



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милена Б. Илић

**ПОВЕЗАНОСТ ДЕПРЕСИВНОСТИ И АНКСИОЗНОСТИ СА
ЕКСПРЕСИЈОМ РЕЦЕПТОРА ЗА НЕУРОКИНИНЕ КОД
ЖЕНА ОБОЛЕЛИХ ОД КАРЦИНОМА ДОЈКЕ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2023.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Milena B. Ilić

**POVEZANOST DEPRESIVNOSTI I ANKSIOZNOSTI SA
EKSPRESIJOM RECEPTORA ZA NEUROKININE KOD ŽENA
OBOLELIH OD KARCINOMA DOJKE**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2023.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Milena B. Ilić

**ASSOCIATION OF DEPRESSION AND ANXIETY WITH THE
EXPRESSION OF NEUROKININ RECEPTORS IN WOMEN
SUFFERED FROM BREAST CARCINOMA**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023.

Аутор
Име и презиме: Милена Илић
Датум и место рођења: 05.08.1984., Јагодина, Србија
Садашње запослење: Истраживач сарадник на предмету Патолошка анатомија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Повезаност депресивности и анксиозности са експресијом рецептора за неурокидине код жена оболелих од карцинома дојке
Број страница: 102
Број слика: 12 табела, 44 фигуре
Број библиографских података: 256
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област: Медицина
Ментор: Проф. др Слободанка Митровић , редовни професор за ужу научну област Патолошка анатомија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 17.11.2021.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације:
IV-03-186/10 од 16.03.2022. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. проф. др Владимир Јањић , ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија, председник 2. проф. др Весна Станковић , ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан 3. проф. др Милица Мијовић , редовни професор Медицинског факултета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: 1., председник 2., члан 3., члан
Датум одбране дисертације:

Autor
Ime i prezime: Milena Ilić
Datum i mesto rođenja: 05.08.1984., Jagodina, Srbija
Sadašnje zaposlenje: Istraživač saradnik na predmetu Patološka anatomija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Povezanost depresivnosti i <i>anksioznosti</i> sa ekspresijom receptora za neurokinine kod žena obolelih od karcinoma dojke
Broj stranica: 102
Broj slika: 12 tabela, 44 figure
Broj bibliografskih podataka: 256
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast: Medicina
Mentor: Prof. dr Slobodanka Mitrović , redovni profesor za užu naučnu oblast Patološka anatomija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Oцена i odbrana
Datum prijave teme: 17.11.2021.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije:
IV-03-186/10 од 16.03.2022. године
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: <ol style="list-style-type: none"> 1. prof. dr Vladimir Janjić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Psihijatrija, predsednik 2. prof. dr Vesna Stanković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Patološka anatomija, član 3. prof. dr Milica Mijović, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici za užu naučnu oblast Patološka anatomija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: <ol style="list-style-type: none"> 1., predsednik 2., član 3., član
Datum odbrane disertacije:

Author
Name and surname: Milena Ilic
Date and place of birth: 5 th of August, 1984., Jagodina, Serbia
Current employment: Research Assistant at the department of Pathological anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Association of depression and anxiety with the expression of neurokinin receptors in women suffered from breast carcinoma
No. of pages: 102
No. of images: 12 tables, 44 figures
No. of bibliographic data: 256
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Prof. Dr. Slobodanka Mitrovic , Full Professor of Pathological Anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 17.11.2021.
Decision number and date of acceptance of the doctoral: IV-03-186/10 from 16.03.2022.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. Assoc. Prof. Vladimir Janjic , Associate Professor at the department of Psychiatry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, President 2. Assoc. Prof. Vesna Stankovic , Associate Professor at the department of Pathological anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member 3. Prof. Milica Mijovic , Full Professor at the department of Pathological anatomy, Faculty of Medicine in Pristina with temporary headquarters in Kosovska Mitrovica, member
Commission for evaluation and defense of doctoral: 1., President 2., member 3., member
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Карцином дојке (КД) остаје горући глобални проблем, како по питању инциденце тако и у погледу морталитета. Последњих година улажу се напори у дефинисању нових молекуларних и сигналних путева укључених у патогенезу КД, како би се добила комплетнија и јаснија слика у погледу предвиђања прогнозе и ефикасности примењене терапије.

Циљ овог истраживања је испитивање повезаности анксиозности и депресивности са експресијом неурокининских рецептора (*NKR*) у карциному дојке, као и њихова могућа веза са клиничким, патохистолошким и имунофенотипским карактеристикама тумора.

Истраживање је подразумевало попуњавање анкета за самопроцену депресивности/анксиозности оболелих жена, као и комплетну патохистолошку анализу ткивног материјала пацијенткиња. На стандардно обојеним препаратима дефинисани су сви значајни морфолошки параметри КД. Имунохистохемијски, одређивана је ткивна експресија релевантних маркера, применом антитела (*NKR*, *VEGF*, *CD105*, *Ki67* и *caspase-3*). Дефинисане су две групе жена, са и без присутног депресивног/анксиозног поремећаја, као и постојеће разлике у погледу клиничких и хистопатолошких карактеристика.

Код испитиваних жена откривен је значајан број оних са одређеним степеном депресивности/анксиозности. Експресија *NKR* била је у позитивној корелацији са испољеним значајним степеном депресивности и са експресијом значајних предиктора понашања карцинома попут маркера пролиферативног индекса *Ki67*, маркера ангиогенезе у тумору *VEGF* и *CD105*, као и маркера апоптозе *caspase-3*.

Недвосмислено је показано да је коморбидитет КД и депресије значајан у клиничком погледу, да постоје испреплетани молекуларни механизми чије би подробније разумевањем помогло на пољу откривања места за нове терапијске процедуре које би циљано деловале у спречавању раста и инвазије тумора.

Кључне речи: карцином дојке; депресија; анксиозност; карциногенеза; ангиогенеза; метастазирање; рецептор за неурокинине *NKR*.

ABSTRACT

Breast cancer (*BC*) remains a pressing global problem, both in terms of incidence and mortality. In recent years, efforts have been made to define new molecular and signaling pathways involved in the pathogenesis of *BC*, in order to obtain a more complete and clearer picture in terms of predicting the prognosis and the effectiveness of the applied therapy.

The aim of this research is to examine the relationship between anxiety and depression with the expression of neurokinin receptors (*NKR*) in breast cancer, as well as their possible relationship with clinical, pathohistological, and immunophenotypic characteristics of the tumor.

The research involved filling out questionnaires for self-assessment of depression/anxiety of the affected women, as well as a complete pathohistological analysis of the patient's tissue material. All significant morphological parameters of *BC* were defined on the standard stained preparations. Immunohistochemically, tissue expression of relevant markers was determined using antibodies (*NKR*, *VEGF*, *CD105*, *Ki67*, and *caspase-3*). Two groups of women were defined, with and without a present depressive/anxiety disorder, as well as existing differences in terms of clinical and histopathological characteristics.

Among the examined women, a significant number of those with a certain degree of depression/anxiety were found. The expression of *NKR* was positively correlated with a significant degree of depression and with the expression of significant predictors of cancer behavior such as the proliferative index marker *Ki67*, tumor angiogenesis markers *VEGF* and *CD105*, as well as the apoptosis marker *caspase-3*.

It has been unequivocally shown that the comorbidity of *BC* and depression is significant from a clinical point of view, that there are interwoven molecular mechanisms, the more detailed understanding of which would help in the field of discovering new therapeutic procedures that would act in a targeted manner in preventing tumor growth and invasion.

Keywords: breast cancer; depression; anxiety; carcinogenesis; angiogenesis; metastasis; neurokinin receptor *NKR*.

