali da nije bilo razlike u ekspresiji TIMP1 ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test) izmedju pacijentkinja sa bazaloidnim tumorima ( $1.58 \pm 0.17$ ) u odnosu na pacijentkinje sa luminalnim A tumorima ( $1.46 \pm 0.06$ ) (Slika 38).



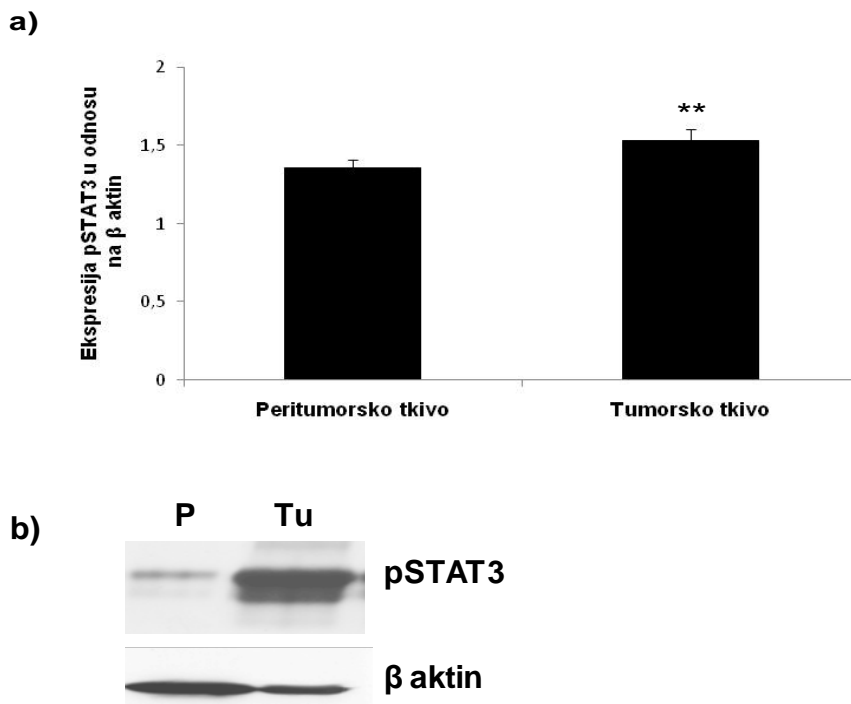
**Slika 38.** Ekspresija TIMP1 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa luminalnim A i bazaloidnim tipom karcinoma dojke u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za obe grupe pacijentkinja sa karcinomom dojke.

#### **4.5. Ekspresija pSTAT3 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke**

##### ***4.5.1. Ekspresija pSTAT u tumorskom i peritumorskom tkivu***

Ispitali smo ekspresiju pSTAT3 proteina u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke. U našem istraživanju pSTAT3 je detektovan u 89% tumorskih tkiva pacijentkinja. Ekspresija proteina pSTAT3 prikazana je kao odnos između ekspresije pSTAT3 i ekspresije  $\beta$  aktina, kao kontrole. Detaljna analiza srednjih vrednosti sa standardnom greškom pokazala je statistički značajno veću ekspresiju pSTAT3 u tumorskom tkivu u odnosu na peritumorsko tkivo bolesnica sa karcinomom dojke ( $1,53 \pm 0.07$  vs.  $1,35 \pm 0.06$ ,  $p \leq 0.01$ , Wilcoxon test) (Slika 39). Na slici 39a su prikazani reprezentativni Western blot rezultati na kojima se vidi veća ekspresija pSTAT3 u tumorskom tkivu u odnosu na peritumorsko tkivo bolesnica.



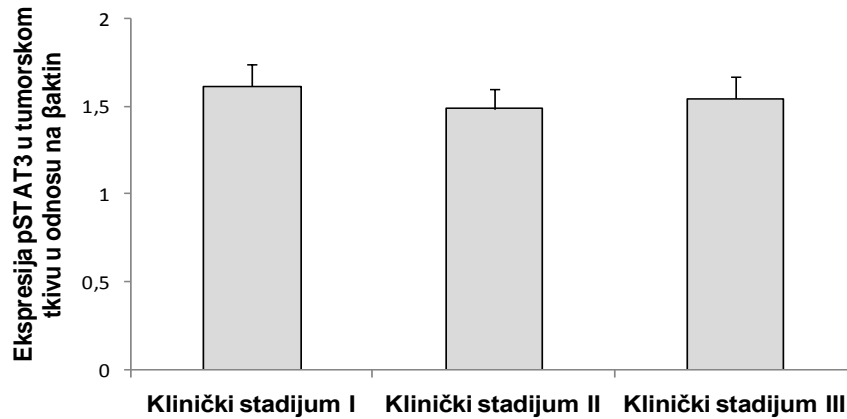


**Slika 39.** a) Prosečna ekspresija pSTAT3 u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na  $\beta$  aktin (\*\* $p \leq 0.01$ , Wilcoxon rank test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije pSTAT3 za tumorsko i peritumorsko tkivo. b) Reprerzentativni rezultati imunoblot ekspresije pSTAT3 u tumorskom (Tu) i peritumorskom (P) tkivu.

#### ***4.5.2. Ekspresija pSTAT3 u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke***

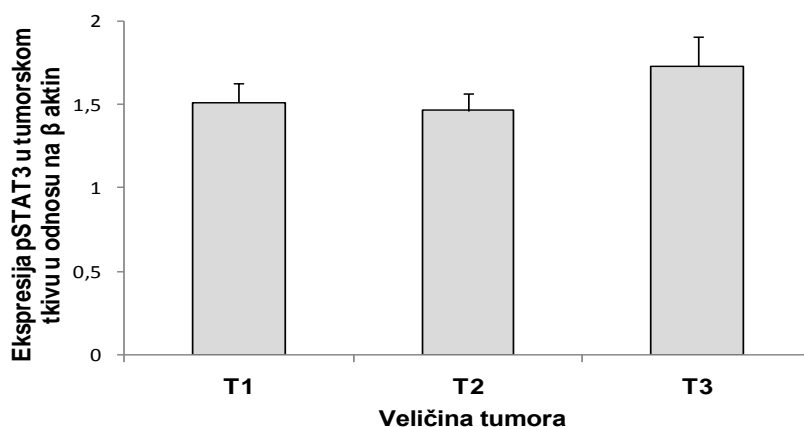
Obzirom da se ekspresija pSTAT3 proteina ispituje kao prediktivni parametar kod pacijentkinja sa karcinomom dojke, analizirali smo ekspresiju pSTAT3 u odnosu na klinički stadijum bolesti. Mann Whitney test je pokazao da nije bilo razlike u ekspresiji pSTAT3 u tumorskom tkivu kod bolesnica sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu III ( $1.55 \pm 0.12$ ) u poredjenju sa bolesnicama u kliničkom stadijumu II ( $1.49 \pm 0.11$ ), kao ni

između navedene dve grupe bolesnica u poredjenju sa bolesnicama sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu I ( $1.62 \pm 0.12$ ), kao što je pokazano na slici 40 ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test).



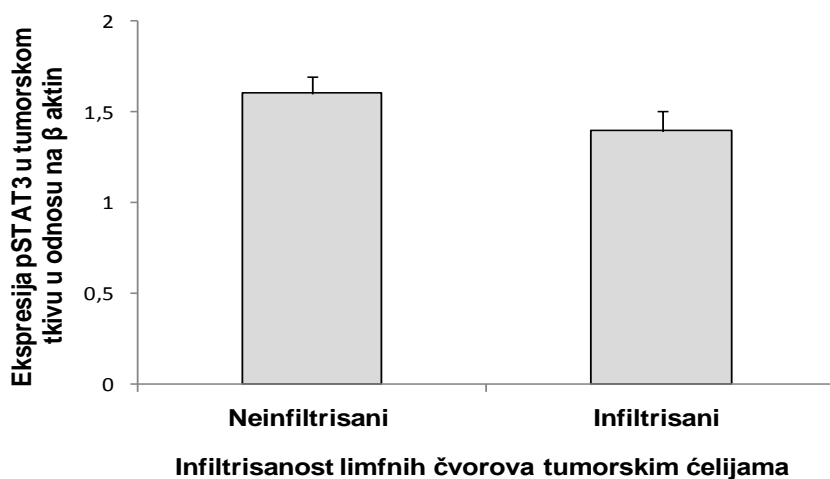
**Slika 40.** Ekspresija pSTAT3 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na  $\beta$  aktin u različitim kliničkim stadijumima bolesti ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije pSTAT3 za pacijentkinje u I, II i III kliničkom stadijumu.

Analizirali smo ekspresiju pSTAT3 u tumorskom tkivu u odnosu na veličinu tumora i zahvaćenost limfnih čvorova, obzirom da veličina tumora i zahvaćenost limfnih čvorova predstavljaju važne prognostičke parametre za bolesnice sa karcinomom dojke. Analiza ekspresije pSTAT3 pokazala je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji pSTAT3 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa T3 tumorima ( $1.73 \pm 0.18$ ) u poredjenju sa bolesnicama sa T1 ( $1.51 \pm 0.11$ ) i T2 ( $1.46 \pm 0.10$ ) tumorima ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test) (Slika 40). Mann Whitney test je pokazao da nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji pSTAT3 proteina između pacijentkinja sa T2 ( $1.46 \pm 0.10$ ) i T1 ( $1.51 \pm 0.11$ ) tumorima ( $p > 0.05$ ) (Slika 41).



**Slika 41.** Ekspresija pSTAT3 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke sa T1, T2 i T3 veličinom tumora u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije pSTAT3 za sve tri grupe pacijentkinja.

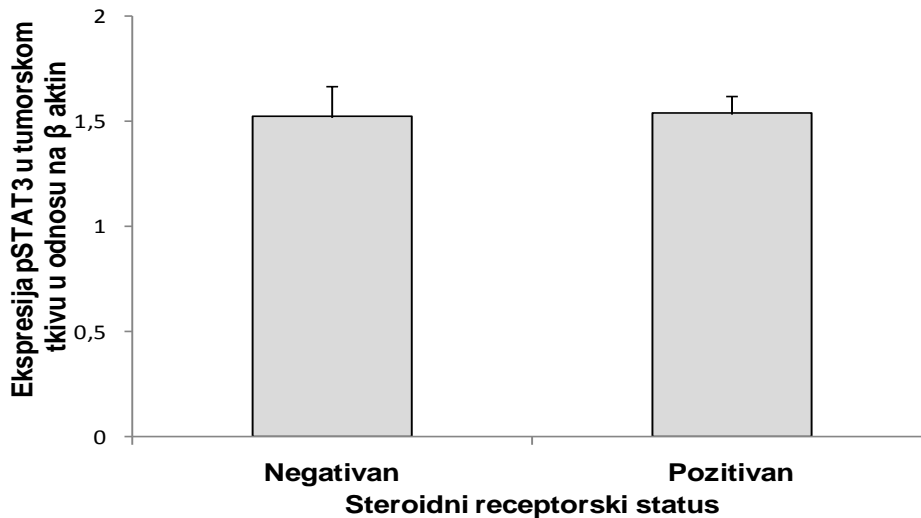
Pored toga, nije bilo statistički značajne razlike ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test) u ekspresiji pSTAT3 u tumorskom tkivu između pacijentkinja sa aksilarnim limfnim čvorovima infiltrisanim tumorskim ćelijama ( $1.40 \pm 0.11$ ) u poređenju sa grupom pacijentkinja sa neinfiltisanim limfnim čvorovima ( $1.6 \pm 0.09$ ) (Slika 42).



**Slika 42.** Ekspresija pSTAT3 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa tumorom infiltrisanim i neinfiltisanim limfnim čvorovima u odnosu na  $\beta$  aktin

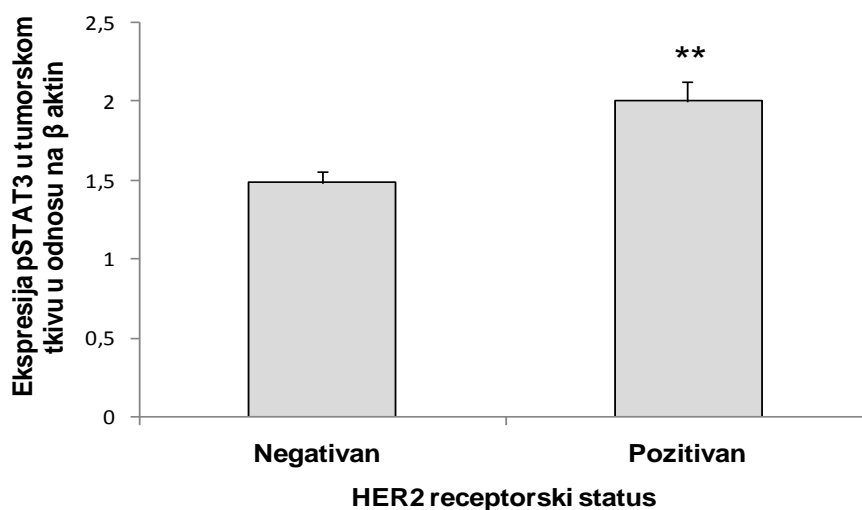
( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije pSTAT3 za obe grupe pacijentkinja.

Analizirali smo ekspresiju pSTAT3 u tumorskom tkivu u odnosu na ekspresiju receptora za estrogen, progesteron i HER2 u tumorima. Pokazali smo da nema statistički značajne razlike u ekspresiji pSTAT3 izmedju grupe pacijentkinja sa pozitivnim hormonskim receptorima ( $1.53 \pm 0.08$ ) i negativnim hormonskim receptorima ( $1.52 \pm 0.15$ ) ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test) (Slika 43).



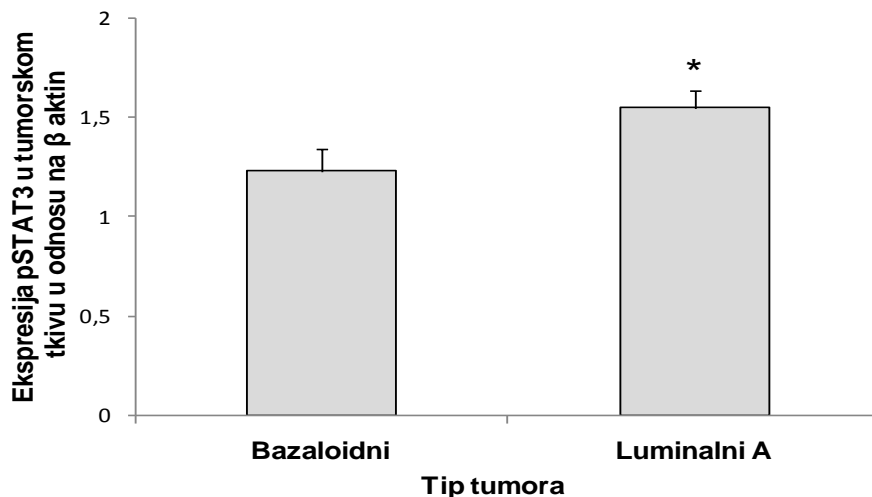
**Slika 43.** Ekspresija pSTAT3 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa negativnim i pozitivnim steroidnim receptorskim statusom u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije pSTAT3 za obe grupe pacijentkinja.

Nasuprot hormonskim receptorima, analiza ekspresije pSTAT3 u odnosu na HER2 receptorski status pokazala je da su prosečno veću ekspresiju pSTAT3 imale pacijentkinja sa pozitivnim HER2 receptorima ( $2.0 \pm 0.13$ ) u odnosu na pacijentkinje sa negativnim HER2 receptorima ( $1.48 \pm 0.07$ ) ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test) (Slika 44).



**Slika 44.** Ekspresija pSTAT3 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa negativnim i pozitivnim HER2 receptorskim statusom u odnosu na  $\beta$  aktin (\*\* $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije pSTAT3 za obe grupe pacijentkinja.

U novije vreme se sve više ispituje bazaloidni tip karcinoma dojki kao najinvazivniji i tip sa najlošijom prognozom. Iz tih razloga ispitivali smo ekspresiju pSTAT3 proteina, antiapoptotskog molekula kod pacijentkinja sa bazaloidnim tipom tumora u odnosu na luminalni A tip i pokazali da pacijentkinje sa luminalnim A ( $1.55 \pm 0.08$ ) tumorima imaju statistički značajno veću ekspresiju pSTAT3 ( $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test) u tumorskom tkivu u poredjenju sa pacijentkinjama sa bazaloidnim tumorima ( $1.23 \pm 0.11$ ) (Slika 45).