САДРЖАЈ

1. УВОД	11
1.1. КАРЦИНОМ ДОЈКЕ	1
1.1.1. Епидемиологија.....	1
1.1.2. Фактори ризика	1
1.1.3. Савремена класификација КД.....	5
1.2. Депресија као коморбидитет КД	9
1.2.1. Самоубиство	12
1.2.2. Сексуална дисфункција.....	13
1.2.3. Поремећај спавања.....	13
1.2.4. Утицај психофармаколошког третмана на ток КД.....	14
1.2.5. Модулаторни ефекат бихевиоралних фактора на ћелијски имунски одговор (Стрес, имунски одговор и канцер).....	14
1.3. Супстанца <i>P/NK</i> рецепторски систем	15
1.3.1. Супстанца <i>P (SP)</i> и прогресија карцинома.....	18
1.3.2. <i>SP</i> , запаљење и карцином.....	20
1.3.3. <i>SP</i> , емоционално понашање и карцином	21
1.3.4. Антитуморски ефекат антагониста <i>NKR</i>	23
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	34
2.1. Циљеви истраживања	34
2.2. Основне хипотезе.....	34
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	35
3.1. Врста студије	35
3.2. Одобрење етичког комитета	35
3.3. Популација која се истражује	35
3.4. Општи протокол истраживања	35
3.5. Методе.....	36
3.5.1. Стандардна патохистолошка обрада и анализа	36
3.5.2. Фотографисање ткивних пресека	37
3.5.3. Имунохистохемијски (<i>IHC</i>) метод	37
3.5.4. Узорковање.....	40
3.5.5. Статистичка обрада података	41

4. РЕЗУЛТАТИ.....	42
4.1. Опште социодемографске и клиничко-патохистолошке карактеристике.....	42
4.2. Анализа пацијенткиња са карциномом дојке у односу на присуство депресивности	47
4.3 Анализа експресије <i>NKR</i> у односу на клиничко-патхистолошке карактеристике пацијенткиња са карциномом дојке	65
4.4. Анализа експресије <i>NKR</i> у односу на клиничко-патохистолошке карактеристике код недепресивних и депресивних пацијенткиња са карциномом дојке	78
5. ДИСКУСИЈА.....	88
5.1. Депресивост и анксиозност код пацијенткиња са КД.....	89
5.2. Депресивност и опште клиничко-патохистолошке карактеристике карцинома дојке	91
5.3. Експресија <i>NKR</i> у карциному дојке	95
6. ЗАКЉУЧЦИ	102
7. ЛИТЕРАТУРА.....	103

Захвалница

Посебну захвалност дугујем мом ментору, Проф. др Слободанки Митровић, на несебичној подрици и помоћи на путу реализације једне идеје ка изради докторске дисертације. Захваљујем на стрпљењу, разумевању, на свим саветима који су ми помогли у професионалном и личном развоју и напретку.

Огромна захвалност свакој жени на храбрости и жељи да помогне и пружи свој немерљив допринос у овом истраживању, поред бриге и патње кроз коју је пролазила. Без њихове помоћи ништа не би било могуће.

Велику захвалност дугујем мојим колегама са Катедре за Патолошку анатомију, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, посебно мом великом пријатељу др Далибору Јовановићу који је био велики као човек и помоћ на сваком кораку и камену спотицања, да ми пружи руку када застанем. Захваљујем свим добрим и пожртвованим људима из службе за Патолошко-анатомску дијагностику УКЦ Крагујевац који су били вољни да помогну у сваком тренутку.

Захваљујем мојим родитељима, који су ми омогућили да стигнем догде, што су ме научили да свој живот обликујем по правди и љубави. Све што јесам данас и што бих могла постати сутра, све је захваљујући жртвама који су моји родитељи учинили за мене.

Своју докторску дисертацију посвећујем свим људима великог и чистог срца.

1. УВОД

1.1. Карцином дојке

1.1.1 Епидемиологија

Сваке године у Свету дијагностикује се преко 19.3 милиона нових случајева карцинома са готово 10 милиона смртних случајева повезаних са истим. Карцином дојке (КД) са близу 2,3 милиона новодијагностикованих случајева током 2020. године један је од најчешћих проблема и предмета истраживања у свету и представља својеврсни глобални проблем (1). Глобална оптерећеност жена КД, горући је проблем, мерено инцидентом, али и стопом умирања чиме указује на значајан и проблем који има тенденцију раста у многим земљама. Представља најчешћи тип инвазивног карцинома који се дијагностикује код жена у свим расним и етичким групама и узрокује смртни исход оболелих жена, више него било који други карцином, осим карцином плућа (2).

Према последњим подацима у Републици Србији регистровано је близу 5000 новооболелих и готово 2000 умрлих жена од КД, са стопом обољевања и умирања од 72,1 и 20,0 на 100.000, репрезентативно. КД представља трећи значајан узрок превремене смрти жена старости од 45. до 64. године, а статистички подаци указују на то да ће у будућности у Србији свака 12. жена оболети од ове болести. У једном великом епидемиолошком истраживању које је испитивало тренд обољевања и умирања од КД у европским земљама, поражавајући подаци указују да је Србија, заједно са Ирском и још неким земљама источне Европе на „црној листи“ по овим питањима, са забележеном највишом стопом умирања у 2017. години (20,6/100.000 жена) (3).

1.1.2. Фактори ризика

Многа опсервациона истраживања пратила су повезаност ризика за развој КД и преживљавање од истог са одређеним карактеристикама пацијенткиња и факторима ризика повезаних са начином живота. Иако постоји значајан број оваквих истраживања још увек не постоје тачно утврђени узроци који утичу на појаву и прогнозу КД (4). Рандомизирана контролисана истраживања која би помогла у расветљавању узрочне повезаности разних фактора ризика и преживљавања пацијенткиња оболелих од КД, често су неизводљива, јер су неоправдано скупа, изускују дужи временски период и често су неетична. Зато се данас у истраживањима, попут Менделијански рандомизираних, користи методолошки приступ, употребе генетских предиктора као фактора ризика.

У епидемиолошким студијама до данашњег дана, установљен је и добро проучен велики број фактора ризика за развој КД, са посебним акцентом на старост и женски пол оболелих. Фактори ризика укључују оне непроменљиве, као што су старост, полна, расна и етичка припадност и генетска предиспозиција и оне који су променљиви као што је исхрана, конзумирање алкохола, пушење цигарета, физичка активност, хормони егзогеног порекла и фактори женског репродуктивног система.

- **Генетска предиспозиција**

Подаци о позитивној породичној анамнези сродница са КД било са мајчине или очеве стране важни су у препознавању ризика за могући развој КД. Појава КД најчешће је повезана са генима ниске продорности који су укључени у механизме поправке *DNA* оштећења. Свакако је утврђено да оштећења на *DNA* и хромозомима имају улогу у развоју КД, а детектован полиморфизам *XRCC3Thr24Met* гена најчешћи је облик генске

алтерације који се повезује са КД, чија је улога значајна код поправке насталих оштећења на *DNA*. Значајна је њихова укљученост у повећавање цитотоксичности, апоптозе, фосфорилације *p53* и изложености спољашњим факторима, узрочницима *DNA* оштећења (5). Абнормални, наслеђени *BRCA1* и *BRCA2* гени, повећавају ризик за појаву КД између 40 и чак 88%. *BRCA1* се доводи у везу са појавом КД у млађем животном добу, као узнапредовала форма болести (6).

- **Старост**

Инциденца и стопа умирања од КД повећавају се са старењем; отприлике око 95% новодијагностикованих жена је у четвртој деценији живота или старије. Инциденца КД у већини земаља има тенденцију раста након менопаузе и највећа је међу старијом популацијом жена. Широм света, пик инциденце КД је око 60. године живота, са рапидним порастом након 40. године (2). Концентрације ендогено присутних полних стероидних хормона, као што је естрадиол, повезују се са повећаним ризиком за развој КД код постменопаузалних жена (7).

- **Расна припадност**

Неколико фактора може допринети расним разликама у погледу смртности од КД, и то социоекономски фактори, доступност скрининга мамографијом и правовремена терапија, као и биолошки фактори. У поређењу са белкињама, црнкиње испољавају агресивније облике КД, који показују негативност за естрогене рецепторе (8). У студији Сједињених Америчких Држава, црнкиње које су више пута рађале имале су значајно мањи ризик за развој естроген и прогестерон позитивних КД (9).

- **Менопаузални статус**

Старије године менопаузе код жена је добро проучен као фактор ризика за развој КД. Не само старија животна доб менопаузе већ и рана менарха, продужавају период у којем је ткиво дојке изложено хормоналним променама (10). Споменути хормони се као фактори ризика повезују са својим значајним утицајем на ћелијску пролиферацију и могућношћу да током исте настану оштећења генетског материјала, са последичном малигном алтерацијом у ткиву. Нерађање повећава ризик за развој КД код старијих жена. У једном опсежном истраживању Норвежана доказано је да нерађање и гојазност код старијих жена имају синергистички ефекат за развој карцинома (11). Сматра се да трудноћа може умањити ризик за развој КД тиме што ткиво дојке чини стабилнијим и на тај начин мање пријемчивим за дејство карциногена. Познато је да трудноћа у млађем животном добу жене има заштитни ефекат. Такође, дојење деце након порођаја смањује ризикофактор за КД и спада у групу превентивних облика понашања. Што је временски период дојења детета дужи то је фактор ризика за развој КД мањи.

- **Орални контрацептиви**

Епидемиолошке студије показују да је ниво фактора ризика за обољевање од КД након примене оралних контрацептива изузетно низак и готово да се може занемарити (12). Непосредна употреба контрацептива може само благо повећати ризик за развој КД.

- **Терапија хормонима**

Резултати рандомизоване студије здравља жена и опсервационионих студија указују на могућу везу супституционе терапије хормона након менопаузе и појаве КД у овом периоду. Истовремена примена естрогена и прогестерона за ублажавање тегоба код постменопаузалних жена, значајно повећава ризик за развој КД него самостална употреба естрогена у терапији. Због тога постоје препоруке да жене које примају хормоналну

терапију чешће одлазе на скрининг мамографију, како би се промене у дојкама откриле на време (13).

- **Исхрана**

Широк дијапазон намирница и суплемената који се користе у исхрани предмет су истраживања проспективних студија, а посебна пажња се придаје злоупотреби алкохола, црвеног и прженог меса, животињских масти, као и смањен унос свежег воћа и поврћа, калцијума, витамина Д, соје, посебно намирница богатих антиоксидансима попут бета-каротена и осталих каротеноида, витамина Ц и Е (14, 15). Од великог броја намирница чија се конзумација повезује са ризиком за развој КД, истраживачи издвајају злоупотребу алкохола, као и намирнице са високим индексом гликемије и угљених хидрата, који сви заједно утичу на ниво глукозе у крви и концентрацију инсулина (16).

- **Алкохол**

Расте број епидемиолошких студија које испитују злоупотребу алкохола код жена са ризиком од развоја КД. Студије показују да постоји дозно-зависни режим конзумирања алкохола и ризика за развој КД. Конзумирање алкохола повећава ризик за развој КД са само 5.0-9.9g дневно, односно 3-6 пића седмично. Међутим, подаци показују да је за повећање ризика за појаву КД од пресудног значаја конзумирање алкохола у дужем временском периоду. Као могући биолошки механизам оваквог ризика спомиње се утицај алкохола на концентрацију естрогена у крви. Закључно са 2018. годином, на основу постојећих резултата истраживања, научници су закључили да је конзумирање алкохола „вероватни“ и „убедљиви узрок“ за појаву КД код пременопаузалних и постменопаузалних жена, респективно. У спроведеној мета анализи показано је да повећање уноса алкохола у просеку за 10 грама дневно, повећава ризик за 5% код пременопаузалних жена и 9% код постменопаузалних жена за појаву КД. Стандардна количина пића садржи отприлике 14 грама алкохола (17).

- **Физичка активност**

Постоји много доказа добијених у епидемиолошким студијама који указују на то да задовољавајућа физичка активност код жена умногоме смањује ризик од развоја КД. Као могуће објашњење за овакву тврдњу наводе се биолошки механизми којим физичка активност има утицај на структуру самог тела, инсулинску резистенцију, као и ниво полних хормона у циркулацији (18). У једној кохортној студији америчких научника, која је посматрала 74 171 жену, показано је да жене у узрасту од 35 година које имају одговарајућу физичку активност имају за 14% мањи ризик од развоја КД у поређењу са оним женама које физичку активност нису имале ($RR = 0.86$, 95 % CI 0.78–0.95) (19). Ово истраживање такође је показало да дуже време проведено у физичкој активности доприноси већој добробити по питању смањења ризика од развоја КД.

- **Антропометријски фактори**

Фактори попут телесне висине, тежине као и гојазност предмет су великог броја епидемиолошких студија које се баве проблематиком КД. Масноћа присутна код гојазних жена осигурава супстрат за производњу естрогена, кључног хормона за појаву и развој КД и то из андрогена из масног ткива. Наиме, прекомерна масноћа код жена удружена је са хипертофијом адипоцита, која чак и код жена са нормалним *body mass* индексом (*BMI*) изазива запаљење масног ткива, повећање вредности ароматазе (ензима значајног за синтезу естрогена) као и повећање циркулишућег лептина. Свему наведеном треба додати и инсулинску резистенцију, која је редовни пратилац прекомерне масноће код жена. Сви наведени фактори, повезани са прекомерном масноћом код жена, имају доказано значајну

улогу у патогенези КД код гојазних жена (20). Међутим, треба нагласити да прекомерна телесна тежина и гојазност представљају променљиве факторе ризика за КД, посматрани код пременопаузалних и постменопаузалних жена (21). Заједно гојазност и физичка неактивност утичу на појаву хиперинсулинемије као и инсулинске резистенције, који се појављују као независни фактори ризика за развој КД (22). Гојазност утиче на количину слободног инсулину-сличном хормона раста (*IGF- I*), који је доступан ћелијама. КД и његова еволуција у тесној су вези са пролиферацијом туморских ћелија која је повезана са факторима раста као што је горе поменути *IGF- I* као и полни хормони (23). Без обзира на велики број до данас спроведених истраживања на ову тему, остаје непознаница везе између *IGF- I* и КД. У једној мета анализи, са 17 проспективних студија из 12 земаља, испитивана је могућа повезаност *IGF- I* и протеина за везивање овог фактора (*IGFBP-3*) са фактором ризика за појаву КД. Количник односа за развој КД између жена са највећим и жена са најмањим вредностима *IGF- I* износи 1.28 (95 % *CI* 1.14–1.44) (24). Описана позитивна веза са *IGF- I* која суштински није модификована са *IGFBP-3* и менопаузалним статусом, ограничена је на оне карциноме који су позитивни на рецептор за естроген. Описани фактор ризика за развој КД не може се посматрати као изолован и независан, нпр од старости жена.

- **Густина ткива дојке на мамографији**

Један од добро проучених фактора ризика повезаних са развојем КД је појачана густина ткива дојке на мамографском снимку и да је тај ризик четири пута већи у поређењу са женама чије ткиво показује нормалну густину ткива (25). Споменута густина ткива дојке на снимку одраз је броја епителних и стромалних ћелија у ткиву дојке, као и пролиферације истих, али не може бити индикатор одређене хистолошке абнормалности у ткиву. Густина ткива дојке на мамографском снимку у вези је са бројем трудноћа, као и укупним бројем трудноћа које су завршаване у термину порођајем, где је она умногоме мање изражена, што је последица мањег утицаја хормонског колебања којем је ткиво дојке изложено током менструалних циклуса. Густина ткива дојке прилично се смањује након менопаузе, а супротно, након терапије хормонима током овог периода која се спроводи ради ублажавања тегоба код жена изазваних падом хормона, густина се повећава сходно концентрацији примењених хормона (26).

- **Животна средина и професионална изложеност**

Изложеност јонизујућем зрачењу (након нуклеарних катастрофа, дијагностичких и терапијских третмана, нарочито код адолесцената) добро је описан карциноген повезан са КД. Биолошки механизми повезују се са генетским мутацијама. На основу спроведених истраживања на ову тему дошло се до сазнања да изложеност хемикалијама са естрогеном активношћу или другим карактеристикама полних стероидних хормона, као што је бисфенол А (*BPA*), етри полибромин дифенила, (*PBDEs*) и одређени диоксини или диоксин-сличним састојци, могу утицати на повећани ризик од развоја КД. Ризик од развоја КД након излагања 2, 3, 7, 8- тетрахлородибензо-п- диоксин (*TCDD*) описан је од стране неколико независних аутора, са не тако чврстим доказима о висини (озбиљности) ризика. И поред недостатка чврстих доказа из епидемиолошких студија, изложеност хемијским материјама које имају естрогену активност или карактеристике полних стероидних хормона може имати утицај на повећани ризик од развоја КД, нарочито ако је изложеност настала у одређеном критичном животном периоду особе, поготову ако постоји удруженост са другим материјама сличних карактеристика (27). Резултати неколико истраживања која су се бавила темом сменског рада и поремећајем

циркадијалног ритма са последичним повећаним ризиком од развоја КД. Управо, у једном таквом истраживању, утврђен је умерени повећани ризик за развој КД код жена које су имале сменски ноћни рад 1-14 година ($RR = 1.08$, 95 % CI 0.99–1.18) или 15-29 година ($RR = 1.08$, 95 % CI 0.90–1.30) (28). Концентрације серумског мелатонина, који има потенцијални заштитни ефекат, смањују се код особа које су изложене светлу током ноћи. У експерименталним истраживањима, поремећај сигналног пута ноктуралног мелатонина доводи до активације хуманог фактора раста КД, метаболичких и сигналних измена (29). Епигенетске промене попут метилације *DNA* повезују се са повећаним ризиком од развоја КД, доказано у епидемиолошким истраживањима. Метилација *DNA* која настаје након изложености неким од штетних фактора, попут пушења цигарета или константно загађење органским материјама, може имати улогу у настанку карцинома, вероватно утишавањем гена кроз хиперметилацију или супротно, активирањем гена кроз хипометилацију (30).