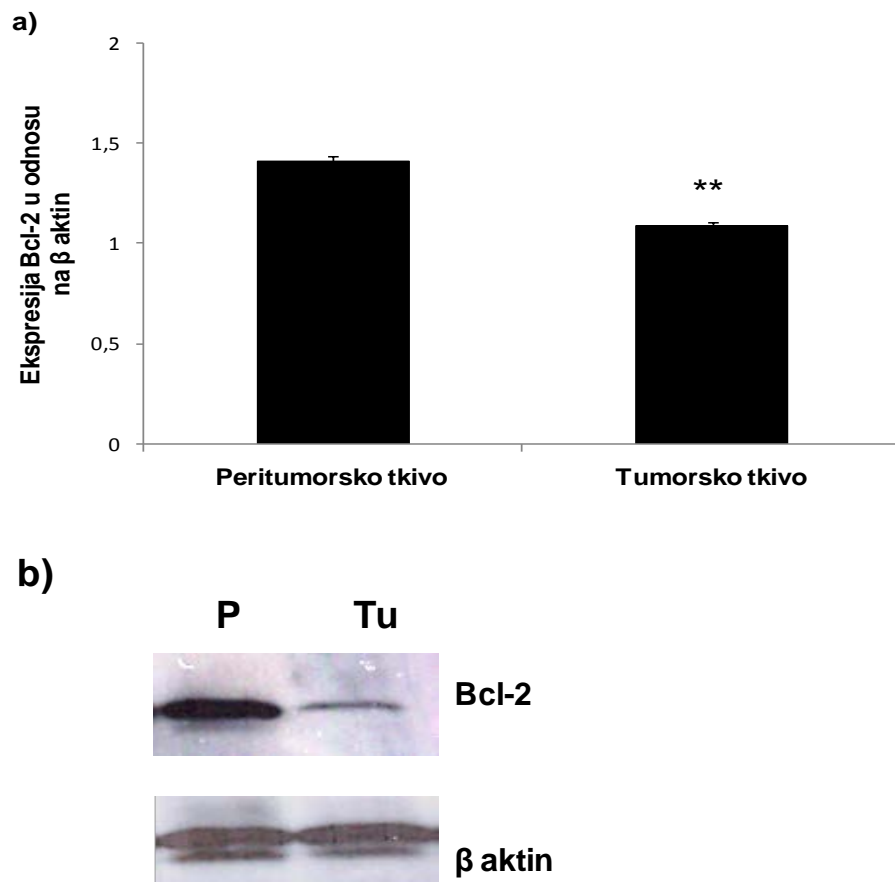


**Slika 45.** Ekspresija pSTAT3 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa luminalnim A i bazaloidnim tipom karcinoma dojke u odnosu na  $\beta$  aktin (\* $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije pSTAT3 za obe grupe pacijentkinja.

#### 4.6. Ekspresija Bcl-2 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke

##### 4.6.1. Ekspresija Bcl-2 u tumorskom i peritumorskom tkivu

Bcl-2 ima značajnu ulogu u patogenezi kancera dojke, kao i u procesu apoptoze, zbog čega smo ispitivali ekspresiju Bcl-2 proteina u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke. Ekspresija proteina Bcl-2 prikazana je kao odnos između ekspresije Bcl-2 i ekspresije  $\beta$  aktina, kao kontrole. U našem istraživanju Bcl-2 je detektovan u 90% slučajeva metodom Imunoblota. Detaljna analiza ekspresije Bcl-2 pokazala je statistički značajno veću ekspresiju Bcl-2 u peritumorskom tkivu ( $1.41 \pm 0.02$ ) u odnosu na tumorsko tkivo ( $1.09 \pm 0.02$ ) pacijentkinja sa karcinomom dojke ( $p \leq 0.01$ , Wilcoxon test) (Slika 46). Na slici 46 b su prikazani reprezentativni imunoblot rezultati na kojima se vidi veća ekspresija Bcl-2 u peritumorskom tkivu u odnosu na tumorsko tkivo bolesnica.

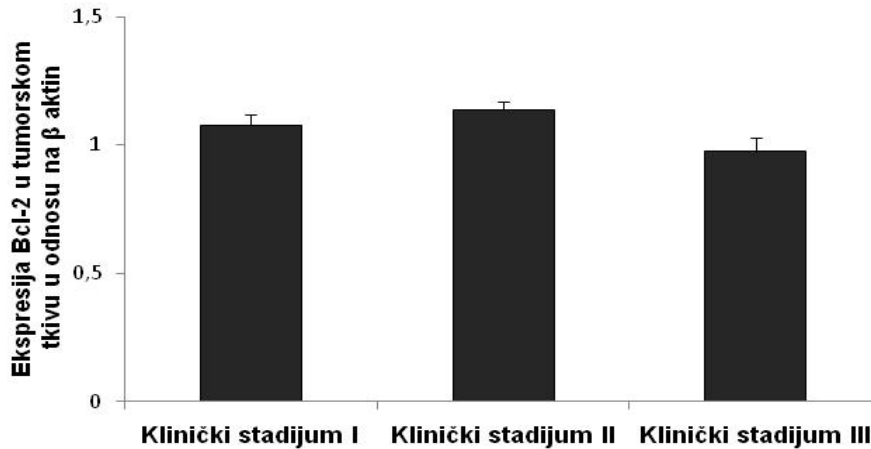


**Slika 46. a)** Prosečna ekspresija Bcl-2 u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na  $\beta$  aktin (\*\* $p \leq 0.01$ , Wilcoxon rank test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije Bcl-2. **b)** Reprerzentativni rezultati imunoblot ekspresije Bcl-2 za tumorsko i peritumorsko tkivo.

#### ***4.6.2. Ekspresija Bcl-2 u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke***

Obzirom da se ekspresija Bcl-2 proteina ispituje kao marker dobre prognoze kod pacijentkinja sa karcinomom dojke, analizirali smo ekspresiju Bcl-2 u odnosu na klinički stadijum bolesti. Rezultati su pokazali da nije bilo razlike u ekspresiju Bcl-2 u

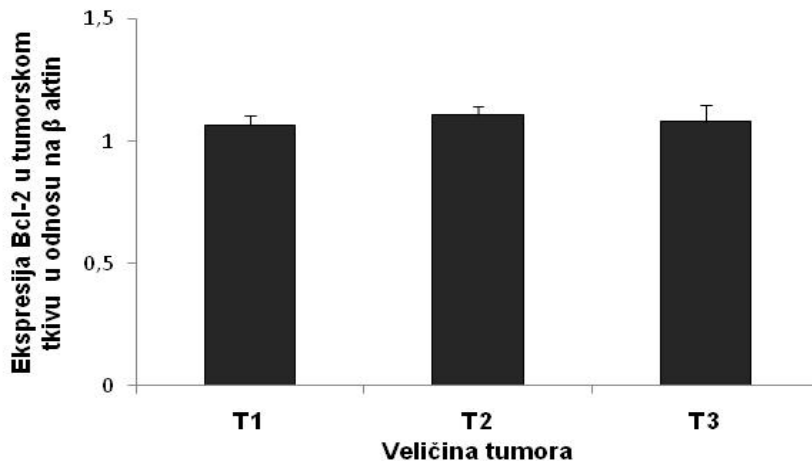
tumorskom tkivu kod bolesnica sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu III ( $0.97 \pm 0.05$ ) u poredjenju sa bolesnicama u kliničkom stadijumu II ( $1.14 \pm 0.03$ ), kao ni izmedju navedene dve grupe bolesnica u poredjenju sa bolesnicama sa karcinomom dojke u kliničkom stadijumu I ( $1.07 \pm 0.04$ ), kao što je pokazano na slici 47 ( $p > 0.05$ , Welch test).



**Slika 47.** Ekspresija Bcl-2 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na  $\beta$  aktin u različitim kliničkim stadijumima bolesti ( $p > 0.05$ , Welch test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije Bcl-2 za pacijentkinje u I, II i III kliničkom stadijumu.

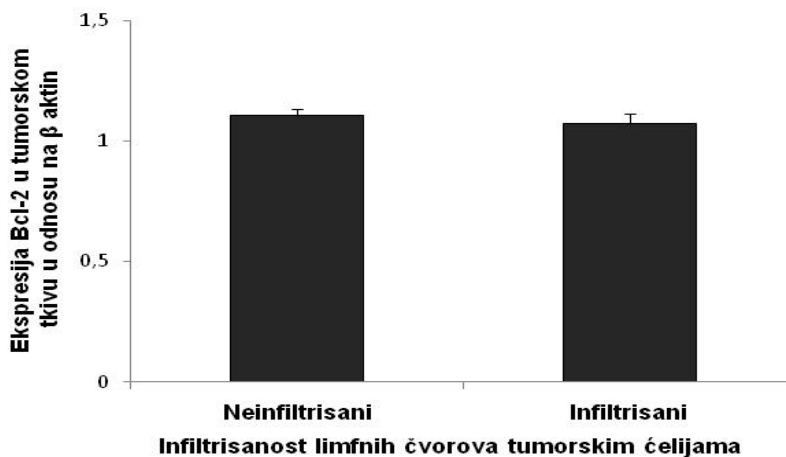
Analizirali smo ekspresiju Bcl-2 u tumorskom tkivu u odnosu na veličinu tumora i zahvaćenost limfnih čvorova, obzirom da veličina tumora i zahvaćenost limfnih čvorova predstavljaju važne prognostičke parametre za pacijentkinje sa karcinomom dojke. Analiza ekspresije Bcl-2 pokazala je da nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji Bcl-2 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa T3 tumorima ( $1.08 \pm 0.07$ ) u poredjenju sa bolesnicama sa T1 ( $1.06 \pm 0.03$ ) i T2 ( $1.1 \pm 0.03$ ) tumorima ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test) (Slika 48). Mann Whitney test je pokazao da nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji Bcl-2 proteina izmedju pacijentkinja sa T2 i sa T1 tumorima ( $p > 0.05$ ).





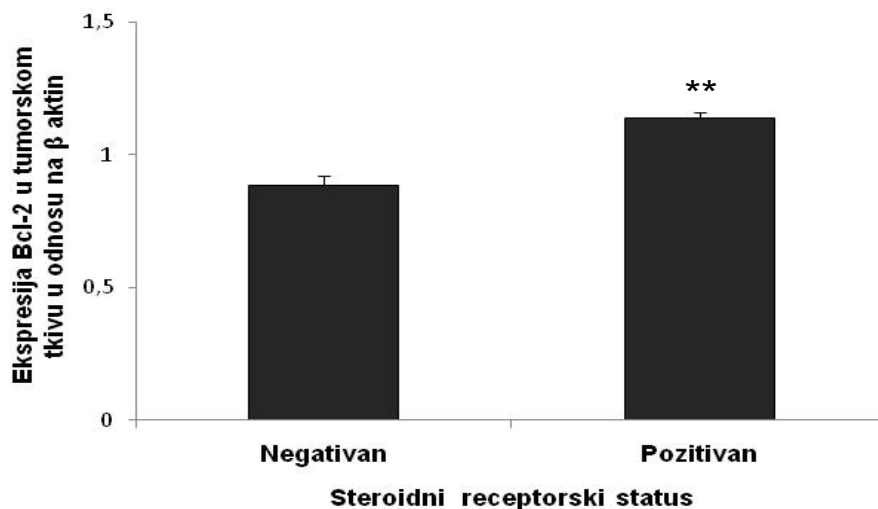
**Slika 48.** Ekspresija Bcl-2 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke sa T1, T2 i T3 veličinom tumora u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za svaku grupu pacijentkinja.

Pored toga, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresija Bcl-2 u tumorskom tkivu je bila ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test) između pacijentkinja sa aksilarnim limfnim čvorovima infiltrisanim tumorskim ćelijama ( $1.07 \pm 0.04$ ) u poredjenju sa grupom pacijentkinja sa neinfiltisanim limfnim čvorovima ( $1.1 \pm 0.03$ ) (Slika 49).



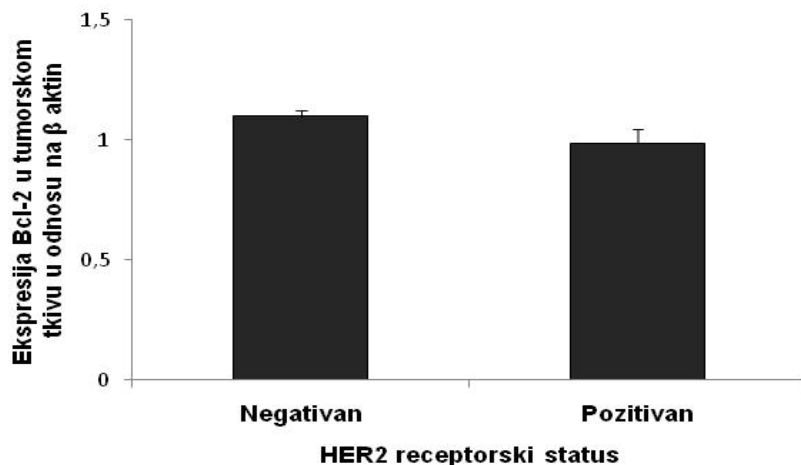
**Slika 49.** Ekspresija Bcl-2 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa tumorom infiltrisanim i neinfiltisanim limfnim čvorovima u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije Bcl-2 za obe grupe pacijentkinja.

Analizirali smo ekspresiju Bcl-2 u tumorskom tkivu u odnosu na steroidni hormonski i HER2 receptorski status tumora. Analizom smo pokazali da pacijentkinje sa pozitivnim ( $1.14 \pm 0.02$ ) steroidnim hormonskim receptorima imaju statistički značajno veći nivo ekspresije Bcl-2 u poredjenju sa negativnim ( $0.88 \pm 0.04$ ) hormonskim receptorima ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test) (Slika 50).



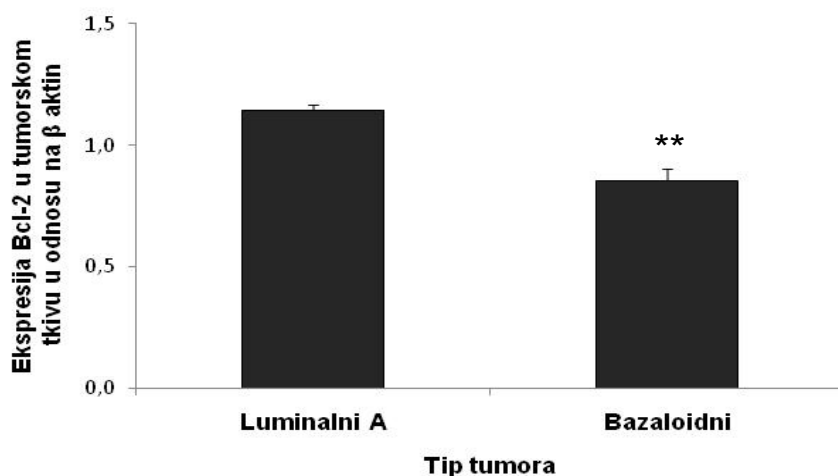
**Slika 50.** Ekspresija Bcl-2 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa negativnim i pozitivnim steroidnim hormonskim receptorskim statusom u odnosu na  $\beta$  aktin (\*\* $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije Bcl-2 za obe grupe pacijentkinja.

Nasuprot hormonskim receptorima, analiza ekspresije Bcl-2 pokazala je da nema razlike u ekspresiji Bcl-2 izmedju pacijentkinja sa HER2 pozitivnim ( $0.98 \pm 0.05$ ) i negativnim ( $1.1 \pm 0.02$ ) receptorima ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test) (Slika 51).



**Slika 51.** Ekspresija Bcl-2 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa negativnim i pozitivnim HER2 receptorskim statusom u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije Bcl-2 za obe grupe ispitanica.

Detaljna analiza ekspresije Bcl-2 pokazala je da pacijentkinje sa luminalnim A (1.14 $\pm$ 0.02) tumorima imaju statistički značajno veću ekspresiju Bcl-2 ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test) u tumorskom tkivu u poredjenju sa pacijentkinjama sa bazaloidnim tumorima (0.86 $\pm$ 0.04) (Slika 52).