Наведени фактори ризика за појаву и развој КД указују да постоји значај број и да свакако као појединачни нису пресудни већ у мањој или већој мери утичу на сам ризик, али значајније је истаћи да у садејству њихов ефекат бива драматично повећан о чему би требало размишљати када је превенција КД у питању.

1.1.3. Савремена класификација КД

Класификација било ког карцинома значајна је у постављању исправне дијагнозе ове подмукле болести и својеврсни је предиктор у понашању тумора које је пресудно приликом доношења одлуке на онколошком консилијуму. Као основа за процену и предвиђање тока и исхода КД прате се следеће особености: 1. Колико је карцином лош (одређивање хистолошког типа и градуса); 2. Колико је карцином узнатредовао (одређивање стадијума). Одговор на прво питање заснива се на хистолошким карактеристикама и подтипovima карцинома који су детаљно приказани у Едицији класификације тумора Светске Здравствене Организације (*WHO*). Одређивање стадијума карцинома засновано је на критеријумима *TNM* стадирања, који подразумева величину тумора *T*, статус лимфних чворова *N* као и удаљене метастазе *M*.

• Хистолошки типови КД

До сада, откривено је и описано преко 20 различитих хистолошких типова инвазивних облика КД. Од свих најчешће заступљен у преко 70%, до чак 80% случајева је инвазивни облик дукталног карцинома, неспецифичан тип. Други облик по учесталости јесте инвазивни лобуларни карцином, близу 10% свих дијагностикованих случајева. Са знатно мањом учесталошћу од ова два облика следе муцинозни, крибриформни, микропапиларни, папиларни, тубуларни, медуларни, метапластични и апокрини облик КД. Ова класификација КД заснована је на широком спектру критеријума који укључује тип туморских ћелија (нпр. карциноми са апокрином функцијом), екстрацелуларну секрецију (нпр. муцинозни карцином), архитектурне карактеристике (нпр. папиларни карцином) као и имунохистохемијски профил тумора (нпр. карциноми са неуроендокрином диференцијацијом) (31).

Без обзира на релативно велики број добро дефинисаних хистолошких типова, требало би нагласити да карциноми идентичног хистолошког типа могу да приказују изузетно различита биолошка понашања. Због тога, традиционална, деценијама коришћена класификација КД, углавном заснована на клиничко-патолошким карактеристикама тумора и употреби рутинских биомаркера (*ER*, *PR*, *HER2*, *Ki67* итд.) представља само ширу категоризацију КД пре него детаљну класификацију која би могла

да објасни изузетну хетерогеност КД. Потврђено је да у не тако малом броју случајева оваква класификација не може да одговори и свеобухватно одреди клиничке токове појединачних случајева КД.

- **Хистолошки градус КД**

Одређивање градуса тумора подразумева микроскопску процену хистолошких ентитета, попут структура тубуларне формације, једарног плеоморфизма и пролиферације изражене митотским индексом. Данас је најчешће у употреби *Nottingham* бодовни систем (модификован *Scarff-Bloom Richardson* систем) који процењује сваки параметар нумеричким бодовним системом од 1 до 3 и сумарно представља одређени градус тумора.

Формирање тубула:

Тубули чине већину туморске масе (>75 %) – бод 1

Тубули чине умерен део туморске масе (10-75 %) – бод 2

Тубули чине мали део туморске масе или их нема (<10 %) – бод 3

Једарни плеоморфизам:

Мале, правилне униформне ћелије – бод 1

Ћелије умерено увећане и плеоморфне – бод 2

Изражен плеоморфизам – бод 3

Митотска активност:

0-9 митоза / 10 HPF – бод 1

10-19 митоза / 10 HPF – бод 2

>20 митоза / 10 HPF – бод 3

Nottingham score

3-5 → *Gradus* 1 (добро диферентован тумор)

6-7 → *Gradus* 2 (умерено, средње диферентован тумор)

8-9 → *Gradus* 3 (слабо диферентован тумор)

Одређивање градуса тумора је моћан предиктивни фактор и служи као незаобилазна компонента великог броја одлучујућих клиничких фактора, попут *Nottingham* прогностичког индекса. Интересантно је да су различити градуси КД повезани са одређеним генетским и молекуларним алтерацијама које су детектоване у тумору (32).

- **Имунофенотип КД (рецептори за *ER, PR* и *HER2*)**

Идентификовање и одређивање експресије рецептора за *ER, PR* и *HER2* спада у рутинску процедуру дијагностичког процеса КД и они су веома битни прогностички и предиктивни фактори за примену хормонске терапије као и циљане терапије против *HER2* рецептора. *ER* и *PR* рецептори су полни стероидни рецептори експримирани у једру како здравих (нормалних) тако и тумором измењеним ћелијама ткива дојке, који након активације стимулишу раст истих. Готово 75% свих КД поседују ћелије које експримирају полне рецепторе и у тим случајевима представљају поуздане индикаторе за потенцијално добар одговор на примењену хормонску терапију. Експресија рецептора за *ER* и *PR* процењује се имунохистохемијском методом, са *cutoff*-ом од 1% једарне експресије. Тумори чије ћелије експримирају ове рецепторе по правилу припадају категорији тумора ниског градуса и мање агресивног понашања. Изузетно мали проценат КД показује експресију само једног од два хормонска рецептора и у тим случајевима се обично ради о туморима агресивнијег понашања, са значајно лошијим одговором на примењену хормонску терапију у поређењу са тумором који експримирају оба рецептора (33). Приближно 15% свих КД показују појачану експресију *HER2* рецептора са амплификацијом одговарајућег гена на хромозому *17q12* (34). Валидација статуса *HER2*

рецептора заснива се на комбинованој примени имунохистојемичке методе и технике *in situ* хибридизације *DNA*. Постоје детаљни водичи за примену ових метода и исти се благовремено ажурирају (35). Тренутно у примени, водич који одређује да су *HER2* позитивни они тумори са преко 10% ћелија које експримирају бојење јаког интензитета, непрекидано (континуирано) или испоштован критеријум односа $HER2:CEP17 \geq 2$. Прекомерна експресија овог рецептора детектована у КД показатељ је тумора агресивнијег клиничког понашања и лошије прогнозе, али уједно и предиктор за оне туморе са добрим одговором на примењену циљану терапију против *HER2* рецептора. Остатак 10-15% КД су тумори чије ћелије не експримирају ниједан од горе поменутих рецептора и ти тумори се дефинишу као троструко негативни КД (*triple negative breast cancers-TNBC*), који генерално имају изузетно лошу прогнозу и припадају туморима високог градуса, без икакве ефикасности примењене циљане терапије (36).