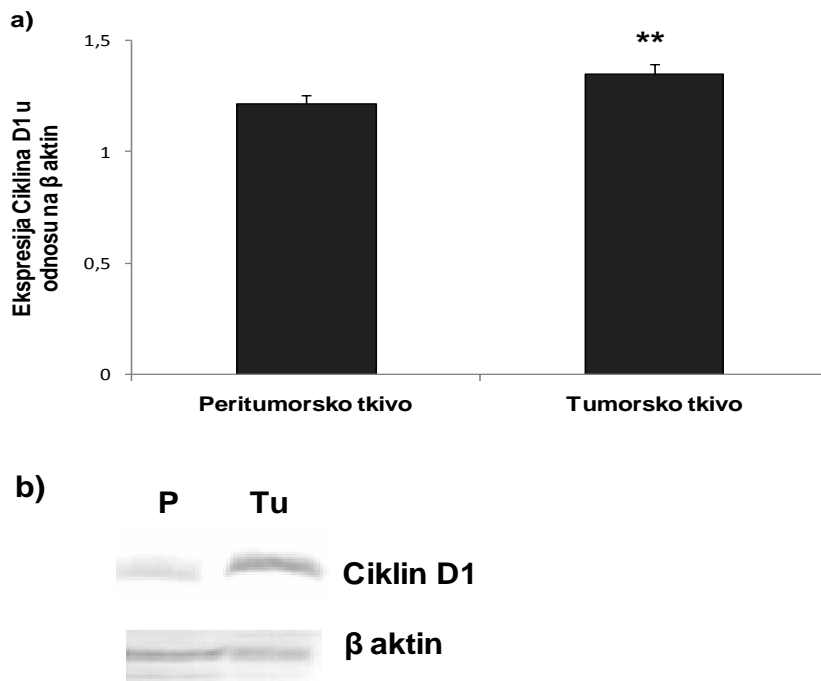


**Slika 52.** Ekspresija Bcl-2 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa luminalnim A i bazaloidnim tipom karcinoma dojki u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška za obe grupe pacijentkinja.

## 4.7. Ekspresija ciklina D1 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke

### 4.7.1. Ekspresija Ciklina D1 u tumorskom i peritumorskom tkivu

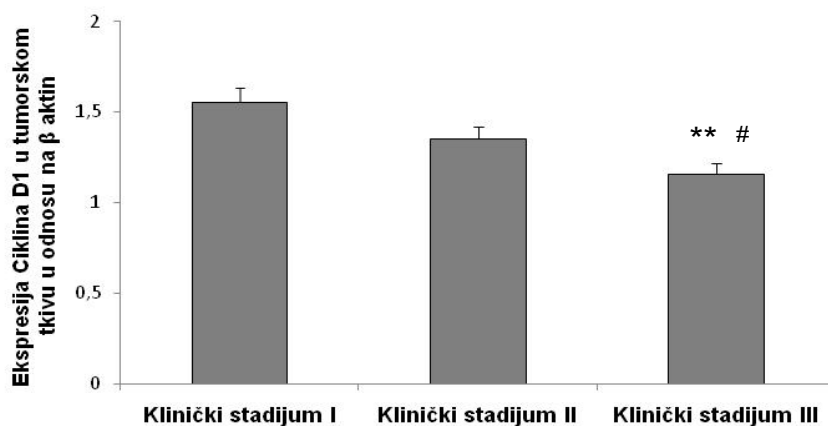
Poznato je da Ciklin D1 utiče na proliferaciju ćelija kancera dojke. Iz tog razloga ispitivali smo ekspresiju Ciklin D1 proteina u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke. U našem istraživanju ciklin D1 je detektovan u 60% slučajeva metodom Imunoblota. Detaljna analiza ekspresije ciklina D1 pokazala je statistički značajno veću ekspresiju Ciklin D1 u tumorskom tkivu ( $1.35 \pm 0.04$ ) u odnosu na peritumorsko tkivo ( $1.22 \pm 0.04$ ) pacijentkinja sa karcinomom dojke ( $p \leq 0.01$ , Wilcoxon test) (Slika 53). Na slici 53b su prikazani reprezentativni rezultati Imunoblota na kojima se vidi veća ekspresija Ciklina D1 u tumorskom tkivu u odnosu na peritumorsko tkivo bolesnica.



**Slika 53.** a) Prosečna ekspresija Ciklin D1 u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na  $\beta$  aktin (\*\* $p \leq 0.01$ , Wilcoxon rank test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije ciklina D1. b) Reprezentativni rezultati imunoblot ekspresije Ciklina D1 u tumorskom (Tu) i peritumorskom (P) tkivu.

#### 4.7.2. Ekspresija Ciklina D1 u odnosu na kliničko-patološke parametre bolesnica sa karcinomom dojke

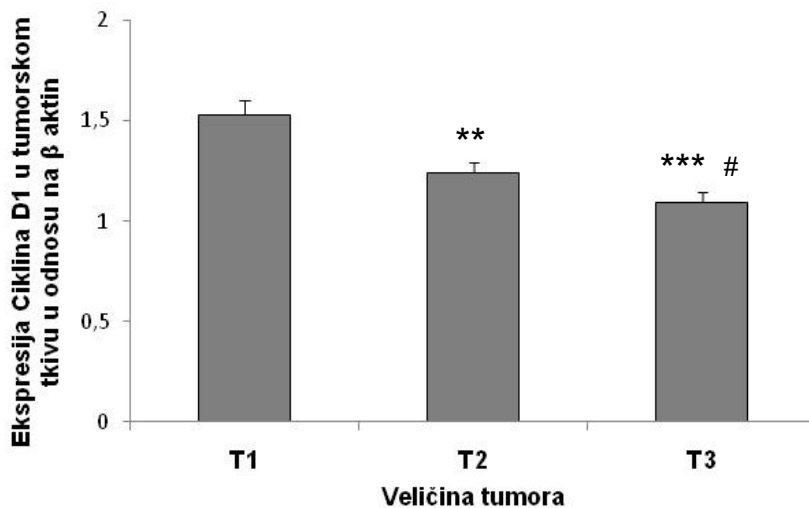
Obzirom da se ekspresija Ciklin D1 proteina smatra pokazateljem dužeg preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom dojke, analizirali smo ekspresiju Ciklin D1 u odnosu na klinički stadijum bolesti. Rezultati su pokazali da su bolesnice u kliničkom stadijumu III ( $1.16 \pm 0.06$ ) imale statistički značajno ( $p \leq 0.01$ ) nižu ekspresiju Ciklin D1 u tumorskom tkivu u odnosu na bolesnice sa karcinomom dojke u I ( $1.55 \pm 0.08$ ) i II ( $1.35 \pm 0.06$ ) kliničkom stadijumu. Međutim, nije bilo značajne razlike između bolesnica sa karcinomom dojke u I i II kliničkom stadijumu ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Na slici 54 prikazan je histogram ekspresije ciklina D1 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja u I, II i III kliničkom stadijumu.



**Slika 54.** Ekspresija Ciklin D1 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na  $\beta$  aktin u različitim kliničkim stadijumima bolesti (\*\* $p \leq 0.01$ , # $p \leq 0.05$ , Welch test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije ciklina D1 za pacijentkinje u I, II i III kliničkom stadijumu.

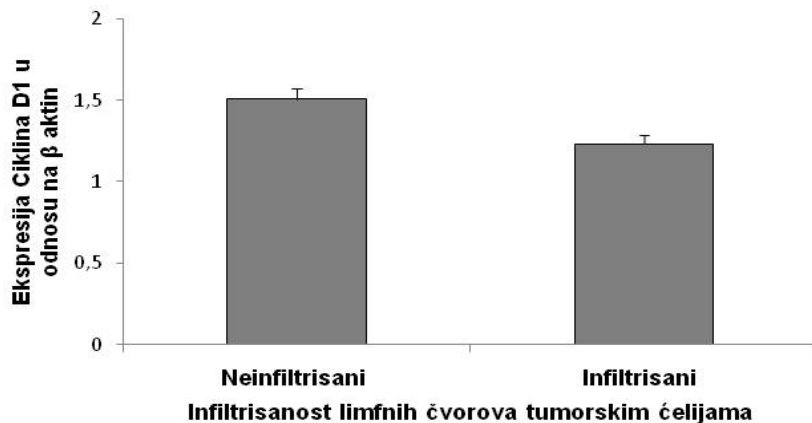
Analizirali smo ekspresiju Ciklin D1 u tumorskom tkivu u odnosu na veličinu tumora i zahvaćenost limfnih čvorova, obzirom da veličina tumora i zahvaćenost limfnih čvorova predstavljaju važne prognostičke parametre za pacijentkinje sa karcinomom dojke. Analiza ekspresije Ciklin D1 pokazala je da su pacijentkinje sa T3 tumorima

( $1.093 \pm 0.05$ ) imale statistički značajno ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test) nižu ekspresiju Ciklin D1 u tumorskom tkivu u poredjenju sa bolesnicama sa T1 ( $1.53 \pm 0.07$ ) i T2 ( $1.24 \pm 0.05$ ) tumorima (Slika 55). Mann Whitney testom je pokazano da su pacijentkinje sa T2 imale statistički značajno ( $p \leq 0.05$ ) nižu ekspresiju Ciklina D1 u poredjenju sa bolesnicama sa T1 tumorima.



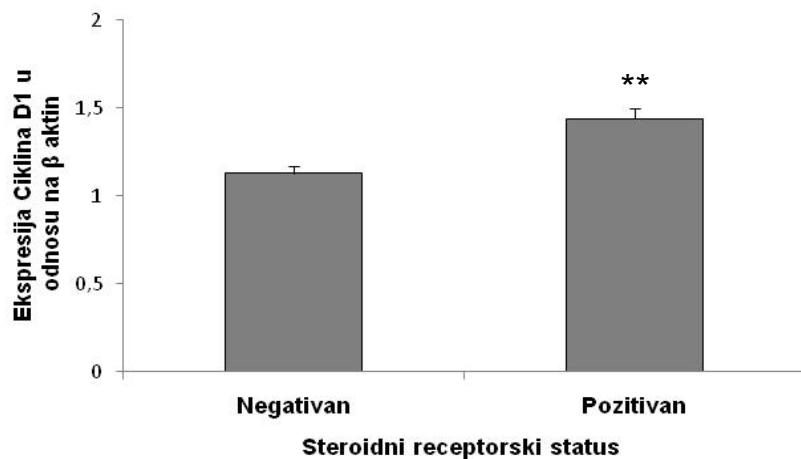
**Slika 55.** Ekspresija Ciklina D1 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke sa T1, T2 i T3 veličinom tumora u odnosu na  $\beta$  aktin (\*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , # $p \leq 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije ciklina D1 za svaku grupu pacijentkinja.

Nasuprot veličini tumora, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji Ciklin D1 u tumorskom tkivu ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test) između pacijentkinja sa aksilarnim limfnim čvorovima infiltrisanim tumorskim ćelijama ( $1.23 \pm 0.05$ ) u poredjenju sa grupom pacijentkinja sa neinfiltiranim limfnim čvorovima ( $1.5 \pm 0.06$ ) (Slika 56).



**Slika 56.** Ekspresija Ciklina D1 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa tumorom infiltrisanim i neinfiltrisanim limfnim čvorovima u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije ciklina D1 za obe grupe pacijentkinja.

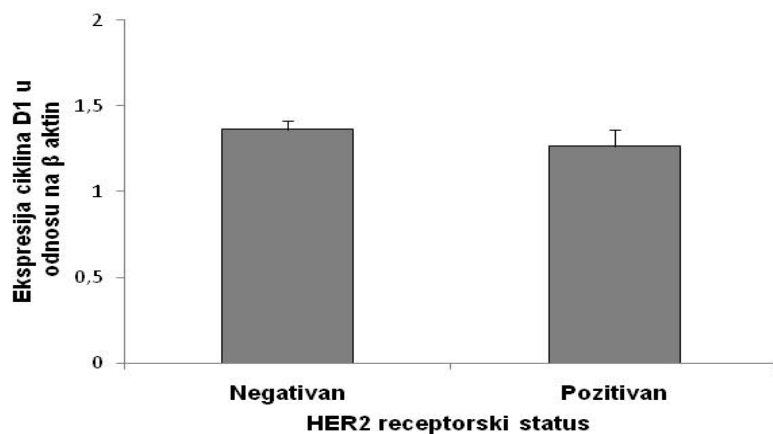
Analizirali smo ekspresiju Ciklin D1 u tumorskom tkivu u odnosu na steroidni hormonski i HER2 receptorski status tumora. Analizom smo pokazali da pacijentkinje sa pozitivnim steroidnim hormonskim receptorima ( $1.44 \pm 0.05$ ) imaju statistički značajno veći nivo ekspresije Ciklin D1 u poredjenju sa negativnim hormonskim receptorima ( $1.13 \pm 0.04$ ) ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test) (Slika 57).



**Slika 57.** Ekspresija Ciklin D1 u tumorima kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa negativnim i pozitivnim steroidnim receptorskim statusom u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije ciklina D1 za obe grupe pacijentkinja.

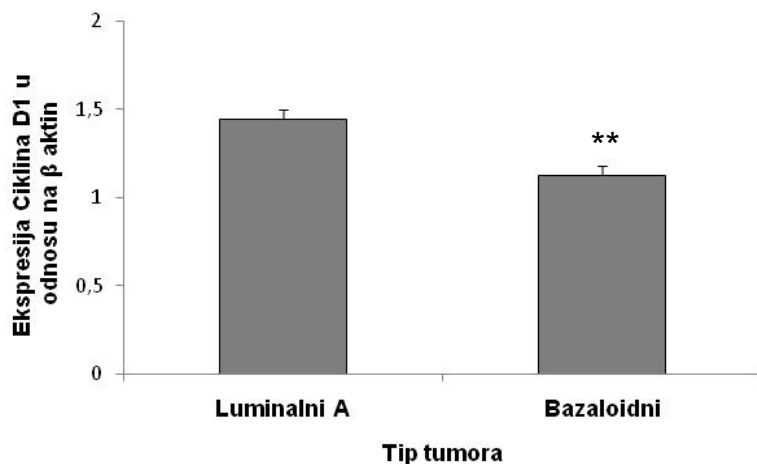
Nasuprot hormonskim receptorima, analiza ekspresije Ciklina D1 pokazala je da nema razlike u ekspresiji Ciklina D1 izmedju pacijentkinja sa HER2 pozitivnim ( $1.26 \pm 0.09$ ) i negativnim ( $1.36 \pm 0.05$ ) receptorima pacijentkinja sa kancerom dojke ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test) (Slika 58).





**Slika 58.** Ekspresija Ciklin D1 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa negativnim i pozitivnim HER2 receptorskim statusom u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p > 0.05$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije ciklina D1 za obe grupe ispitanica.

Detaljna analiza ekspresije Ciklina D1 pokazala je da pacijentkinje sa luminalnim A ( $1.44 \pm 0.05$ ) tumorima imaju statistički značajno veću ekspresiju Ciklin D1 ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test) u tumorskom tkivu u poredjenju sa pacijentkinjama sa bazaloidnim tumorima ( $1.12 \pm 0.05$ ) (Slika 59).



**Slika 59.** Ekspresija Ciklin D1 u tumorskom tkivu kod pacijentkinja sa luminalnim A i bazaloidnim tipom karcinoma dojki u odnosu na  $\beta$  aktin ( $p \leq 0.01$ , Mann Whitney test). Predstavljene su srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška ekspresije Ciklina D1 za obe grupe pacijentkinja.

## 5. DISKUSIJA

LDH se smatra markerom anaerobnog metabolizma ćelije. Anaerobni metabolizam ćelije se može aktivirati u tumorskim ćelijama ili hipoksijom ili onkogenima. Elstrom sa saradnicima je pokazao da je aktivacija jednog onkogeno, Akt dovoljna da stimuliše aerobnu glikolizu u uslovima hipoksije (Elstrom i sar., 2004). Utvrđeno je da Akt u uslovima hipoksije stimuliše hipoksijom indukovani faktor 1 (HIF1) koji dovodi do povećanja aktivnosti enzima uključenih u aerobnu glikolizu i bolje absorpcije glukoze preko membranskih transportera glukoze (Semenza i sar., 1996).

U našem istraživanju pokazali smo da nema razlike u aktivnosti LDH u tumorskom i peritumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke. Koukourakis sa autorima je pokazao da je ekspresija LDH povećana u 60–65% tumorskih tkiva kancera dojke, dok su okolna peritumorska tkiva pokazala nisku ekspresiju LDH (Koukourakis i sar., 2009). U navedenoj studiji benigni tumori dojke takodje su pokazali visoku ekspresiju LDH. Obzirom da u našem istraživanju nema razlike u aktivnosti LDH, rezultati sugerišu da su verovatno signalni putevi i onkogeni aktivirani i u peritumorskom tkivu, što dovodi da povećanja aktivnosti enzima aerobne glikolize i u peritumorskom tkivu.

Više godina unazad nivo LDH u serumu se koristi kao prognostički marker kod pacijentkinja sa karcinomom dojke. Studija koja je istraživala nivo LDH u serumu pacijenata sa karcinomom pluća pokazala je da nivo LDH nakon hiruške ekscizije tumora naglo opada, što potvrđuje hipotezu da visok nivo LDH u serumu potiče od visokog nivoa u tumoru (Koukourakis i sar., 2003). Mehanizam otpuštanja LDH iz tumora u cirkulaciju još uvek nije razjašnjen, iako se smatra da je otpuštanje LDH u serum uzrokovano procesom nekroze u tumoru. Iz tog razloga, ispitivali smo aktivnost LDH u odnosu na stadijum bolesti pacijentkinja i pokazali da se aktivnost LDH statistički značajno povećava sa povećanjem stadijuma bolesti. Navedeni rezultat ukazuje da bi aktivnost LDH mogla da posluži u kliničkoj praksi kao marker stadijuma bolesti pacijentkinja sa karcinomom dojke.

Naši rezultati pokazuju da je LDH 5 izoenzim detektovan samo u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke, što je u saglasnosti sa ostalim studijama. Prethodne studije su pokazale da je LDH 5 izoenzim koji je odgovoran za povećanje LDH u serumu i tumorskom tkivu (Koukourakis i sar., 2009; Koukourakis i sar., 2003). Dodatna biohemijaska ispitivanja LDH 5 pomogla bi razjašnjavanje procesa anaerobne glikolize u tumoru.

U našem istraživanju pokazali smo da pacijentkinje sa metastaskim limfnim čvorovima imaju sličnu prosečnu aktivnost LDH u odnosu na pacijentkinje bez zahvaćenih limfnih čvorova. Do sada nije ispitivana aktivnost LDH u odnosu na infiltrisanost limfnih čvorova i hormonski status. Obzirom da hormonski i HER2 receptorski status predstavljaju veoma značajne parametre u lečenju i patogenezi karcinoma dojke, analizirali smo aktivnost LDH u odnosu na hormonski i HER2 status. Pokazali smo da nema razlike u aktivnosti LDH između pacijentkinja sa hormonski pozitivnim i negativnim receptorima. U novije vreme se sve više ispituje grupa pacijentkinja sa karcinomom dojke sa negativnim hormonskim i HER2 receptorima koja pokazuje veoma invazivne karakteristike i sklonost kao hematogenom načinu metastaziranja. Ispitivanja HER2 statusa pokazala su da pacijentkinje koje imaju HER2 negativne receptore imaju statistički značajno veću aktivnost LDH u tumorima u poredjenju sa pacijentkinjama koje imaju HER2 pozitivne receptore. Svi navedeni rezultati sugerišu da LDH aktivnost u tumorima nije regulisana aktivacijom HER2.

U nekoliko publikovanih studija ispitivana je aktivnost MDH u tumorskom i peritumorskom tkivu karcinoma dojke i pokazano je da je aktivnost MDH veća u tumorskom u odnosu na peritumorsko tkivo (Balinsky i sar., 1983). U našem istraživanju tumorsko tkivo je imalo statistički značajno veću aktivnost MDH u poredjenju sa peritumorskim tkivom pacijentkinja sa karcinomom dojke. Takođe, pokazali smo da je aktivnost mitohondrijalne izoforme MDH veća u tumorskom tkivu u odnosu na peritumorsko, što je u saglasnosti sa prethodno publikovanim studijama (Hennipman i sar., 1987; Balinsky i sar., 1984). Obzirom da je MDH uključen u metabolizam malata i aspartata (Musrati i sar., 1998), ovo povećanje aktivnosti MDH sugeriše da je veća aktivnost MDH potrebna mitohondrijama nego citosolu ćelija kancera dojke. Slično našem rezultatu u kanceru pluća, takođe je pokazano značajno povećanje aktivnosti

mitohondrijalne izoforme MDH (Balinsky i sar., 1984). Povećanje procenta aktivnosti m-MDH u tumorskom tkivu u odnosu na okolno pokazano je i kod pacova sa karcinomom dojke (Musrati i sar., 1998). Navedeni rezultati sugerišu da povećanje procenta aktivnosti m-MDH u tumorskom tkivu može biti način adaptacije tumorske ćelije karakterističan ne samo za karcinom dojke, već za većinu kancerskih ćelija. mMDH učestvuje u produkciji ATP jer omogućava redukciju  $\text{NAD}^+$  u NADH. Povećana aktivnost mMDH pokazana je u leukocitima trkačkih konja i tumorskih ćelija, koje imaju povećane potrebe za energijom (Washizu i sar., 2005). Takodje, pokazano je da tumorska tkiva pacijenata sa karcinomima glave i vrata imaju povećanu aktivnost MDH koja korelira sa gustom novonastalih krvnih sudova tumora. Na taj način, bolja vaskularizacija tumora obezbeđuje kiseonik tumorskim ćelijama, koji aktivira MDH da stvara povećane količine ATP neophodne tumorskim ćelijama (Ross i sar., 2000). Pokazana visoka aktivnost mitohondijalne izoforme MDH u tumorskim tkivima pacijentkinja ukazuje na dobru vaskularizaciju ispitivanih tumora i može se razmatrati njegova upotreba kao markera angiogeneze.

Naša istraživanja su pokazala da nije bilo razlike u aktivnosti MDH u tumorskom tkivu u odnosu na stadijum bolesti pacijentkinja sa karcinomom dojke. Do sada nije bilo istraživanja koja su ispitivala aktivnost MDH u tumorskom tkivu u odnosu na kliničko-patološke karakteristike pacijentkinja sa karcinomom dojke. Iz tih razloga, ispitivali smo aktivnost MDH u odnosu na infiltrisanost limfnih čvorova i pokazali da veću relativnu aktivnost MDH u tumoru imaju pacijentkinje sa infiltrisanim limfnim čvorovima u odnosu na pacijentkinje sa neinfiltisanim limfnim čvorovima. Obzirom da je pokazano da infiltrisanost limfnih čvorova predstavlja važan prognostički parametar, aktivnost MDH bi mogla pomoći u stratifikaciji pacijentkinja sa karcinomom dojke sa lošom prognozom.

U našim analizama, pokazali smo da nema razlike u aktivnosti MDH kod pacijentkinja sa steroidnim pozitivnim u poredjenju sa pacijentkinjama sa negativnim hormonskim receptorima. Medjutim, analiza aktivnosti MDH u odnosu na HER2 status pokazala su da pacijentkinje koje imaju HER2 negativne receptore imaju statistički značajno veću aktivnost MDH u tumorima u poredjenju sa pacijentkinjama koje imaju HER2 pozitivne receptore. Kako je pokazano da hormonski i HER2 negativni tumori (tripl negativni

tumori) imaju veoma invazivni i metastatski potencijal, povećana aktivnost MDH predstavlja važnu karakteristiku metabolizma ovog tipa kancera dojke.

Jasne razlike u aktivnosti izoenzima LDH i MDH, kao i u aktivnosti ukupne aktivnosti MDH predstavljaju važan rezultat jer mogu biti potencijalni dijagnostički parametri za kancer dojke. Maligno tkivo se može razlikovati od peritumorskog tkiva na osnovu distribucije izoenzima LDH i MDH; naime, maligni tumori imaju povećanu aktivnost LDH5 i m-MDH.

Oštećenje epitela karcinoma dojke delovanjem RKR dovodi do proliferacije fibroblasta, hiperplazije epitela, ćelijske atipije i karcinoma dojke. Studije su pokazale da je u solidnim tumorima prisutna izražena lipidna peroksidacija. Prethodne studije su pokazale da je intenziviranje procesa lipidne peroksidacije praćeno povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima. Povećano stvaranje radikala kao što su  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  indukuje povećanje aktivnosti SOD i CAT kod pacijentkinja sa karcinomom dojke (Kang, 2002).

Studije su pokazale da humane tumorske ćelijske linije imaju veću aktivnost CAT u poredjenju sa netransformisanim ćelijskim linijama (Ripple i Henry, 1997). U prethodno publikovanoj studiji autori su pokazali da je veća aktivnost CAT u tumorskom u odnosu na peritumorko tkivo (Kumaraguruparan i sar., 2002). Slično tome i u našem ispitivanju pokazali smo da pacijentkinje sa karcinomom dojke imaju statistički značajno veću prosečnu aktivnost CAT u tumorskom tkivu u poredjenju sa peritumorskim tkivom.

Praćenjem aktivnosti CAT u odnosu na stadijum bolesti pacijentkinja pokazali smo da se aktivnost CAT statistički značajno smanjuje sa povećanjem stadijuma bolesti. Smanjenje aktivnosti CAT u tumorskom tkivu uporedo sa stadijumom bolesti pacijentkinja sa karcinomom dojke pokazao je Ray sa saradnicima (Ray i sar., 2000). Navedeni rezultat ukazuje da bi ova aktivnost mogla biti korišćena u kliničkoj praksi kao marker stadijuma bolesti pacijentkinja sa karcinomom dojke.

U našoj studiji nije bilo razlike u aktivnosti CAT kod bolesnica u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova i u odnosu na hormonski i HER2 receptorski status. Povećanje RKR udruženo sa nedovoljnim povećanjem enzima antioksidativne zaštite dovodi do oksidativnog stresa (Mates i sar., 1999). Novija istraživanja ukazuju da oksidativni stres dovodi do povećanja enzima antioksidativne zaštite što omogućava ćelijama tumora da budu rezistentnije na ćelijsku smrt (Halliwell, 2000). Pokazano je da postoji značajan

nivo ekspresije i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u većini malignih tumora, uključujući i karcinom dojke (Skrzydłewska i sar., 2001; Kumaraguruparan i sar., 2002). Pokazano je da terapija Tamoksifenom značajno redukuje nivo i aktivnost enzima antioksidativne zaštite kod postmenopauzalnih pacijentkinja sa karcinomom dojke (Thangaraju i sar., 1998). Čelije karcinoma koje imaju povećanu aktivnost enzima antioksidativne zaštite citotoksični limfociti teže prepoznaju i tako izbegavaju imunski odgovor. Naši rezultati ukazuju da povećanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite udruženo sa razvojem karcinoma dojke omogućava selektivan rast i umnožavanje tumorskih ćelija u poredjenju sa okolnim peritumorskim ćelijama.

U prethodno publikovanoj studiji autori su pokazali da je veća aktivnost SOD u tumorskom u odnosu na peritumorsko tkivo (Kumaraguruparan i sar., 2002). Takodje, pokazano je da postoji povećanje aktivnosti totalne i mitohondrijalne SOD zajedno sa njihovom prekomernom ekspresijom u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke (Liu i sar., 1997). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je aktivnost mitohondrijalne izoforme veća u odnosu na citosolnu izoformu i u odnosu na peritumorsko tkivo, što je u saglasnosti sa rezultatima prethodno navedene studije. Takodje, potvrđena je povećana ekspresija iRNK SOD u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke (Li i sar., 1998). Medjutim, u našem istraživanju pokazali smo da nema razlike u aktivnosti SOD izmedju tumorskog i peritumorskog tkiva, što se može objasniti malim brojem ispitanica.

Takodje, nije pokazana razlika u aktivnosti SOD kod bolesnica u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova i u odnosu na stadijum bolesti. Aktivnost SOD kod pacijentkinja sa pozitivnim hormonskim statusom je bila veća u odnosu na pacijentkinje sa negativnim hormonskim statusom, iako izmedju njih nije bilo statističke značajnosti. Takodje, slično našem rezultatu, Tsanou sa autorima je pokazao da iako nije bilo statističke značajnosti, visoka ekspresija SOD je bila češće prisutna kod hormonski pozitivnih pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na hormonski negativne tumore (Tsanou i sar., 2004).

U našem ispitivanju pokazali smo da pacijentkinje sa HER pozitivnim receptorskim statusom imaju statistički značajno veću prosečnu aktivnost SOD u poredjenju sa HER2 negativnim pacijentkinjama. Naši rezultati ukazuju da su možda izražene invazivne i

metastatske karakteristike HER2 pozitivnih tumora delimično posredovane povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima.

Pokazano je da je veći denzitet parenhima povezan sa nastankom karcinoma dojke, ali patofiziološka osnova povezanosti mamografske gustine sa karcinomom dojke još uvek nije objašnjena (Ursin i sar., 2005). Prema nekim studijama, visok proliferativni indeks i visok mitotski indeks su povezani sa većim procentom denziteta parenhima (Boyd i sar., 2005). Do sada nijedno istraživanje nije ispitivalo povezanost enzima (LDH, SOD i CAT) sa procentom denziteta parenhima. U našem istraživanju pokazali smo da je povećani denzitet parenhima (struktura dojki ACR3 i ACR4) povezan sa aktivnošću enzima, važnih u patogenezi i progresiji karcinoma dojke, u tumorskom tkivu.

U ovoj studiji, prikazali smo da su mamografije na kojima se vidi tkivo sa povećanim denzitetom parenhima povezane sa većom aktivnošću LDH u tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke. U tom smislu, prikazano je da 23.9% veću aktivnost LDH u tkivu (indeks tumorsko/peritumorsko tkivo) imaju bolesnice sa karcinomom dojke sa ACR4 strukturom dojki, mada razlika nije bila statistički značajna. Ispitali smo povezanost indeksa koji je predstavljao količnik enzimske aktivnosti u tumorskom tkivu i aktivnosti u peritumorskom tkivu sa denzitetom parenhima, zato što se denzitet parenhima odnosi na celu dojku. U grupi ispitivanih pacijentkinja, našli smo da pacijentkinje sa većim denzitetom parenhima predominantno boluju od dukalnog invazivnog karcinoma, dok pacijentkinje sa manje glandularnog tkiva imaju uglavnom lobularni kancer dojke. Ovi rezultati se slažu sa već publikovanim studijama, koje su pokazale da se lobularni kacinom dojke najčešće javlja kod postmenopauzalnih žena, koje imaju manje glandularnog tkiva (Fu i sar., 1998).

Pozitivan receptorski HER2 status se nalazi u 10-20% bolesnica sa karcinomom dojke i povezan je sa lošom prognozom i ranom pojavom metastaza (Filipits i sar., 2011). U našem istraživanju, nismo našli povezanost HER2 statusa i mamografskih nalaza (senke sa ili bez udruženih kalcifikacija, suspektne grupisane kalcifikacije, fokalna asimetrija, narušena arhitektonika). Medjutim, Seo i grupa autora su našli da su HER2 pozitivni karcinomi dojke povezani sa suspektnim grupisanim kalcifikacijama (Seo i sar., 2006). Prethodna istraživanja su pokazala da su grupisane kalcifikacije na mamogramima prediktivni parametri za lošu prognozu pacijentkinja sa karcinomom dojke (Tabar i sar.,

2004). U našoj studiji, grupisane kalcifikacije imalo je 40% pacijentkinja sa HER2 pozitivnim karcinomima dojke, dok je 15% pacijentkinja sa HER negativnim tumorima imalo grupisane kalcifikacije na mamogramima, iako ova povezanost nije bila statistički značajna ( $p=0.06$ ).

Naši rezultati govore u prilog hipotezi da proliferacija stromalnih i epitelnih ćelija utiče na stvaranje većeg denziteta tkiva dojke, tj. glandularnog tkiva (Boyd i sar., 2005). LDH omogućava ćelijama karcinoma dojke da proliferišu u uslovima hipoksije (Fantin i sar., 2006) i povećana aktivnost LDH može delimično uzrokovati povećanje denzitet parenhima u tkivu dojke. Novije studije su pokazale da LDH igra važnu ulogu u razvoju mehanizma rezistencije ćelija karcinoma dojke na Taksol, najznačajnijeg leka u terapiji karcinoma dojke. Takodje, smatra se da je povećana aktivnost LDH u tumorskom tkivu povezana sa agresivnim fenotipom karcinoma dojke (Zhou i sar., 2010). Iz tih razloga, određivanje LDH aktivnosti bi moglo pružiti dodatne informacije o fenotipu karcinoma dojke, kao i o biologiji ove bolesti. U našem istraživanju pokazali smo da pacijentkinje sa senkama na mamogramima imaju veću aktivnost LDH u tumorskom tkivu, kao i u indeksu tumorskog tkiva (odnos tumorsko/peritumorsko tkivo) u poredjenju sa pacijentkinjama koje su imale fokalnu asimetriju ili narušenu arhitektoniku. Štaviše, pacijentkinje sa spikuliranim senkama imaju značajno veću aktivnost LDH u tkivu u poredjenju sa pacijentkinjama koje su imale fokalnu asimetriju ili narušenu arhitektoniku. Pacijentkinje sa karcinomom dojke koje su imale senke sa neoštrom konturom na mamografijama imale su značajno veću aktivnost LDH u tkivu u odnosu na pacijentkinje koje su imale fokalnu asimetriju ili narušenu arhitektoniku.