- **Хетерогеност и молекуларна субкласификација КД**

Упркос великом броју истраживања и несумњивом напретку у области прогнозе и лечења КД, тумор представља и даље велики, својеврстан недокучив проблем широм света. Као значајан фактор који утиче како на ток тако и на исход и прогнозу болести издваја се свакако доказана изузетна хетерогеност КД, са широким спектром варијација у прогнози (37). Утврђивање што прецизније прогнозе за пацијенткиње са КД важно је због њиховог информисања о току болести и још битније упућивања истих на прави, за њих најбољи начин лечења (38). До данас, најчешће примењивани предиктивни фактори за КД повезани су са карактеристикама самог тумора као и са степеном проширености болести у време постављања дијагнозе. Чињеница је да је КД изузетно комплексна болест са високим степеном како интер тако и интра туморске хетерогености (39). Изучавање ове хетерогености омогућује јасније сагледавање и разумевање природе болести, али помаже и у постизању најбољег одговора након примене одређеног модалитета терапије код пацијенткиње. Поред класичних хистолошких карактеристика тумора (величине тумора, хистолошког типа, хистолошког и нуклеарног градуса, дезмоплазије, стромалне моноклеарне реакције, перидукталне еластозе, митотског индекса, лимфне, васкуларне и нервне инвазије, статуса регионалних лимфних нодуса итд.) даља хистолошка анализа КД примарно заснована на експресији рецептора за естрогене (*ER*), прогестерон (*PR*) и *ERBB2 (HER2)* изузетно је корисна и допринела је бољој прогнози болести, захваљујући развоју и примени тзв. циљане терапије, попут хормонске (нпр. *Tamoxifen*) и терапије усмерене на *HER2* рецептор (нпр. *Trastuzumab*). Оваква хистолошка анализа КД свакако је најчешћа у свакодневном раду, али је технолошки напредак допринео и даљем молекуларном профилисању тумора што је резултирало појавом барем 5 различитих молекуларних подтипова (*Luminal A*, *Luminal B*, *HER2*-позитиван, *Basal-like* и *Normal-like*), углавном базираним на експресији одређених релевантних гена. Молекуларна субкласификација КД заснована је на комплексном испитивању статуса хормонских рецептора у тумору, за који је установљено да постоји даља повезаност са експресијом и алтерацијом гена укључених у пролиферацију и понашање епителних и миоепителних ћелија дојке. Различити подтипови КД испољавају разлике у погледу инциденце, клиничких и патохистолошких карактеристика, док истовремено у високом проценту се преклапају са добро познатим клиничким и патохистолошким класификацијама. *Luminal A* и *B* подтипови карактеришу се експресијом гена који одговарају профили нормалних луминалних епителних ћелија дојке као и гена повезаних са активношћу *ER* (31). Од свих молекуларних подтипова КД, *Luminal A* је најчешћи, са инциденцом између 40 и 50%

дијагностикованих инвазивних КД. Овај подтип КД по правилу припада тумору нижег градуса, са најбољом прогнозом од свих осталих подтипова. Поредбено са овим, подтип *Luminal B* показује виши градус и знатно лошију прогнозу. *Luminal B* подтип има нижу експресију гена повезаних са активношћу *ER* и знатно вишу експресију гена укључених у пролиферацију епителних ћелија и варијабилну експресију гена повезаних са *HER2* статусом, у поређењу са подтипом *Luminal A*. Посматрано клинички, подгрупа *Luminal A* тумора има користи након употребе хормонске терапије самостално, док тумори који по својим карактеристикама припадају подгрупи *Luminal B* изискују по правилу додатну терапију цитостатицима. Тумори чије ћелије појачано експримирају *HER2* заједно са генима укљученим у сигнални пут овог рецептора углавном припадају туморима високог градуса, негативним на статус хормонских рецептора и знатно агресивног клиничког понашања. Поред наведених неповољних чињеница, овај подтип КД показује значајну сензитивност приликом употребе циљане терапије против *HER2* рецептора, што значајно побољшава исход након лечења. Треба нагласити да нису сви тумори са појачаном експресијом *HER2* рецептора *HER2+* и обрнуто, јер нешто мањи број показује коекспресију рецептора за *ER* те се квалификују као *Luminal B* подтип. Подтип *Basal-like* КД (*BLBC*) повезан је са експресијом гена нормалних базалних/миоепителних ћелија млечних жлезда, укључујући цитокератине. Истовремено показују појачану експресију гена укључених у пролиферацију жлезданих ћелија, са слабом експресијом гена за рецептор хормона и *HER2*. Хистолошки посматрано, то су тумори високог градуса, са високим пролиферативним индексом и троструко негативним фенотипом. Пацијенткиње са овим подтипом КД углавном имају лошу прогнозу, са рецидивом тумора унутар 5 година од успостављене дијагнозе (40). Подтип *Normal-like* КД иницијално је посматран кроз експресију гена веома сличним нормалним ћелијама дојке, међутим истина је да су ови тумори изузетно контроверзни и касније посматрани као својеврстан артефакт удружен са истински нормалним епителним ћелијама које су „контаминирани“ тумором са малим садржајем малигних ћелија. *PAM50 (Prediction Analysis of Microarray using 50 classifier genes plus 5 reference genes)* класификациони систем развијен је као стандардизовани метод за категоризацију КД на *Luminal A*, *Luminal B*, *HER2+* и *BLBC* подтип. Измењена верзија овог класификационог система, *Prosigna*, испитана и одобрена од стране Агенције за храну и лекове, развијена је у циљу прогностичке евалуације постменопаузалних пацијенткиња са КД позитивних хормонских рецептора. *Prosigna* је показала значајну предиктивну вредност за процену каснијег рецидива КД, користи од примењене адјувантне хемиотерапије као и у утврђивању одговора након неoadјувантне терапије (41). Истраживања која су уследила и која су базирана на профилисању експресије одређених гена, открила су додатно изузетно ретке подтипове КД, као што су подтип са нижом експресијом *claudin*-а (42), молекуларни апокрини и подтип богат интерфероном (43). С обзиром на велику сложеност и трошкове које оваква испитивања носе, њихово укључивање у редовне клиничке процедуре остаје ограничено. Темелјено на оваквим резултатима, комбиноване анализе генетских/транскрипцијских метода, данас постоје 10 различитих молекуларних подтипова КД (44). У складу са овим резултатима, постоје напори ка даљој субкласификацији КД, нарочито оних из групе *ER*- негативних и троструко негативних (*triple-negative breast cancers - TNBC*) тумора. У истраживању Синија и сарадника међу испитиваним случајевима *ER*- негативних откривено је барем 4, док је код *TNBC* тумора утврђено 6 различитих субтипова КД (45). Напредак на овом пољу бацио је светло на изузетну сложеност молекуларних подтипова КД и извесно је да

ће још подробнија и прецизнија карактеризација заснована на неким новим параметрима (нпр. метаболити) у будућности бити откривена. Ипак, евидентан је јаз између истраживачких метода и тренутне клиничке праксе, па се не тако мали број истраживачки доказаних метода годинама уназад не имплементира у редовну клиничку праксу. Без обира на све, од суштинске је важности откривати и континуирано развијати терапеутике циљаног дејства, који би одговарали и побољшали прогнозу сваког појединачног подтипа КД. Тако би напредак у откривању молекуларних подтипова базиран на што прецизнијим карактеристикама тумора, упоредо са развојем циљане терапије сваког дефинисаног подтипа понаособ, омогућио персонализовани приступ лечењу што је у складу са захтевима савремене „прецизне“ онкологије. Треба нагласити да поред хетерогености која постоји међу различитим добро дефинисаним подтипovima КД, хетерогеност може бити присутна унутар једног истог тумора, што свакако додатно компликује и дијагнозу и лечење. Као покретачка снага појаве различитих типова унутар истог тумора наводи се стање „пластицитета“ туморских ћелија КД. Због свега наведеног, као највећи изазови током лечења КД стоје лоша прогноза, касна дијагноза и развој отпорности туморски ћелија на примењене терапеутике која је у блиској вези са описаном хетерогеношћу тумора.

1.2. Депресија као коморбидитет КД

На основу података Светске Здравствене Организације, број карцинома се у последњих 30 година удвостручио. У већини земаља представља други најчешћи узрок смрти. Карцином је болест неизвесног исхода и као таква велики је изазов, првенствено за пацијента код којег изазива поремећај психолошке равнотеже. Дијагноза карцинома представља катастрофу у очима како пацијента тако и његове породице, са великим утицајем на психолошком и емоционалном пољу и појавом негативних и непријатних осећања као што су страх, безнадежност, кривица, очај и озбиљно осећање напуштености (46). Карактеристике које сигурно утичу на способност да се човек суочи са дијагнозом карцинома јесу године живота, пол, тип личности, али и оне које утичу на прогнозу болести и одговор на терапију као што су симптоми који онеспособљавају пацијента, локализација карцинома, бол, до степена који смањују квалитет живота, каријера, брак и породица, социјална заштита и подршка, постојање некога ко пружа емоционалну подршку, социо-економски статус.