Navedeni rezultati sugerišu povezanost histoloških parametara sa radiološkim karakteristikama pacijentkinja sa karcinomom dojke, tačnije povezanost mamografskih karakteristika sa procesima proliferacije i anaerobnog metabolizma, glavnih karakteristika ćelija kancera. Medjutim, nismo našli povezanost izmedju aktivnosti LDH u tumorskom tkivu i prisustva grupisanih kalcifikacija na mamografijama, iako je grupa ispitivanih pacijentkinja sa kalcifikacijama bila mala. Naši podaci koji pokazuju da se aktivnost LDH u tkivu povećava sa povećanjem BIRADS kategorije na mamografijama, ukazuju da je veća BIRADS kategorija povezana sa agresivnim podtipom karcinoma dojke. Neke studije koje su ispitivale povezanost histopatoloških markera sa



mamografskim karakteristikama pokazuju da ova istraživanja pomažu u razumevanju biologije karcinoma dojke (Wang i sar., 2008).

Nekoliko publikovanih studija pokazale su da pokazatelji oksidativnog stresa, enzimi u benignom tkivu utiču na povećanje denziteta parenhima (Hong i sar., 2004). Takođe, pokazano je da je povećana aktivnost antioksidativnih enzima, kao što su CAT i SOD u tkivu karcinoma dojke. Ovi rezultati nam sugerišu da maligne ćelije povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima uspevaju da izbegnu proces apoptoze i na taj način pomažu procese invazije i metastaziranja (Halliwell, 2000). U našem istraživanju, nije bilo značajne povezanosti između SOD aktivnosti i BIRADS kategorije, iako su pacijentkinje sa BIRADS 5 kategorijom imale veću, mada ne značajno veću aktivnost SOD u tumorskom tkivu u poredjenju sa bolesnicama sa BIRADS 4c, 4a i 4b. Pacijentkinje sa spikuliranim senkama na mamografijama imale su značajno nižu aktivnost CAT u tkivu u poredjenju sa pacijentkinjama sa senkama neoštre konture. Štaviše, pokazali smo da se aktivnost CAT u tkivu smanjuje sa povećanjem BIRADS kategorije na mamografijama. Navedeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnim studijama koje su pokazale povećanje aktivnosti SOD i smanjenje aktivnosti CAT u tkivu karcinoma dojke, kao i njihovu povezanost sa agresivnim fenotipom karcinoma dojke (Kattan i sar., 2008).

Gore navedeni rezultati sugerišu da određivanje povezanosti LDH i CAT u tumorskom tkivu sa mamografskim karakteristikama može pomoći u definisanju grupe pacijentkinja sa agresivnijim podtipom karcinoma dojke. Obzirom da se aktivnost LDH, pokazatelja anaerobnog metabolizma, statistički značajno povećava, a aktivnost CAT značajno smanjuje sa povećanjem BIRADS kategorije, ovi rezultati sugerišu da tumori klasifikovani kao BIRADS 5 imaju agresivniji fenotip.

U novije vreme ispituje se aktivnost MMP-2 i MMP-9 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke kao mogući molekularni markeri invazivnosti tumora i kao moguće mete terapije (Zucker i sar., 1999). U ovom istraživanju smo pokazali da postoji značajno povećanje prosečne aktivnosti proMMP-2, aMMP-2, proMMP-9 i aMMP-9 detektovane u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na aktivnost ovih enzima u odgovarajućem peritumorskom tkivu. Slični rezultati su dobijeni u nekoliko prethodnih istraživanja (Jinga i sar., 2006). U našem istraživanju pokazali smo

da postoji statistički značajno povećanje prosečne aktivnosti proMMP-2, aMMP-2, proMMP-9 i aMMP-9 u tumorskom tkivu sa povećanjem kliničkog stadijuma pacijentkinja sa karcinomom dojke. Povećanje aktivnosti MMP-2 i MMP-9 u tumorskom tkivu sa povećanjem kliničkog stadijuma sugerije da bi navedeni enzimi mogli biti korišćeni u kliničkoj praksi kao markeri stadijuma pacijentkinja sa karcinomom dojke.

Takodje smo pokazali da pacijentkinje sa većom primarnom veličinom tumora (T3 ili T2) imaju značajno veće aktivnosti proMMP-2 i aMMP-2 u tumorima u poredjenju sa pacijentkinjama sa tumorima manje veličine (T1). Interesantno je da povećanje aktivnosti proMMP-9 i aMMP-9 u tumorskom tkivu više korelira sa povećanjem veličine tumora u odnosu na aktivnost MMP-2. Li sa koautorima je pokazao da se ekspresija MMP-2, detektovana metodom imunohistohemije, značajno povećava sa povećanjem veličine tumora (Li i sar., 2004).

U našem istraživanju pokazali smo da pacijentkinje sa metastaskim limfnim čvorovima imaju značajno veće prosečne aktivnosti proMMP-2, aMMP-2 i aMMP-9 u odnosu na pacijentkinje bez zahvaćenih limfnih čvorova. U jednoj prethodnoj studiji pokazano je da aktivnost MMP-9, merena želatin zimografijom, korelira sa brojem limfnih čvorova zahvaćenim metastatskim procesom, što je u saglasnosti sa našim rezultatima (Hirvonen i sar, 2003). Svi navedeni rezultati sugeriju da MMP-2 i MMP-9 igraju važnu ulogu u progresiji karcinoma dojke.

Iako markeri kao što su estrogenski i progesteronski receptorski status imaju ograničenu vrednost kao nezavisni prognostički parametri, oni mogu u kombinaciji sa drugim markerima predstavljati prediktivne parametre za procenjivanje odgovora na terapiju (Ali i sar., 2011). Medjutim, naša istraživanja su pokazala da je negativan steroidni receptorski status povezan sa povećanjem aktivnosti aMMP-2 i aMMP-9 u tumorskim tkivima. Negativan hormonski status kao važan faktor rizika u karcinomu dojke, ispitivan je u više istraživanja i Talvensaaari-Mattila je sa saradnicima pokazao da MMP-2 negativnost može služiti kao marker za dobru prognozu kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa negativnim hormonskim statusom (Talvensaaari-Mattila i sar., 2003; Rahko i sar., 2004). Navedena istraživanja su u saglasnosti sa našim rezultatima i indikuju da MMP-2 i MMP-9 igraju važnu ulogu u procesima invazije i migracije hormonski negativnih tumora.

Uticaj HER2 ekspresije na invazivnost tumorskih ćelija ostvaruje se delimično povećanjem MMP-2 i MMP-9 ekspresije i njihove proteolitičke aktivnosti (Banerjee i Smith, 2010). U našim istraživanjima nismo našli značajnu razliku u aktivnosti aMMP-2 između HER2 pozitivnih i negativnih tumora, iako su pacijentkinje sa HER2 pozitivnim tumorima imale povećanu aktivnost aMMP-2.

Luminalni A tumori predstavljaju uglavnom dobro diferentovane tumore, sa niskim proliferativnim indeksom i dobrom prognozom. Način metastatskog širenja bazaloidnog tipa tumora se veoma razlikuje u odnosu na luminalni A tip tumora: utvrđeno je da bazaloidni tumori redje metastaziraju u aksilarne limfne čvorove, favorizuju metastaziranje hematogenim putem i imaju lošu prognozu (Weigelt i Reis-Filho, 2009). Istraživanja su pokazala da proMMP-2 direktno reguliše angiogenezu i razgradnja kolagena tipa IV pomoću MMP-2 otkriva mesto u kolagenu za koje se vezuje  $\alpha\beta 3$  integrin na površini novonastalih krvnih sudova (Hornebeck i sar., 2002). Navedena istraživanja su u saglasnosti sa našim istraživanjima, koja su pokazala da bazaloidni tumori, sa agresivnijom angiogenezom imaju povećanu aktivnost proMMP-2 u odnosu na luminalne A tumore. U tom smislu, veća aktivnost proMMP-2 kod bazaloidnih tumora ukazuje da MMP-2 učestvuje u hematogenom širenju bazaloidnog karcinoma dojke.

U nekoliko eksperimentalnih istraživanja pokazano je da ćelije strome proizvode MMP-2 i MMP-9 (Guo i Giancotti, 2010). U našem istraživanju pokazali smo značajnu aktivnost MMP-2 i -9 u peritumorskom tkivu tumora, iako na nižem nivou u odnosu na tumorsko tkivo. Pokazano je da ćelije kancera mogu stimulisati parakrinim putem tj. sekrecijom interleukina, interferona i faktora rasta ćelije strome u peritumorskom tkivu da sintetišu MMP-2 i MMP-9 (Guo i Giancotti, 2010). U tom smislu, u ovom istraživanju smo pokazali da postoji povećana aktivnost želatinaza u peritumorskom tkivu kod tumora sa negativnim steroidnim receptorima. Takođe, pokazali smo da bazaloidni tumori imaju povećanu aktivnost aMMP-2 u peritumorskom tkivu. Gore navedeni rezultati ukazuju da povećana aktivnost aMMP-2 delimično objašnjava izražene invazivne i angiogenezne karakteristike bazaloidnih tumora dojke. Nadalje, naša istraživanja ukazuju da je regulacija aktivnosti MMP-2 verovatno nezavisna od steroidnih hormona. U tom smislu, dodatna biohemijska istraživanja u peritumorskom tkivu pružila bi bolji uvid u razumevanje agresivne biologije bazaloidnih karcinoma dojke.

Naši rezultati pokazuju da želatinaze mogu biti razmatrane kao važni markeri dijagnoze i stažiranja pacijentkinja sa karcinomom dojke. Povećana aktivnost aMMP-2 i aMMP-9 u tumorskom tkivu pacijentkinja sa negativnim hormonskim receptorima implicira da aktivnost aMMP-2 i aMMP-9 može biti kliničko-patološki marker koji bi pomogao stratifikaciju pacijentkinja sa hormonski negativnim karcinomom dojke. Takođe, povećana aktivnost MMP-2 u tumorskom i peritumorskom tkivu bazaloidnih tumora ukazuje da MMP-2 učestvuje u agresivnoj prirodi bazaloidnih kancera. Merenjem MMP u primarnim karcinomima možemo pomoći dizajniranje novih MMP inhibitora za terapiju ove maligne bolesti.

Dugo se smatralo da TIMP1, kao inhibitor MMP deluje kao antitumorski marker, međutim brojne studije su pokazale da TIMP1 ima stimulaturna dejstva na tumor. U novije vreme ispituje se ekspresija TIMP1 u tumorkom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke kao moguć marker prognoze i odgovora na hemioterapiju (Nakopoulou i sar., 2003; Brummer i sar., 1999). U ovom istraživanju smo pokazali da postoji značajno povećanje ekspresije TIMP1 detektovane u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na njegovu ekspresiju u odgovarajućem peritumorskom tkivu. Isti rezultati dobijeni su u nekoliko prethodnih istraživanja (Rahko i sar., 2009). Druge studije su pokazale da je ekspresija TIMP1 povećana u tkivu kancera dojke u poredjenju sa benignim ili normalnim tkivom dojke (Brummer i sar., 1999; Nakopoulou i sar., 2002). Pored toga, utvrđeno je da je ekspresija iRNK i proteina TIMP1 statistički značajno veća u malignom u odnosu na benigno tkivo dojke. Ekspresija TIMP1 se povećava sa povećanjem stepena agresivnosti karcinoma (Gonzalez i sar., 2008). Navedeni podaci sugerišu da merenje TIMP1 u tumorskom tkivu može biti dijagnostički marker u razlikovanju malignog u odnosu na benigno tkivo dojke.

U ovom istraživanju dobili smo rezultate koji pokazuju da postoji statistički značajno povećanje ekspresije TIMP1 u tumorskom tkivu sa povećanjem kliničkog stadijuma pacijentkinja sa karcinomom dojke. Nadalje, pokazali smo da postoji povezanost ekspresije TIMP1 u tumorima i veličine tumora, odnosno sa povećanjem ekspresije TIMP1 povećava se veličina tumora. Takođe, pacijentkinje sa metastaskim limfnim čvorovima imale su značajno veću ekspresiju TIMP1 u tumorskom tkivu u odnosu na pacijentkinje bez zahvaćenih limfnih čvorova. Obzirom da se klinički stadijumi definišu

na osnovu veličine tumora i broja zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova, navedeni rezultati se mogu očekivati. Wu sa saradnicima je pokazao da je ekspresija TIMP1 proteina u tumorima povezana sa kliničkim stadijumom i zahvaćenošću limfnih čvorova (Wu i sar., 2008), što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Međutim, u navedenoj studiji nije utvrđena povezanost između veličine tumora i ekspresije TIMP1 u tumorima. U navedenoj studiji ekspresija TIMP1 je merena metodom imunohistohemije, što objašnjava razliku u rezultatima između njihovog i našeg istraživanja. Svi navedeni rezultati sugerišu da je TIMP1 uključen u procese invazije i metastaziranja tumora i da se može koristiti kao parametar stažiranja bolesti.

Biologija karcinoma dojke sa negativnim steroidnim hormonskim statusom se sve više istražuje (Weigelt i Reis-Filho, 2009). Međutim, naša istraživanja su pokazala da nema statistički značajne razlike u ekspresiji TIMP1 u tumorskim tkivima kod pacijentkinja sa negativnim i pozitivnim steroidnim receptorskim statusom, iako su pacijentkinje sa negativnim statusom imale veću ekspresiju TIMP1. Druge studije su dobile rezultate slične našim, naime nije bilo povezanosti ER ili PR sa ekspresijom TIMP1, iako su pacijentkinje sa ER negativnim receptorima imale veći nivo ekspresije TIMP1 (Wu i sar., 2008).

HER2 kao značajan parametar prognoze pacijentkinja sa karcinomom dojke ispitivali smo u odnosu na ekspresiju TIMP1. U našim istraživanjima nismo našli statistički značajnu razliku u ekspresiji TIMP1 između HER2 pozitivnih i negativnih tumora, iako su pacijentkinje sa HER2 pozitivnim tumorima imale povećani nivo ekspresije TIMP1. Naši rezultati su u saglasnosti sa prethodno publikovanim istraživanjima, koja su takodje pokazala da nema razlike u ekspresiji TIMP1 kod HER2 pozitivnih i negativnih tumora (Wurtz i sar., 2008, Wu i sar., 2008). Povezanost ekspresije TIMP1 povezana sa progresijom bolesti, ali ne i sa ER, PR ili HER2 receptorima, sugeriše da TIMP1 može biti nezavisni marker progresije bolesti kod pacijentkinja sa karcinomom dojke.

Bazaloidni karcinomi dojke imaju agresivniju angiogenezu u odnosu na ostale tipove karcinoma dojke zbog čega predstavljaju karcinome sa najlošijom prognozom (Weigelt i Reis-Filho, 2009). Druge studije nisu ispitivale ekspresiju TIMP1, molekula koji pomaže angiogenezu, u tumorskim tkivima kod bazaloidnih u poredjenju sa luminalnim A tumorima. Naša istraživanja su pokazala da bazaloidni tumori pokazuju povećanu

ekspresiju TIMP1 u poredjenju sa luminalnim A tumorima, iako razlika nije bila statistički značajna. Međutim, grupa pacijentkinja sa bazaloidnim karcinomima dojke u našem istraživanju je bila mala, što može biti objašnjenje za odsustvo statističke značajnosti.