Било која дијагноза карцинома удружена је са озбиљним психолошким потешкоћама код пацијента; њено/његово окружење и рођаке, са значајним смањењем радне способности оболелих. Бихевиорални фактори имају удела у развоју карцинома, али психијатријске компликације се могу појавити код пацијента са карциномом због различитих психолошких фактора који имају неурофизиолошки и перцептивни карактер. Такве психијатријске компликације и психолошки изазов, умањује битно способност прилагођавања и квалитет живота пацијента, са негативним утицајем на ток болести и исход лечења. Карцином представља озбиљан здравствени проблем који уколико се или не дијагностикује или не започне са терапијом на време, завршава фатално. Због чињенице да доводи до смрти милиона људи широм света оправдано је да се код оболелих појаве симптоми и знаци психијатријских поремећаја, било у моменту саопштења дијагнозе или у периоду започете терапијске процедуре. Сигурно је да ови поремећаји утичу како на квалитет живота пацијента тако и на могућност одабира терапијског протокола и одговор на исти, те са тим у вези и на сам исход лечења (47). Нормално је да

човек коме је саопштено да болује од карцинома има потешкоће да на првом месту прихвати чињеницу да је болестан, одбија да је прихвати, лако губи стрпљење и постаје тужан. Након неколико недеља фаза туге и жаљења, код пацијента се појављује начин како да се прилагоди, жеља за борбом и нада у излечење. У извесним случајевима, прва фаза туге траје несразмерно дуге и прети да прерасте у озбиљни психијатријски поремећај као што је депресија. Суочавање са дијагнозом болести која озбиљно прети да угрози живот, као што је карцином, готово је по правилу праћено изразитим стресним реаговањем. Такође, дијагностика и лечење карцинома повезани су са бројним акутним и хроничним стресорима који могу и сигурно утичу на квалитет живота. Овакве озбиљне ситуације обично су повезане са развојем како депресије тако и анксиозности. Не изнећењује чињеница да је депресија један од најчешћих поремећаја који се дијагностикује код особа са карциномом, где готово више од 1/3 пацијената испољава депресивне симптоме у моменту постављене дијагнозе, док 1/4 има симптоме довољно да задовоље критеријуме за постављање клиничке дијагнозе велике депресије.

У моменту саопштења да болују од КД жене се суочавају са значајном нелагодношћу која утиче на даљи квалитет живота. Реакција жене на саопштавање дијагнозе индивидуална је; један број прихвата мирно своју судбину, или искључује емоције, друге покушавају да избегну негативне мисли које им се стално намећу, док друге своју болест истог тренутка поистовећују са смрћу. Значајан број жена и надаље наставља да пати од различитих облика психолошких поремећаја, а изван број, негде између 10 и 25% показује знаке озбиљног поремећаја као што је велики депресивни поремећај (48).

Депресија је сигурно најчешћи психолошки поремећај који се може видети код пацијенткиња оболелих од КД, коју готово по правилу прате знаци анксиозног поремећаја (49). С обзиром да не тако мали број случајева са симптомима великог депресивног поремећаја остаје препознат и нелечен, постоји потреба за истраживањима која би показала преваленцу анксиозних и депресивних симптома међу женама оболелим од КД, али и указала на то како анксиозност/депресија утиче на еволуцију карцинома. Веома су ретка истраживања која су се бавила проблемима фармаколошког и психотерапијског приступа у лечењу великог депресивног поремећаја код жена оболелих од КД.

Депресивни поремећај код пацијента може значајно да смањи одговор на терапију, са негативним утицајем на ток болести, а све то за последицу има продужен период хоспитализације и повећање трошкова лечења. Недавна истраживања су показала да фактори као што су социо-економски статус, социјална подршка, способност прилагођавања, недавни губитак и свест о саопштеној дијагнози, могу имати изузетно значајан утицај на појаву психијатријских поремећаја код онколошких пацијената. Све ово је важно због правовременог препознавања менталних поремећаја код особа које горе напоменути фактори испољавају у негативном контексту, и то у циљу помоћи пацијенту да се брже и безболније прилагоди новонасталој ситуацији и буде у стању да започне са неопходном терапијом што је раније могуће (50).

Поред чињенице да су оболеле од смртоносне болести, разлози због којих се пацијенткиње са КД суочавају са различитим облицима психијатријских поремећаја јесу несигурност у вези терапијских процедура, телесни симптоми, страх од смрти и да се болест не врати, промена женственог изгледа, телесног изражаја и сексуалности, потешкоће у извршавању свакодневних активности, проблеми у породици, али и изостанак емоционалне подршке ближњих (51, 52). Поред стигматизације узроковане

дијагнозом КД, проблеми се могу појавити због измена у женствености, сексуалности и фертилности.

Иако се зна о штетним ефектима хемио-, радио- и хормонске терапије на централни нервни систем, тачни узроци и механизми оштећења још увек су неразјашњени. Истраживања која су проучавала когнитивне функције пацијената који су примали хемиотерапију и контролне групе, утврдила су да су исте знатно биле поремећене код оних који су примали терапију. Измене у когнитивним функцијама код пацијената на хемиотерапији позната је и као феномен „хемио-мозак“, и подразумева присуство симптома као што су ослабљено памћење, одсутност и мањак концентрације током обављања основних дневних активности (53). Зависно од начина примене цитостатика (нпр. метотрексат), њихова токсичност на централни нервни систем креће се у просеку од 3 до 11%. Постоје различити облици клиничког испољавања ове токсичности; измена свести, леукоенцефалопатија, епилепсијски напади, церебрална инфаркција, парализа, неуропатија и ототоксичност (54). Кортикостероиди примењени у терапији карцинома, изазивају широк дијапазон когнитивних поремећаја код пацијената, као и промене расположења. Радиотерапија некада може да изазове краткотрајни губитак памћења или академски стоп у дужем временском периоду (55). Такође, стероидни и други лекови употребљени за симптоматско лечење, као што је Метоклопрамид, лек против повраћања, могу довести до појаве анксиозности. Лекови који доводе до енцефалопатије и делиријума, уједно могу изазвати појаву анксиозности.

Један од битнијих услова који утичу на опоравак од КД јесте психијатријски статус пацијенткиње пре постављања дијагнозе (56). Током процеса дијагнозе и лечења КД, наилази се на велики број изазова и потешкоћа, као што су анксиозност, депресија, љутња, несигурност за сопствену будућност, безнађе, страх да се болест не врати, страх од раздвајања са ближњима, страх од бола, ниско самопоуздање, измене телесног изгледа, страх од губитка сексуалности, помисао на то да буде одбачена, као и најважнији страх од смрти (57). Пацијенткиња који искуси оваква негативна осећања и искуства може одреаговати на различите начине; шок, порицање, љутња, депресија, измене у расуђивању, психолошка регресија, очај, изнуреност и патолошка зависност. Истраживање спроведено на пацијенткињама са КД показује статистички значајан број њих које су искусиле психијатријске тешкоће током процеса терапијског третмана (58). И сама терапија спроведена код пацијенткиња изазива нежељене ефекте као што су губитак енергије, вртоглавица, бол, мучнина и повраћање, промене хормонског статуса и поремећај спавања; сви набројани ефекти несумњиво воде ка поремећају свакодневице пацијенткиње. Од набројаних симптома чини се да несвестица има највећи утицај на развој психолошких симптома (59).

Несумњиво је да психосоцијални фактори имају потенцијални утицај на ток карцинома, међу којима су неки посебно истакнути: структура личности, социокултурни миље, психосоцијални стресни фактори, негативна осећања када је исход болести у питању и размишљање у правцу најгорег, суочавање са новонасталом ситуацијом, претходно искуство, стил живота и генетске карактеристике (60). Посматрајући кроз различита истраживања која су се бавила проблемом психолошких тегоба код пацијанта са карциномом, дошло се до закључка да је недостатак социјалне подршке најважнија карика у даљој прогресији овог стања. Такође, недостатак емоционалне и материјалне потпоре, могу се схватити као фактори ризика за развој депресије и анксиозности код онколошких пацијената. Као извор значајних психосоцијалних фактора за развоје

депресије код пацијенткиње најчешће спомињу неадекватан однос супружника и деце, који не могу да схвате и прихвате новонасталу ситуацију и често нису уз њих да им дају подршку током терапијског процеса (61). Доказано је да подршка супруга има веома важну улогу у пријемчивости пацијенткиње за примену одређене терапијске процедуре. Потврђено је и то да пацијенткиње очекују највећу подршку током терапијског третмана управо од супружника. Несигурност као и страх најважнији су за повећање потребе за социјалном подршком код пацијенткиња. Напори у оспособљавању најближих рођака у разумевању тока болести, показала се као корисна у превенцији психијатријских поремећаја током терапијског периода (62). Квалитет живота пацијенткиња као и њихових најближих битно може да се побољша управо подизањем нивоа социјалне подршке и њене инкорпорације породице у план лечења (63).

Последице развоја анксиозности/депресије код пацијенткиња током терапијског поступка значајне су, а само неке се односе на смањење разумевања и прихватања лечења, као и способност превазилажења потешкоћа током лечења. За анксиозно/депресивне пацијенткиње постоји озбиљна препрека да остваре социјалну интеракцију, пријемчивост за терапијске процедуре, а дужина хоспитализације се знатно продужава, што је све повезано са повећањем трошкова лечења и погоршањем општег квалитета живота. Присутни психијатријски поремећаји код оболелих доказано утичу на појаву бола, физикални статус, задовољство, емоционално и социјално благостање и општи ток и исход болести.

Телесне тегобе које сама болест доноси као и потешкоће терапијског третмана карцинома и дисфункција узрокована болешћу удружено утичу да се психијатријски поремећаји маскирају и као такви теже открију и лече (64). Са друге стране постојање и дуго перзистирање психијатријских поремећаја прете да повећају како број тако и тежину постојећих симптома примарне болести, битно смање пријемчивост пацијенткиња за одређен терапијски поступак и доведу до потпуне детериорације личности (65). Сигурно је да је рано препознавање и лечење психијатријских поремећаја од изузетног значаја, јер би то помогло повећању ефикасности самог лечења као и квалитета живота. У том светлу, веома је важно препознати ове проблеме, као и факторе који на њих утичу, како би се пацијенту заиста помогло у савладавању ових препрека, омогућило да лакше прихвате све изазове новонастале ситуације и на крају да би се предузела адекватна терапијска процедура за сваког понаособ.

Примећено је да код онколошких пацијената постоји низак ниво разумевања и прихватања болести, као и немогућност да се искористе предложени модели понашања, што често доводи до развоја анксиозности/депресије, са последичним великим утицајем на исход лечења и квалитет живота.

1.2.1. Самоубиство

Учесталост самоубиства међу пацијентима са карциномом је релативно висока, са ризиком који је готово два пута већи од оног у општој популацији (66). Бројни фактори међу којима најважнији неконтролисани бол, нелечена депресија, недостатак социјалне подршке, коришћење психоактивних супстанци, податак о самоубиству у породици и сиромаштво, могу имати значајан утицај на појаву самоубиства код онколошких пацијената. Са учесталошћу од 8% код пацијената са карциномом, суицидна идеја може да пређе у покушај код 2-6%, нарочито у терминалном стадијуму болести (67). Истраживања су показала да је депресија недвосмислено најважнија за појаву самоубиства код

онколошких пацијената, нарочито она недовољно добро контролисана. Највише самоубистава међу оболелим од КД је код оних са лошим социо-економским условима у узнапредовалом стадијуму болести (68).

1.2.2. Сексуална дисфункција

За жену дојка је орган велике важности; симбол је женствености и сексуалности, па је хируршко одстрањивање услед карцинома повезано са осећајем губитка сексуалности, привлачности и материнства, као и негативним утицајем на комплетан телесни изглед (69). КД је удружен са високим степеном малигнитета који води до сексуалне дисфункције са много већим процентом у односу на све друге типове карцинома, управо због мастектомије, која је у већини случајева неопходна и оправдана. Не само мастектомија, већ и додатна хемио, зрачна и хормонска терапија негативно утичу на сексуални живот пацијенткиње (70). Посматрано, код жена којима је саопштена дијагноза, сексуални живот се битније не мења, али како терапијски поступак напредује, све више жена саопштава чињеницу да им је сексуалност последња ствар на коју помисле и да су преокупиране мислима о здрављу и оздрављењу једино. Несумњиво је да радио и хемиотерапија имају утицај на смањење сексуалне жеље и активности код оболелих. Поред набројаних, фактори који такође доводе до смањења сексуалности јесу губитак дојке, опадање косе, бол, телесни изглед, као и промена у доживљају сопственог здравственог стања (71).

1.2.3. Поремећај спавања

Инсомнија је један од најчешћих психијатријских поремећаја код онколошких пацијената (72). Преваленца овог поремећаја је око 50%, са већом учесталошћу међу женама и то нарочито оних са КД (73). Поремећај спавања се нарочито испољава у терминалном стадијуму болести, када је поремећен квалитет живота генерално. Поремећаји који појединачно или чешће удружено могу довести до поремећеног спавања јесу појава акутног или хроничног бола, анксиозност, мучнина/повраћање, депресија, делиријум, умор, инфекција, висока температура. Познато је да овај поремећај има утицај на морталитет онколошких пацијената (74). Поремећај спавања може бити удружен са психолошким тегобама насталим саопштавањем диганозе или нежељеним ефектима примењеног лечења, нарочито код пацијенткиња које примају хормонску терапију која доводи до појаве постменопаузалних симптома код релативно младих жена (75). Депресија и анксиозност сигурно представљају ризикофакторе за настанак поремећаја спавања и не треба да изненади чињеница о повезаности ових психијатријских поремећаја, јер је сигурно да су једни од других зависни и испреплетани, а инсомнија је свакако увек присутан симптом депресивних и анксиозних поремећаја. Због тога лечење и добра контрола депресије/анксиозности може да смањи појаву поремећаја спавања код онколошких пацијената. Друга сазнања говоре о повезаности узимања лекова и инсомније. Заправо, неконтролисано висок унос лекова за спавање може узроковати појаву инсомније (76). Велики број жена пријављује један или више облика поремећаја спавања (око 63%), повезаних са узимањем таблета за спавање код око 37%. Потешкоће са успављивањем значајно су повезане са упорним боловима као и депресивним поремећајем. Проблеми са буђењем усред ноћи, јасно су повезани са тешким обликом депресије и нижим степеном образовања. Са друге стране, значајнији депресивни симптоми и недостатак социјалне подршке, воде до проблема у ритму буђења/устајања (77).

1.2.4. Утицај психофармаколошког третмана на ток КД

Психијатријско лечење игра важну улогу у прогнози и одабиру терапијске процедуре КД. У истраживањима која су се бавила повезаношћу психијатријског коморбидитета и КД, дошло се до података да око 52% пацијенткиња током терапијског третмана онколошке болести добија и психијатријске лекове, а да чак 48% њих није прошло дијагностички поступак како би се утврдио тачан тип поремећаја и спровела адекватна терапија. 80% пацијенткиња примају терапију за велики депресивни поремећај, а половина користи лекове за општи анксиозни поремећај (58). Пре било каквог лечења неопходно је познавање тачног механизма метаболисања психијатријских лекова као и евентуално утицај на лечење онколошке болести (78). Вазомоторне реакције, као што је напад врућих таласа, могу настати као ефекат антиестрогене терапије или део депресије или анксиозности. Показано је да лекови из *SSRI* и *SNRI* групе могу смањити овакве тегобе у менопаузалном периоду као и онколошких пацијенткиња на ендокриној терапији. Антидепресивни ефекат примењених лекова приписује се венлафаксину, есциталопраму и пароксетину и њихова ефикасност поредбено са плацебом била је значајна. Поред наведеног позитивног ефекта у ублажавању психолошких симптома, треба нагласити да антидепресиви са метаболисањем преко *CYP2D6* ензима могу битно да утичеу на смањење ефикасности примењеног тамоксифена (анти-естрогеног лека), што може утицати на релапс карцинома (79). Неколико истраживања јасно су показала да најефикаснији лекови коришћени за лечење депресије имају огроман утицај на појаву нежељених ефеката примењених код пацијенткиња са КД, много више него код оних без карцинома. Претпоставља се да убрзана прогресија карцинома код одређеног броја пацијенткиња које примају антидепресивну терапију, лежи у чињеници да код њих постоји повећана експресија рецептора за пролактин и да управо ови лекови представљају окидач који преко рецептора доводе до убрзане пролиферације и алтерације туморских ћелија (80). Сходно резултатима истраживања базираним на контроли случаја заснована на хипотези да КД може да се развије код жена које користе антидепресиве, показано је да *SSRI* и други антидепресиви не повећавају ризик од развоја карцинома; међутим, није искључена могућност да лекови из групе трицикличних антидепресива, коришћени 2 године непрекидно, могу бити узрок развоја карцинома (81). Нека истраживања су чак показала да коришћење трицикличних антидепресива, дуже од 10 година, у високим дозама, може значајно повећати ризик од развоја карцинома. Лекови из групе *SSRI* кој се матаболишу преко *CYP2D6* система, као што је пароксетин, повећавају ризик од смртног исхода код пацијенткиња са КД (82).