Pokazano je da fibroblasti i ćelije strome uglavnom produkuju TIMP1 (Jones i sar., 1999). Obzirom da ekspresija TIMP1 u peritumorskom tkivu, iako manja u poredjenju sa tumorskim, i dalje ima značajan nivo ekspresije, što nam sugerise da peritumorsko tkivo ne igra pasivnu ulogu u progresiji karcinoma dojke. Podaci ukazuju da su promene u stromi, kao i interakcija izmedju tumorskog i peritumorskog tkiva povezane sa procesima tumorigeneze, invazije i metastaziranja. Pokazano je da inkubacija ćelija karcinoma dojke sa monocitima i makrofagima dovodi do povećanja ekspresije molekula uključenih u invaziju ćelija kancera dojke (Wurtz i sar., 2008). Tumori sekretuju proteine koji pomažu proces „zaceljivanja rana“ što dovodi do progresije tumora. Različito biološko delovanje ćelija strome delimično zavisi od ekspresije TIMP1 i MMP-2 i MMP-9.

Naši rezultati pokazuju da TIMP1 može biti razmatran kao marker dijagnoze i stažiranja pacijentkinja sa karcinomom dojke. TIMP1 predstavlja multifunkcionalni protein koji obzirom na svoje stimulišuće efekte na tumor, može biti meta za nove terapeutike za karcinom dojke.

Identifikacija molekularnih biomarkera u karcinomu dojke koji bi omogućili sigurniju procenu rizika i prognoze ovih pacijenata, kao i identifikacija ciljnih molekula za terapeutike, predstavljaju važne ciljeve u lečenju ove bolesti. STAT3 se sve više ispituje u karcinomu dojke jer je pokazano da je uključen u inhibiciju apoptoze, proliferaciju, indukciju proliferacije i angiogeneze i izbegavanje imunskog odgovora. U našem istraživanju pokazali smo da maligno tkivo dojke ima statistički značajno veći nivo ekspresije pSTAT3 proteina u odnosu na okolno peritumorsko tkivo. Naš rezultat je u saglasnosti sa prethodno publikovanim studijama koje su pokazale da je nivo ekspresije pSTAT3 u tumorskom tkivu dojke, meren imunohistohemijom, visoko statistički značajan u poredjenju sa okolnim normalnim tkivom (Berclaz i sar., 2001; Diaz i sar., 2006). Posledice STAT3 aktivacije u normalnim i malignim ćelijama su različite. Naš rezultat sugerise da aktivacija STAT3 može biti dijagnostički marker za karcinom dojke.

U ovom istraživanju pokazali smo da nema statistički značajne razlike u ekspresiji pSTAT3 u tumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke u različitim kliničkim stadijumima. U saglasnosti sa navedenim rezultatom, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji pSTAT3 u tumorima kod pacijentkinja sa različitom veličinom tumora. Takodje, nije bilo razlike u ekspresiji pSTAT3 u tumorskom tkivu između pacijentkinja sa metastatskim limfnim čvorovima i onih bez zahvaćenih limfnih čvorova. Takodje, slične rezultate je dobio Berclaz sa saradnicima, iako je pSTAT3 ekspresija praćena imunohistohemijom (Berclaz i sar., 2001). Obzirom da nema povezanosti između ekspresije pSTAT3 sa veličinom tumora i zahvaćenošću limfnih čvorova, moguće je da se aktivacija STAT3 puta dešava rano u procesu nastanka kancera dojke.

Poslednjih godina pokazano je da je STAT3 onkogen koji je konstitutivno eksprimiran u karcinomu dojke (Dolled-Filhart i sar., 2003). Pored toga, pokazano je da Src kinaze delimično aktivirajući STAT3 transformišu ćelije porekla epitela dojke (Diaz i sar., 2006). Sa druge strane, aktivacija Src je odgovorna za HER2 posredovani migratorni potencijal ćelija kancera dojke. Druge studije su pokazale da HER2 aktivira STAT3 signalni put (Proietti i sar., 2009). U našem istraživanju, pacijentkinje sa karcinomom dojke sa prekomernom ekspresijom HER2 imaju značajno veću ekspresiju pSTAT3 u poredjenju sa pacijentkinjama sa HER2 negativnim receptorskim statusom. Diaz N sa saradnicima je dobio rezultate slične našim, pokazavši značajno veći nivo ekspresije pSTAT3 i Src kod pacijentkinja sa HER2 pozitivnim tumorima u poredjenju sa HER2 negativnim pacijentkinjama (Diaz i sar., 2006).

Druge studije su pokazale da su PR i ER pozitivnost tumorskih linija kancera dojke povezane sa aktivacijom STAT3 (Diaz i sar., 2006). Iz tih razloga, ispitivali smo ekspresiju pSTAT3 kod pacijentkinja sa karcinomom dojke sa pozitivnim i negativnim steroidnim receptorskim statusom i pokazali da obe grupe pacijentkinja imaju isti nivo ekspresije pSTAT3. Naš rezultat je u saglasnosti sa drugim istraživanjima, koja su merila ekspresiju pSTAT3 metodom imunohistohemije, posebno u jedru i posebno u citoplazmi (Sato i sar., 2011). Treba imati u vidu da su naši rezultati dobijeni metodom imunoblota, iako i imunohistohemija i imunoblot predstavljaju semikvantitativne metode.

Kao novi prediktivni marker pSTAT3 je ispitivan u nekoliko studija. Pokazano je da ekspresija pSTAT3 u ćelijskom lizatu tumorskih ćelija korelira sa boljim

preživljavanjem, većim procentom petogodišnjeg preživljavanja u grupi karcinoma dojke sa niskim gradusom diferencijacije (Berclaz i sar., 2001; Sato i sar., 2011). Prema novoj molekularnoj klasifikaciji pokazano je da luminalni A tumori imaju najbolju prognozu, kao i najbolji odgovor na hemioterapiju (Weigelt i Reis-Filho, 2009). U našem istraživanju uočeno je da luminalni A tumori imaju statistički značajno veći nivo ekspresije pSTAT3 u poredjenju sa pacijentkinjama sa bazaloidnim tipom tumora. Naši rezultati ukazuju da je aktivacija STAT3 karakteristika luminalnog A tipa tumora, tumora sa manjim invazivnim i metastatskim potencijalom. Na osnovu navedenih rezultata proizilazi zaključak da aktivacija STAT3 signalnog puta ima ulogu u procesima kancerogeneze, regulacije apoptoze i proliferacije ćelija kancera dojke, ali da je veći nivo ekspresije pSTAT3 povezan sa manje agresivnim luminalnim A tumorima dojki, koji su povezani sa boljim preživljavanjem. U tom smislu, novosintetisani inhibitori STAT3 signalnog puta mogli bi naći primenu u terapiji pacijentkinja sa luminalnim A i HER2 pozitivnim karcinomima dojki.

Bcl-2 je protein lociran u citoplazmi koji je uključen u procese ćelijske smrti i nastanka tumora; omogućava preživljavanje ćelija van deobe i sprečava deobu ćelija. Tokom razvoja organizma, Bcl-2 je eksprimiran u svim tkivima, dok je kod odraslih eksprimiran samo u proliferišućim ćelijama (Green, 2005). Kada je u pitanju kancer dojke, Bcl-2 je generalno eksprimiran u 60-80% invazivnog kancera dojke (Zhang i sar., 1997). U uzorcima kancera dojke, Bcl-2 ekspresija je povezana sa dobro diferentovanim kancerima dojke i niskim proliferativnim statusom (Green, 2005). Nekoliko studija sugerišu da izbegavanje ćelijske smrti, uzrokovano povećenom ekspresijom Bcl-2, omogućava akumulaciju genskih mutacija koje mogu biti važne za metastatski potencijal kancera dojke (Sierra i sar., 2000).

U našem istraživanju smo pokazali da je ekspresija Bcl-2 značajno veća u peritumorskom u poredjenju sa tumorskim tkivom pacijentkinja sa kancerom dojke. Zhang sa saradnicima je takodje pokazao da je ekspresija Bcl-2 veća u peritumorskom tkivu, ali i češća (100%) u odnosu na tumorsko (79%) (Zhang i sar., 1997). U saglasnosti sa prethodnom studijom, naši rezultati su pokazali da je procenat ekspresije Bcl-2 u peritumorskom tkivu (100%) bio veći u poredjenju sa tumorskim (89%). Publikovane studije su pokazale da dolazi do značajnog smanjenja Bcl-2 tokom evolucije od zdravih



ćelija epitela dojke kancera i od intraduktalnih kancera do invazivnih kancera dojke (Gee i sar., 1994; Zhang i sar., 1997). Navedeni rezultati ukazuju da je niži nivo ekspresije Bcl-2 povezan sa procesima kancerogeneze i progresije kancera dojke.

Naši rezultati su pokazali da nije bilo razlike u ekspresiji Bcl-2 u tumorskom tkivu izmedju različitih stadijuma bolesti, iako su pacijentkinje u uznapredovalom III stadijumu imale niži nivo ekspresije Bcl-2. Takodje, nije bilo razlike u ekspresiji Bcl-2 izmedju tumora različite veličine, kao i izmedju pacijentkinja sa tumorskim ćelijama infiltrisanim i neinfiltisanim limfnim čvorovima. Slični rezultati prikazani su u prethodno publikovanoj studiji (Zhang i sar., 1997). U jednoj studiji koja je radjena na velikom broju ispitanica pokazano je da su tumori manje veličine bili povezani sa nižom Bcl-2 ekspresijom (Callagy i sar., 2006). Mehanizam negativne regulacije Bcl-2 tokom progresije kancera dojke i dalje je nepoznat. Utvrđeno je da je ekspresija Bcl-2 negativno regulisana protonkogenom p53. In vitro sudije su pokazale da mutant p53 može smanjiti transkripciju Bcl-2 vezujući se za Bcl-2 promotor (Zhang i sar., 1997).

Analiza ekspresije Bcl-2 pokazala je da su pacijentkije sa pozitivnim ER i/ili PR receptorima imale značajno veći nivo ekspresije Bcl-2 u tumorskom tkivu u poredjenju sa pacijentkinjama sa negativnim hormonskim receptorima. Naši rezultati su u saglasnosti sa prethodno publikovanim studijom koja je pokazala da je Bcl-2 ekspresija povezana sa ER pozitivnim pacijentkinjama koje su imale nezahvaćene limfne čvorove (Yang i sar., 1999). Podaci iz literature pokazuju da nedostatak polnih steroidnih hormona stimuliše apoptozu u ćelijama kancera dojke (Krajewski i sar., 1999). Takodje, pokazano je da estrogen može da poveća ekspresiju Bcl-2 u ER-pozitivnim ćelijskim linijama kancera dojke. Ubrzavanje ćelijske smrti povezano je sa gubitkom Bcl-2 kod hormonski negativnih tumora dojki. Podaci ukazuju da ekspresija Bcl-2 ima značajnu ulogu u biologiji ER zavisnih kancera dojki. Naši rezultati sugerišu, imajući u vidu povezanost hormonski pozitivnih tumora sa ekspresijom Bcl-2, da bi ispitivanje ekspresije Bcl-2 bio značajan parametar u stratifikaciji pacijentkinja sa pozitivnim steroidnim hormonskim statusom.

Nasuprot hormonski zavisnim tumorima, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji Bcl-2 u tumorima izmedju pacijentkinja sa HER2 pozitivnim i negativnim tumorima, iako su HER2 zavisni tumori imali niži nivo ekspresije Bcl-2. Rezultati slični našim

dobijeni su u studiji koja je pokazala da nije bilo povezanosti između Bcl-2 ekspresije i HER2 ekspresije (Callagy i sar., 2006). Jedno od objašnjenja je da je Bcl-2 ekspresija nezavisna od HER2 aktivnosti. Dodatna ispitivanja signalnih puteva u budućnosti će razjasniti ulogu Bcl-2 u HER2 zavisnim tumorima dojki.

Ekspresija Bcl-2 kao što je već rečeno, predstavlja značajan marker prognoze i predikcije i njegova povećana ekspresija je povezana sa desetogodišnjim preživljavanjem pacijentkinja sa kancerom dojke. Takođe, pacijentkinje sa luminalnim A tumorima predstavljaju najpovoljniju prognostičku grupu, kako je pokazano u više studija. Naši rezultati su pokazali da pacijentkinje sa luminalnim A tumorima imaju značajno veći nivo ekspresije Bcl-2 u poredjenju sa bazaloidnim tumorima. Laurinavicius sa saradnicima je pokazala slično našim rezultatima, povezanost luminalnih A tumora sa većom ekspresijom Bcl-2 na velikom broju ispitanica (Laurinavicius i sar., 2012). Naši rezultati sugerišu da je povećana ekspresija Bcl-2 uključena u patogenezu luminalnih A tumora sa dobrom prognozom.

Obzirom da je pokazano da je ekspresija Bcl-2 povezana sa dobro diferentovanim tumorima dojke, koji imaju niski proliferativni indeks, sa hormon-zavisnim tumorima i luminalnim A tumorima, može se zaključiti da je merenje ekspresije Bcl-2 kod lokoregionalnih pacijentkinja sa kancerom dojke značajan parametar u određivanju grupa pacijentkinja sa manjim stepenom rizika.

Pokazano je da je gen za CDND1 amplifikovan u 15-20% tumorskih tkiva, dok je ekspresija ciklina D1 prisutna u 50% tumora kancera dojki (Reis-Filho i sar., 2006). U našem istraživanju ciklin D1 je detektovan u 60% slučajeva metodom imunoblota. U svim publikovanim istraživanjima korišćena je metoda imunohistohemije dok smo mi koristili metodu imunoblota, što može biti objašnjenje za razliku u procentu detektovanja ciklina D1. Pored toga, pokazali smo da tumorsko tkivo ima veći nivo ekspresije ciklina D1 u poredjenju sa peritumorskim tkivom ispitivanih pacijentkinja. Slične rezultate, dobio je Lin H sa saradnicima pokazavši značajno veći nivo ekspresije ciklina D1 u malignim lezijama u poredjenju sa okolnim peritumorskim tkivima (Lin i sar., 2013). Takođe, dokazano je da se povećana ekspresija ciklina D1 nalazi u tkivima raznorodnih kancera kao što su karcinom pluća, bešike, larinksa, ovarijuma u poredjenju sa

peritumorskim tkivima (Barnes, 1997). Iako uloga ciklina D1 nije potpuno razjašnjena, rezultati ukazuju da ima važnu ulogu u kontroli rasta tumora.

U našem istraživanju pokazali smo da sa povećanjem kliničkog stadijuma nivo ekspresije ciklina D1 se smanjuje. Naši rezultati su slični prethodno publikovanoj studiji u kojoj je pokazano da je povećana ekspresija ciklina D1 povezana sa manjom veličinom tumora (Lee i sar., 2007). Smanjenje ekspresije ciklina D1 sa povećanjem kliničkog stadijuma karcinoma dojke je nov rezultat, jer do sada nijedna studija nije ispitivala klinički stadijum u odnosu na ekspresiju ciklina D1. Nasuprot veličini tumora, u našem istraživanju nije bilo razlike u ekspresiji nivoa ciklina D1 između pacijentkinja sa tumorom infiltrisanim i neinfiltrisanim limfnim čvorovima. Druge studije su pokazale da nema povezanosti između ekspresije ciklina D1 i statusa limfnih čvorova (Lin i sar., 2013; Lee i sar., 2007). Navedeni rezultati sugerišu da se ekspresija i aktivacija ciklina D1 dešava u ranom lokoregionalnom kanceru dojke.

Pokazano je u *in vivo* i *in vitro* studijama da ciklin D1 posreduje u proliferaciji ćelija epitela dojke indukovanoj estrogenom i progesteronom, što je veoma važno za proliferaciju ćelija kancera dojke (Yang i sar., 1999). Takođe, istraživanja su pokazala da pacijentkinje sa povećanom ekspresijom ciklina D1 i ER u tumorima imaju bolji odgovor na Tamoksifen u poredjeju sa pacijentkinjama koje nemaju eksprimiran ciklin D1 (Lin i sar., 2013). Iz tih razloga, ispitivali smo ekspresiju ciklina D1 i pokazali da pacijentkinje sa pozitivnim estrogenskim i progesteronskim receptorima imaju značajno veću ekspresiju u poredjenju sa pacijentkinjama sa negativnim steroidnim hormonskim receptorima. Naša istraživanja su u saglasnosti sa nekoliko publikovanih studija koje su pokazale povezanost ekspresije ciklina D1 sa pozitivnošću estrogenskih i progesteronskih receptora kod pacijentkinja sa kancerom dojki (Lin i sar., 2013; Lee i sar., 2007). Pokazano je da se ciklin D1 vezuje za ER zajedno sa kofaktorom SRC-1 i aktivira ga (Watts i sar., 1995). Pored toga, estrogeni aktiviraju ciklin D1 preko povećanja transkripcije gena za ciklin D1 (Barnes, 1997). Iz tih razloga, naši rezultati ukazuju na udruženost ekspresije ciklina D1 sa prognostički povoljnijim podtipom karcinoma dojke, tumora male veličine sa pozitivnim steroidnim receptorima.

Ciklin D1 je glavna meta HER2 zavisnog signalnog puta i ciklin D je važan za delovanje HER2. Lenferink je sa saradnicima pokazao da aktivirani HER2 može povećati

transkripciju gena za ciklin D1 preko Ras/MAPK signalnog puta (Lenferink i sar., 2001). Pored toga, aktivirani HER2 može zaustaviti razgradnju ciklina D1 preko PI3K/Akt signalnog puta (Lee i sar., 2007). Uzimajući navedene podatke u obzir, očekivali bi povećanu ekspresiju kod HER2 pozitivnih pacijentkinja. Međutim, u našem istraživanju nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji između HER2 pozitivnih i negativnih pacijentkinja sa karcinomom dojke. Lee A sa saradnicima je pokazao povezanost ekspresije ciklina D1 sa pozitivnošću HER2 receptora pacijentkinja sa karcinomom dojke (Lee i sar., 2007). Većina drugih autora nije pokazala povezanost ekspresije HER2 sa ekspresijom ciklina D1 u tumorskom tkivu ovih bolesnica (Lin i sar., 2013; Reis-Filho i sar., 2006). U našoj grupi pacijentkinja veoma mali broj pacijentkinja su bile HER2 pozitivne (n=9), čime se može objasniti nedostatak značajnosti u razlici ekspresije ciklina D1 između HER2 pozitivnih i negativnih pacijentkinja.

Nova molekularna klasifikacija karcinoma dojke dovela je do razvoja novih mogućih panela markera u cilju definisanja visoko rizičnih grupa bolesnica. Pokazano je da su bazaloidni karcinomi, grupa najagresivnijih karcinoma, povezani sa niskom ekspresijom ciklina D1 i da ovi karcinomi nemaju amplifikaciju CCND1 gena (Reis-Filho i sar., 2006). Naši rezultati su u saglasnosti sa publikovanim rezultatima jer smo pokazali da luminalni A tumori imaju statistički značajno veći nivo ekspresije ciklina D1 u poredjenju sa bazaloidnim tumorima. Navedeni rezultati sugerišu da nedovoljna ekspresija ciklina D1 omogućava razvoj agresivnog bazaloidnog karcinoma dojke.

Utvrđeno je da pacijentkinje sa povećanom ekspresijom ciklina D1 i ER u tumorima pokazuju kompletan odgovor na Tamoksifen, zbog čega se ekspresija ciklina D1 može koristiti u rutinskoj praksi (Lundgren i sar., 2012). Takođe, pacijentkinje sa visokom ekspresijom ciklina D1 imaju veću stopu preživljavanja u odnosu na one sa niskom ekspresijom ciklina D1 (Quintayo i sar., 2012). Ekspresija ciklin D1 u tumorskom tkivu jeste povoljan prediktivni parametar bolesnica sa karcinomom dojke, udružen sa fenotipom nižeg malignog potencijala tumora dojki (luminalni A tumori), pozitivnošću steroidnih hormonskih receptora i manjom veličinom tumora. Takođe, ciklin D1 može biti meta za nove terapeutike, čijim bi se povećanjem omogućila transformacija karcinoma u manje invazivne, sa boljim odgovorom na terapiju i dugim preživljavanjem.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Aktivnost LDH se povećava uporedo sa povećanjem stadijuma bolesti što ukazuje da bi aktivnost LDH mogla biti korišćena u kliničkoj praksi kao marker stadijuma bolesti pacijentkinja sa karcinomom dojke.

-LDH 5 izoenzim je detektovan samo u tkivu karcinoma dojke, dok peritumorsko tkivo nema navedeni izoenzim

- Veća aktivnost LDH u tumorima pacijentkinja sa HER2 negativnim receptorima sugeriše da LDH aktivnost u tumorima nije regulisana aktivacijom HER2.

2. Aktivnost MDH i m-MDH je statistički značajno veća u tumorskom tkivu u poredjenju sa peritumorskim tkivom pacijentkinja sa karcinomom dojke.

-Veću relativnu aktivnost MDH u tumoru imaju pacijentkinje sa infiltrisanim LČ u odnosu na pacijentkinje sa neinfiltrisanim LČ aktivnost, što nam ukazuje da bi aktivnost MDH mogla pomoći u stratifikaciji pacijentkinja sa karcinomom dojke sa lošom prognozom.

3. Aktivnost CAT i m-SOD je statistički značajno veća u tumorskom tkivu u poredjenju sa peritumorskim tkivom pacijentkinja sa karcinomom dojke.

-Pacijentkinje sa HER pozitivnim receptorskim statusom imaju statistički značajno veću prosečnu aktivnost SOD u poredjenju sa HER2 negativnim pacijentkinjama.

Naši rezultati ukazuju da povećanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite udruženo sa razvojem karcinoma dojke omogućava selektivan rast i umnožavanje tumorskih ćelija u poredjenju sa okolnim peritumorskim ćelijama.

4. Povećani denzitet parenhima (struktura dojki ACR3 i ACR4) povezan je sa aktivnošću LDH enzima, važnih u patogenezi i progresiji karcinoma dojke, u tumorskom tkivu.

-Pacijentkinje sa senkama i spikuliranim senkama na mamogramima imaju veću aktivnost LDH u tumorskom tkivu u poredjenju sa pacijentkinjama koje su imale fokalnu asimetriju ili narušenu arhitektoniku.

-Aktivnost LDH, pokazatelja anaerobnog metabolizma, statistički značajno se povećava, a aktivnost CAT značajno smanjuje sa povećanjem BIRADS kategorije, što sugeriše da tumori klasifikovani kao BIRADS 5 imaju agresivniji fenotip.

5. Prosečne aktivnosti proMMP-2, aMMP-2, proMMP-9 i aMMP-9 su veće u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na aktivnost u peritumorskom tkivu.

- Povećanje aktivnosti MMP-2 i MMP-9 u tumorskom tkivu sa povećanjem kliničkog stadijuma sugeriše da bi navedeni enzimi mogli biti korišćeni u kliničkoj praksi kao markeri stadijuma pacijentkinja sa karcinomom dojke.

- Povećanje aktivnosti aMMP-2 i aMMP-9 kod pacijentkinja sa negativnim steroidnim receptorima

- Bazaloidni tumori, sa agresivnijom angiogenezom imaju povećanu aktivnost proMMP-2 u tumorskom, odnosno aMMP-2 u peritumorskom tkivu što ukazuje da MMP-2 učestvuje u hematogenom širenju bazaloidnog karcinoma dojke.

6. Ekspresija TIMP1 je veća u tumorskom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke u odnosu na njegovu ekspresiju u odgovarajućem peritumorskom tkivu.

-Povećanje ekspresije TIMP1 u tumorskom tkivu sa povećanjem kliničkog stadijuma pacijentkinja sa karcinomom dojke sugeriše da je TIMP1 uključen u procese invazije i metastaziranja tumora i da se može koristiti kao parametar stažiranja bolesti.

7. Ekspresija pSTAT3 proteina je veća u tumorskom u odnosu na okolno peritumorsko tkivo i sugeriše da aktivacija STAT3 može biti dijagnostički marker za karcinom dojke

-Veći nivo ekspresije pSTAT3 povezan je sa HER2 pozitivnim i luminalnim A tumorima dojki, koji su povezani sa boljim preživljavanjem.

8. U našem istraživanju smo pokazali da je ekspresija Bcl-2 značajno veća u peritumorskom u poredjenju sa tumorskim tkivom pacijentkinja sa kancerom dojke.

-Ekspresija Bcl-2 je veća kod hormon-zavisnih i luminalnih A tumora, što dovodi do zaključka da je merenje ekspresije Bcl-2 kod lokoregionalnih pacijentkinja sa kancerom dojke značajan parametar u određivanju grupa pacijentkinja sa manjim stepenom rizika.

9. Ekspresije ciklina D1 je veća u tumorskom tkivo u poredjenju sa peritumorskim tkivom.

-Ekspresija ciklin D1 u tumorskom tkivu je povoljan parametar bolesnica sa karcinomom dojke, udružen sa fenotipom nižeg malignog potencijala tumora dojki (luminalni A tumori), pozitivnošću steroidnih hormonskih receptora i manjom veličinom tumora.

Takodje, ciklin D1 može biti meta za nove terapeutike, jer bi se modulacijom ekspresije omogućila transformacija karcinoma u manje invazivne, sa boljim odgovorom na terapiju i dugim preživljavanjem.

## 7. LITERATURA

- Ali HR, Dawson SJ, Blows FM, Provenzano E, Pharoah PD, Caldas C. Cancer stem cell markers in breast cancer: pathological, clinical and prognostic significance. *Breast Cancer Res* 2011; 13(6):R118.
- Balinsky D, Greengard O, Cayanis E, Head JF. Enzyme activities and isozyme patterns in human lung tumors. *Cancer Res* 1984; 44(3):1058-62.
- Balinsky D, Platz CE, Lewis JW. Enzyme activities in normal, dysplastic, and cancerous human breast tissues. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72(2):217-24.
- Balinsky D, Platz CE, Lewis JW. Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues. *Cancer Res* 1983; 43(12 Pt 1):5895-901.
- Banerjee S, Smith IE. Management of small HER2-positive breast cancers. *Lancet Oncol* 2010; 11(12):1193-9.
- Barbareschi M, Caffo O, Veronese S, Leek RD, Fina P, Fox S et al. Bcl-2 and p53 expression in node-negative breast carcinoma: a study with long-term follow-up. *Hum Pathol* 1996; 27(11):1149-55.
- Barnes DM. Cyclin D1 in mammary carcinoma. *J Pathol* 1997; 181(3):267-9.
- Basu AK, Marnett LJ. Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis* 1983; 4:331-3.
- Bates S, Peters G. Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene. *Semin Cancer Biol* 1995; 6(2):73-82.
- Bauer G. Tumor cell-protective catalase as a novel target for rational therapeutic approaches based on specific intercellular ROS signaling. *Anticancer Res* 2012; 32(7):2599-624.
- Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Siragusa A, Dreher E, Smith PD. EGFR dependent expression of STAT3 (but not STAT1) in breast cancer. *Int J Oncol* 2001; 19(6):1155-60.



- Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1198:11.
- Boyd NF, Martin LJ, Yaffe MJ, Minkin S. Mammographic density and breast cancer risk: current understanding and future prospects. *Breast Cancer Res* 2011; 13(6):223.
- Boyd NF, McGuire V. Evidence of lipid peroxidation in premenopausal women with mammographic dysplasia. *Cancer Lett* 1990; 50: 31-7.
- Boyd NF, Melnichouk O, Martin LJ, Hislop G, Chiarelli AM, Yaffe MJ, et al. Mammographic density, response to hormones, and breast cancer risk. *J Clin Oncol* 2011; 29(22): 2985-92.
- Boyd NF, Rommens JM, Vogt K, Lee V, Hopper JL, Yaffe MJ et al. Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer. *Lancet Oncol* 2005; 6(10):798-808.
- Boyd NF. Tamoxifen, mammographic density and breast cancer prevention. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(9): 704-5.
- Bracke ME, van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213(Pt 1):123.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–54.
- Brand KA, Hermfisse U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J* 1997; 11:388–395.
- Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005; 23(29):7350-60.
- Brown NS, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3(5):323-7.

- Brummer O, Athar S, Riethdorf L, Löning T, Herbst H. Matrix-metalloproteinases 1, 2, and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch* 1999; 435(6):566-73.
- Burnside ES, Sickles EA, Bassett LW, Rubin DL, Lee CH, Ikeda DM, et al. The ACR BI-RADS experience: learning from history. *J Am Coll Radiol* 2009; 6(12): 851-60.
- Caldon CE, Swarbrick A, Lee CS, Sutherland RL, Musgrove EA. The helix-loop-helix protein Id1 requires cyclin D1 to promote the proliferation of mammary epithelial cell acini. *Cancer Res* 2008; 68(8):3026-36.
- Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J et al. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res* 2006; 12(8):2468-75.
- Calo V, Migliavacca M, Bazan Vet al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003; 197(2):157-68.
- Chabottaux V, Sounni NE, Pennington CJ, English WR, van den Brule F, Blacher S, Gilles C, Munaut C, Maquoi E, Lopez-Otin C, Murphy G, Edwards DR, Foidart JM, Noel A. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res* 2006; 66(10):5165-72.
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66(17):8319-26.
- Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22(53):8590-607.
- Cunningham VR, Phillips J, Field EJ. Lactic dehydrogenase isoenzymes in normal and pathological spinal fluids. *J Clin Pathol* 1965; 18(6):765-70.
- Curtis CD, Thorngren DL, Nardulli AM. Immunohistochemical analysis of oxidative stress and DNA repair proteins in normal mammary and breast cancer tissues. *BMC Cancer* 2010; 10:9.
- Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J et al. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular

- subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer* 2010; 103(5):668-75.
- De Berardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 2008; 7; 11-20.
  - Devita VT, Hellman S, Rosenberg S A. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 6<sup>th</sup> edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
  - Diaz N, Minton S, Cox C, Bowman T, Gritsko T, Garcia R et al. Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin Cancer Res* 2006; 12(1):20-8.
  - Dolled-Filhart M, Camp RL, Kowalski DP, Smith BL, Rimm DL. Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(2):594-600.
  - Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3(11):991-8.
  - Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(11):3892-9.
  - Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006; 9(6):425-34.
  - Fantl V, Creer A, Dillon C, Bresnick J, Jackson D, Edwards P et al. Fibroblast growth factor signalling and cyclin D1 function are necessary for normal mammary gland development during pregnancy. A transgenic mouse approach. *Adv Exp Med Biol* 2000; 480:1-7.
  - Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res* 2011; 17(18):6012-20.

- Flohe L, Otting F. Oxygen radicals in biological systems. *Methods in Enzymol* 1984; 37:93-104.
- Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994; 269(24):16766-73.
- Frieden CJ, Fernandez S. Kinetic studies on pig heart cytoplasmic malate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1975; 250:2106-13.
- Fu L, Tsuchiya S, Matsuyama I, Ishii K. Clinicopathologic features and incidence of invasive lobular carcinoma in Japanese women. *Pathol Int* 1998; 48:348–54.
- Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Willsher P, McClelland RA, Hoyle HB et al. Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* 1994;59(5):619-28.
- Gonzalez LO, Corte MD, Vazquez J, Junquera S, Sanchez R, Viña A, Rodriguez JC, Lamelas ML, Vizoso F. Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast. *Histopathology* 2008; 53(4):403-15.
- Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H et al. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res* 2004; 566(1):9-20.
- Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 2005; 121(5):671-4.
- Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:816–26.
- Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet* 2000; 355(9210):1179-80.
- Haura EB, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2(6):315-24.
- Hennipman A, Smits J, van Oirschot B, van Houwelingen JC, Rijksen G, Neyt JP, Van Unnik JA, Staal GE. Glycolytic enzymes in breast cancer, benign breast disease and normal breast tissue. *Tumour Biol* 1987; 8(5):251-63.

- Hirose K, Longo DL, Oppenheim JJ, Matsushima K. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. *FASEB J* 1993; 7(2):361-8.
- Hirvonen R, Talvensari-Mattila A, Pakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) in T (1-2) N0 breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77:85-91.
- Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005; 87(3):307-14.
- Hong CC, Tang BK, Rao V, Agarwal S, Martin L, Tritchler D et al. Cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) activity, mammographic density, and oxidative stress: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res* 2004; 6(4):R338-51.
- Hornebeck W, Emonard H, Monboisse JC, Bellon G. Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2002; 12:231-41.
- Jaganjac M, Cacev T, Cipak A, Kapitanović S, Gall Troselj K, Zarković N. Even stressed cells are individuals: second messengers of free radicals in pathophysiology of cancer. *Croat Med J* 2012; 53(4): 304-9.
- Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G et al. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med* 2006; 10(2):499-510.
- Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G et al. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med* 2006; 10(2):499-510.
- Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 1999; 189(2):161-8.
- Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J* 2006; 25(17):3934-42.

- Kang DH. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *AACN Clin Issues* 2002; 13(4):540-9.
- Kattan Z, Minig V, Leroy P, Dauça M, Becuwe P. Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 108(2):203-15.
- Kelner MJ, Bagnell R. Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, and glutathione transferase activity in cells transfected with a copper-zinc superoxide dismutase expression vector. Explanation for variations in paraquat resistance. *J Biol Chem* 1990; 265(19):10872-5.
- Konjević G, Jurisić V, Spuzić I (2001) Association of NK cell dysfunction with changes in LDH characteristics of peripheral blood lymphocytes (PBL) in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 66(3):255-63.
- Konjević G, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Radenković S. Novel aspects of in vitro IL-2 or IFN- $\alpha$  enhanced NK cytotoxicity of healthy individuals based on NKG2D and CD161 NK cell receptor induction. *Biomed Pharmacother* 2010; 64(10):663-71.
- Konjević G, Radenkovic S, Srdic T, Jurisic V, Stamatovic Lj, Milovic M. Association of decreased NK cell activity and IFN $\gamma$  expression with pSTAT dysregulation in breast cancer patients. *J BUON* 2011; 16(2):219-26.
- Konjević G. STAT proteins in cancerogenesis and therapy of malignancies. *Srp Arh Celok Lek* 2009; 137(1-2):98-105.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis V, Gatter KC et al. Tumour and Angiogenesis Research Group. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 2003; 89(5):877-85.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E; Tumour and Angiogenesis Research Group. Lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5: differential expression by neoplastic and stromal cells in non-small cell lung cancer and other epithelial malignant tumors. *Tumour Biol* 2003; 24(4):199-202.

- Koukourakis MI, Kontomanolis E, Giatromanolaki A, Sivridis E, Liberis V. Serum and tissue LDH levels in patients with breast/gynaecological cancer and benign diseases. *Gynecol Obstet Invest* 2009; 67(3):162-8.
- Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, Pratt C, Howard B, Zapata JM et al. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6(1):29-40.
- Kumaraguruparan R, Subapriya R, Viswanathan P, Nagini S. Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clin Chim Acta* 2002; 325(1-2):165-70.
- LaRocca G, I Pucci-Minafra, A Marrazzo, P Taormina, S Minafra. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer patients sera. *British Journal of Cancer* 2004; 90:1414-21.
- Laufs S, Schumacher J, Allgayer H. Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle* 2006; 16:1760-71.
- Laurinavicius A, Laurinaviciene A, Ostapenko V, Dasevicius D, Jarmalaite S, Lazutka J. Immunohistochemistry profiles of breast ductal carcinoma: factor analysis of digital image analysis data. *Diagn Pathol* 2012; 7:27.
- Lee A, Park WC, Yim HW, Lee MA, Park G, Lee KY. Expression of c-erbB2, cyclin D1 and estrogen receptor and their clinical implications in the invasive ductal carcinoma of the breast. *Jpn J Clin Oncol.* 2007 Sep;37(9):708-14.
- Lenferink AE, Busse D, Flanagan WM, Yakes FM, Arteaga CL. ErbB2/neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways. *Cancer Res* 2001; 61(17):6583-91.
- Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS, *et al.* 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.
- Lin H, Huang JF, Qiu JR, Zhang HL, Tang XJ, Li H et al. Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2013; 94(1):73-8.

- Liu R, Oberley TD, Oberley LW. Transfection and expression of MnSOD cDNA decreases tumor malignancy of human oral squamous carcinoma SCC-25 cells. *Hum Gene Ther* 1997; 8(5):585-95.
- Lochter A, et al. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that lead to stable-epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 1997; 139:1861.
- Lundgren K, Brown M, Pineda S, Cuzick J, Salter J, Zabaglo L et al. Effects of cyclin D1 gene amplification and protein expression on time to recurrence in postmenopausal breast cancer patients treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *Breast Cancer Res* 2012; 14(2):R57.
- Martínez-Zaguilán R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ, Hendrix MJ. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14(2):176-86.
- Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999; 4:D339-45.
- Mazurek S, Eigenbrodt E. The tumor metabolome. *Anticancer Res* 2003; 23:1149–54.
- Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73:161–195.
- Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277(13):11069-76.
- Musrati RA, Kollárová M, Mernik N, Mikulášová D. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *Gen Physiol Biophys* 1998;17(3):193-210.
- Nakopoulou L, Giannopoulou I, Lazaris ACh, Alexandrou P, Tsirmpa I, Markaki S et al. The favorable prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 protein overexpression in breast cancer cells. *APMIS* 2003; 111(11):1027-36.



- Nakopoulou L, Giannopoulou I, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Tsirmpa I, Alexandrou P et al. Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *J Pathol* 2002; 197(3):307-13.
- Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005; 85(1):1-31.
- Plas DR, Thompson CB. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:75–78.
- Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 2006; 12(3):296-300.
- Proietti CJ, Rosembli C, Beguelin W, Rivas MA, Díaz Flaqué MC, Charreau EH et al. Activation of Stat3 by heregulin/ErbB-2 through the co-option of progesterone receptor signaling drives breast cancer growth. *Mol Cell Biol* 2009; 29(5):1249-65.
- Pucci-Minafra I, Minafra S, La Rocca G, Barranca M, Fontana S, Alaimo G, et al. Zymographic analysis of circulating and tissue forms of colon carcinoma gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) separated by mono- and two-dimensional electrophoresis. *Matrix Biol* 2001; 20(7):419-27.
- Puliti D, Zappa M. Breast cancer screening: are we seeing the benefit? *BMC Med* 2012; 10:106.
- Pusch O, Soucek T, Wawra E, Hengstschläger-Ottndad E, Bernaschek G, Hengstschläger M. Specific transformation abolishes cyclin D1 fluctuation throughout the cell cycle. *FEBS Lett* 1996; 385(3):143-8.
- Quintayo MA, Munro AF, Thomas J, Kunkler IH, Jack W, Kerr GR et al. GSK3 $\beta$  and cyclin D1 expression predicts outcome in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 136(1):161-8.
- Rahko E, Jukkola A, Melkko J, Paavo P, Bloigu R, Talvensaaari-Mattila A et al. 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(6):4247-53.

- Rahko E, Kauppila S, Pääkkö P, Blanco G, Apaja-Sarkkinen M, Talvensaari-Mattila A et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in benign and malignant breast tissue--strong expression in intraductal carcinomas of the breast. *Tumour Biol* 2009; 30(5-6):257-64.
- Rajneesh CP, Maimaran A, Sasikala KR and Adaikappan P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med J* 2008; 49(8):640.
- Ranuncolo SM, Armanasco E, Cresta C, Bal De Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 106(5):745-51.
- Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raina V, Ashok S, Husain SA. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000 Jan;59(2):163-70.
- Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB, James M, Steele D, Jones RL et al. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis. *Mod Pathol* 2006; 19(7):999-1009.
- Reis-Filho JS, Tutt A.N.J. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52:108–118.
- Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(6):345-55.
- Ripple MO, Henry WF. Prooxidant antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:40–8.
- Roland FB, Irwin WS. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952; 195:133-40.
- Ross CD, Gomaa MA, Gillies E, Juengel R, Medina JE. Tumor grade, microvessel density, and activities of malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, and hexokinase in squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122(2):195-200.

- Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res* 1994; 54(24):6517-25.
- Sato T, Neilson LM, Peck AR, Liu C, Tran TH, Witkiewicz A et al. Signal transducer and activator of transcription-3 and breast cancer prognosis. *Am J Cancer Res* 2011; 1(3):347-55.
- Schadendorf D, Zuberbier T, Diehl S, Schadendorf C, Czarnetzki BM. Serum manganese superoxide dismutase is a new tumour marker for malignant melanoma. *Melanoma Res* 1995; 5(5):351-3.
- Sekine I, Shimizu C, Nishio K, Saijo N, Tamura T. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with breast cancer. *Int J Clin Oncol*. 2009; 14(2):112-9.
- Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwala Z, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P, Zhong H. 'The metabolism of tumours': 70 years later. *Novartis Found Symp* 2001; 240:260-4.
- Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; 271(51):32529-37.
- Seo BK, Pisano ED, Kuzimak CM, Koomen M, Pavic D, Lee Y et al. Correlation of HER-2/neu overexpression with mammography and age distribution in primary breast carcinomas. *Acad Radiol*. 2006; 13(10):1211-8.
- Sierra A, Castellsague X, Escobedo A, Lloveras B, Garcia-Ramirez M, Moreno A et al. Bcl2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alterations: a pathway to metastatic progression in human breast cancer. *Int J Cancer*. 2000; 89:142-7.
- Skrzydlewska E, Stankiewicz A, Sulkowska M, Sulkowski S, Kasacka I. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *J Toxicol Environ Health* 2001; 64:213-22.

- 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(4):241-7.
- Strumilo S, Owiseniuk A, Radecka A, A. Tylicki. Comparison of malate dehydrogenase isozymes from the hare and rabbit heart. *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii* 2006; 42: 450–452.
- Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, Bashford CL. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med Today* 2000; 6(1):15-9.
- Sun M, Zigman S. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes using the method of adrenaline autooxidation. *Anal Biochem* 1978; 90:81-89.
- Tabar L, Tony Chen HH, Amy Yen MF, Tot T, Tung TH, Chen LS et al. Mammographic tumor features can predict long-term outcomes reliably in women with 1-14-mm invasive breast carcinoma. *Cancer* 2004;101(8):1745-59.
- Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T: Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89:1270-5.
- Thangaraju M, Rameshbabu J, Vasavi H, Ilanchezhian S, Vinitha R, Sachdanandam P. The salubrious effect of tamoxifen [correction of Tamaxifen] on serum marker enzymes, glycoproteins, and lysosomal enzymes level in breast cancer woman. *Mol Cell Biochem.* 1998; 185(1-2):85-94.
- Thomssen C, Jänicke F, Harbeck N. Clinical relevance of prognostic factors in axillary node-negative breast cancer. *Onkologie* 2003; 26(5):438-45.
- Townsend PA, Scarabelli TM, Davidson SM et al. STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(7):5811-20.
- Townson JL, Chambers AF. Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle* 2006; 5(16):1744-50.
- Tsanou E, Ioachim E, Briasoulis E, Damala K, Charchanti A, Karavasilis V et al. Immunohistochemical expression of superoxide dismutase (MnSOD) anti-oxidant enzyme in invasive breast carcinoma. *Histol Histopathol* 2004; 19(3):807-13.

- Turkson J. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* 2004; 8(5):409-22.
- Ursin G, Hovanessian-Larsen L, Parisky YR, Pike MC, Wu AH. Greatly increased occurrence of breast cancers in areas of mammographically dense tissue. *Breast Cancer Res.* 2005; 7(5):605-8.
- Van Kooten TG, Klein CL, Kirkpatrick CJ. Western blotting as a method for studying cell-biomaterial interactions: the role of protein collection. *J Biomed Mater Res* 2001; 54(3):385-9.
- Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 1996; 381(6584):713-6.
- Wang T, Niu G, Kortylewski M et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 2004; 10(1):48-54.
- Wang Y, Ikeda DM, Narasimhan B, Longacre TA, Bleicher RJ, Pal S et al. Estrogen receptor-negative invasive breast cancer: imaging features of tumors with and without human epidermal growth factor receptor type 2 overexpression. *Radiology* 2008; 246(2):367-75.
- Wang Y, Ikeda DM, Narasimhan B, Longacre TA, Bleicher RJ, Pal S. Estrogen receptor-negative invasive breast cancer: imaging features of tumors with and without human epidermal growth factor receptor type 2 overexpression. *Radiology* 2008; 246(2): 367-75.
- Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956; 124:269-270.
- Washizu T, Azakami D, Bonkobara M, Washizu M, Arai T. Changes in activities of enzymes related to energy metabolism in canine lymphoma cells. *J Vet Med Sci* 2005; 67(6):615-6.
- Watts CK, Brady A, Sarcevic B, de Fazio A, Musgrove EA, Sutherland RL. Antiestrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells is associated with inhibition of cyclin-dependent kinase activity and decreased retinoblastoma protein phosphorylation. *Mol Endocrinol* 1995; 9(12):1804-13.

- Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6:718–730.
- Wen W, Moses MA, Wiederschain D, Arbiser JL, Folkman J. The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Res* 1999; 59(24):6052-6.
- Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 2010; 5(1):51-66.
- Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 2010; 5(1):51-66.
- Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5(8):2145-54.
- Wu ZS, Wu Q, Yang JH, Wang HQ, Ding XD, Yang F et al. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer* 2008; 122(9):2050-6.
- Würtz SO, Schrohl AS, Mouridsen H, Brüner N. TIMP-1 as a tumor marker in breast cancer--an update. *Acta Oncol* 2008; 47(4):580-90.
- Yamashita K, Suzuki M, Iwata H, Koike T, Hamaguchi M, Shinagawa A et al. Tyrosine phosphorylation is crucial for growth signaling by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *FEBS Lett* 1996; 396(1):103-7.
- Yang AH, Oberley TD, Oberley LW, Schmid SM, Cummings KB. In vitro modulation of antioxidant enzymes in normal and malignant renal epithelium. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; 23(8):546-58.
- Yang Q, Sakurai T, Jing X, Utsunomiya H, Shan L, Nakamura Y et al. Expression of Bcl2, but not Bax, correlates with estrogen receptor status and tumour proliferation in invasive breast carcinoma. *Pathol Int* 1999; 49:775–80.
- Yoshiji H, Harris SR, Raso E, Gomez DE, Lindsay CK, Shibuya M et al. Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer* 1998; 75(1):81-7.
- Zhang GJ, Kimijima I, Abe R, Kanno M, Katagata N, Hara K et al. Correlation between the expression of apoptosis-related bcl-2 and p53 oncoproteins and the

- carcinogenesis and progression of breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 1997; 3(12 Pt 1):2329-35.
- Zhang GJ, Kimijima I, Tsuchiya A, Abe R. The role of bcl-2 expression in breast carcinomas. *Oncol Rep* 1998; 5(5):1211-6.
  - Zhang HJ, Yan T, Oberley TD, Oberley LW. Comparison of effects of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res* 1999; 59(24):6276-83.
  - Zhou M, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Liu Z, Fodstad O et al. Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Mol Cancer* 2010;9:33.
  - Zucker S et al. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878:212-27.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Dr Sandra Radenković je rođena 17.04.1979. godine u Kruševcu. Medicinski fakultet u Beogradu upisala je 1998. godine, a diplomirala 2004. godine sa prosečnom ocenom 9,29. Akademske specijalističke studije je upisala 2005. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Imunologija. Akademijski specijalistički rad pod nazivom „Uticaj citokina na regulaciju matriks metaloproteinaza-2 i -9 u malignim procesima“ mentor prof. dr Gordana Konjević, odbranila je 17.05.2007. godine. Specijalizaciju iz Radiologije započela 2010. godine na katedri za Radiologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, kao stalno zaposlena u Sektoru za radiološku onkologiju i dijagnostiku, Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Doktorske studije na Medicinskom fakultetu upisala je 2007.godine, smer Molekularna medicina.

U periodu od 2005-2010 godine bila je istraživač saradnik na projektu Ministarstva za nauku i tehnološkog razvoja projekat br. 145056: „Izučavanje regulatornih mehanizama vezanih za imunomodulaciju u malignim bolestima“ rukovodioca prof. dr Gordane Konjević. Od 2012. godine je saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Molekulske, biohemijske i imunološke analize u dijagnostici tumora“ čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Jurišić.

Dr Radenković je 2011. godine nagrađena nagradom „Milovan Ćurčić“ za najbolji istraživački rad u oblasti radiologije.

Autor je većeg broja publikacija od kojih su 5 publikovane u časopisima indeksiranim u Current Contents-u.



Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Sandra Radenković

broj upisa 06-DS-MM-10

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Ispitivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, matriks metaloproteinaza 2 i 9 i ekspresije pokazatelja ćelijske smrti u tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 08.04.2013.god.

*Sandra Radenković*

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Sandra Radenković

Broj upisa 06-DS-MM-10

Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada Ispitivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, matriks metaloproteinaza -2 I -9 I ekspresije pokazatelja ćelijske smrti u tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke

Mentor prof. dr Kristina Gopčević

Komentor N. Sav. dr Gordana Konjević

Potpisani Sandra Radenković

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 08.04.2013.g.

*Sandra Radenković*

Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ispitivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, matriks metaloproteinaza -2 i -9 i ekspresije pokazatelja ćelijske smrti u tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke

\_\_\_\_\_

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 08.04.2013.

*Pavle Stanić*

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.