1.2.5. Модулаторни ефекат бихевиоралних фактора на ћелијски имунски одговор (Стрес, имунски одговор и канцер)

На основу података добијених у истраживањима која су се бавила питањем могућих веза и међусобног утицаја између карцинома и депресије, недвосмислено је да веза постоји и да је она значајна. Модулаторни ефекат бихевиоралних фактора на ћелијски имунски одговор преко активације хипоталамус-хипофиза-надбубрежна жлезда осовине и симпатичког нервног система детаљно су појашњени, помоћу механизма који укључују директну симпатичку инервацију имунског ткива посредством рецептора за глукокортикоиде и бета-адренергичких рецептора на моноклеарним леукоцитима као и неуроендокрину модификацију лимфоцитног одговора. Стрес и афективни одговор, укључујући депресију и анксиозност, удружени су са нисходном регулацијом ћелијског

имунског одговора и подразумева број и тип лимфоцита у циркулацији, пролиферативни и цитолитички одговор *in vitro* и ниво антитета након имунизације. Оваква сазнања говоре у прилог да исти могу имати улогу у контроли карцинома захваљујући потенцијалним утицајем на ћелијски имунитет, нарочито на ћелије природне убице (*NK*) које су важне у одбрани од малигнућ ћелија. На основу свега наведеног модел имуносупресије подразумева да стрес или негативне емоције могу да модулирају туморску иницијацију и развој супримирајућег имунског одговора који је важан у реакцији на малигнућ ћелије.

Ефекти бихевиоралних фактора на имунски одговор испитивани су код пацијенткиња у раном стадијуму КД. Нека од првих открића била су та да пацијенткиње са вишим нивоом друштвене подршке имају значајнију активност *NK* ћелија у поређењу са оним које исту нису имале или је она била значајно мања. За разлику од њих жене које су се жалиле на безвољност и депресивне симптоме имале су доказано слабију активност *NK* ћелија (83).

Пут укључен у неуроендокрини одговор стресног реаговања подразумева активацију кортикалних и лимбичких структура централног нервног система и на крају активацију хипоталамус-хипофиза-надбубрежна жлезда осовине и симпатичког нервног система. Велики број хормона ослобођени током овог пута на посредан или непосредан начин утичу на активност имунског реаговања. Доказано је да унутар примарних и секундарних лимфоидних органа постоји велик број нервних завршетака симпатичког нервног система који га инервишу и модулирају активност ћелија у њима. Глукокортикоиди, катехоламини као и остали хормони стресног реаговања модулирају имунски одговор значајан за надзор и сузбијање тумора, али и друге патофизиолошке процесе укључене у прогресију карцинома, укључујући ангиогенезу, инвазију и модулацију инфламације.

Претклиничке експерименталне студије су показале да хроничан стрес, баш као и значајан акутан, повећава учесталост и прогресију тумора путем супресије активности *NK* и *T* ћелија, оштећењем антиген презентације и поспешивањем функције *T* регулаторних ћелија. Жене које су пријавиле значајније симптоме дистреса након хируршке интервенције показале су умањен ћелијски имунски одговор, показан кроз различита мерења, укључујући смањену активност „дивљих“ *NK* ћелија, слабији одговор истих на примењену терапију рекомбинантног *IFN γ* , смањен лимфопрлиферативни одговор као и алтерацију експресије инхибиторних рецептора на *NK* ћелијама (84).

1.3. Супстанца *P/NK* рецепторски систем

Протекле две деценије, истраживачи су уложили велики напор у изналажењу ефикасног терапијског поступка за лечење карцинома. Међутим, исти није уродио плодом, јер значајнијег помака у укупном преживљавању од ове болести још увек нема (нпр. медијана преживљавања од карцинома плућа повећана је за свега два месеца за протеклих 20 година) (85). Ипак, неколико поља истраживања обећавају много по питању постизања веће ефикасности и укључују истраживања људског генома, генске терапије, нових цитостатских лекова и стем ћелија итд. Недвосмислено остаје да се мора урадити више на постизању веће селективности и специфичности терапијских процедура за лечење карцинома, јер је велики проблем и даље остао значајно нежељено дејство конвенционалних лекова. Идеално би било да примењен антиканцерски лек има способност препознавања једино тумором измењених ћелија према којима би био немилосрдан, а са друге стране без било каквог споредног ефекта на ћелије домаћина. Овакав ефекат лека Пол Ерлих је назвао „Магичним метком“, што су Муњоз и сарадници

у свом истраживању представили као „Интелигентан метак“ (86). Нажалост, до сада употребљавани лекови су далеко од овакве магије и код велике већине је питање односа користи и штете по организам као целину, јер је њихова безбедност на незавидном нивоу и готово по правилу изазивају веома непријатне нежељене ефекте, са недопустивим штетним ефектом на виталним органима, попут мозга, срца, плућа. Због тога је жеља истраживача да откривањем нових молекуларних механизма укључених у карциномску прогресију изнађу нове терапијске модалитете који би се базирали на молекуларном профилисању туморске ћелије и на тај начин постали специфичнији, селективнији и ефикаснији.

Пажњу истраживача заокупљују пептидни молекули које туморске ћелије експримирају или секретују, јер исти помажу у поступку дијагностиковања и лечења тумора, са једне стране, а са друге, велики број њих укључен је у развој и понашање тумора. Постоје докази који показују да неуропептиди, секретовани од стране не само туморских ћелија већ бројних других конституената тумора и његовог окружења, могу имати значајну улогу у прогресији карцинома. Тако је показано да широко распрострањена супстанца *P* деловањем посредством *NK* рецептора (*NKR*), представља материју са митогеним ефектом на одређене карциномске ћелијске линије. Оваква чињеница поткрепљена је тиме да антагонисти *NKR* имају антитуморску активност испољену на споменутим карциномским ћелијским линијама и да то постижу увођењем ових ћелија у апоптозу. Овакви докази створили су основе за претпоставку да супстанца *P/NK* рецепторски систем (*SP/NKR*) има значајну улогу у развоју карцинома и да би антагонисти овог система могли да буду разматрани као потенцијални врло ефикасни антитуморски лекови (87).

SP је недекапептидни члан фамилије неуропептида тахикинина, са испољеним високим афинитетом везивања за *NKR* који има улогу неуромодулатора и неуротрансмитера коју остварује управо преко горе споменутог рецептора. *SP/NKR* систем доказано имају улогу посредника у физиолошким процесима као што је пренос бола, рефлекс повраћања, зарастање рана, ткивна хомеостаза, запаљење, хематопоеза као и функционисање кардиоваскуларног система (88).

Постоје три врсте рецептора за неурокинин (*NKR*), 1, 2 и 3 који посредују у активности супстанце *P*, неурокинина *A* и *B*. *NK1R* своју активност испољава преко Ц-терминалног краја тахикинина, због чега много већи афинитет за везивање остварује са супстанцом *P*, која због тога своје биолошке ефекте остварује преко овог система. Други ефекат остварују преко реакција куплованих *G*- протеином. Уз помоћ разних метода (анализе генома, имунохистохемије итд) потврђено је да је *NK1R* широко распрострањен у ћелијама централног и периферног нервног система. Након везивања за рецептор супстанце *P* остварује велики број различитих улога у организму: контрола покрета, пријем дражи, функционисање и дегенерација нервног ткива, мотилитет желуца, лучење пљувачке, мокрење, запаљење, бол, депресија, као и регулација рада кардиоваскуларног и респираторног система. Активацијом *NF-κB* важну улогу остварује у контроли секреције проинфламаторних цитокина (89). Активацијом *NK1R* експримираног на ћелијским линијама астроцитома долази до биохемијских промене као што су: активација фосфолипаза, стварање инозитол фосфата и ослобађање *IL-8* и таурина и глутамата, мобилизација интрацелуларног калцијума, разлагање гликогена посредством глутамата и транспортом калијума. Активиран *NK1R* може да мења изглед и понашање ћелије посредством секундарних гласника. Најпознатији системи секундарних гласника су:

стимулација помоћу фосфолипаза, дејством фосфатидил инозитола који доводи мобилизације калцијума из интра и екстраћелијског подручја; мобилизација арахидонске киселине помоћу фосфолипаза; акумулација *cAMP* стимулисану аденилат циклазом. Супстанца *P* (*SP*) активира чланове митоген-активирани протеин киназне каскаде (*MAPK*), укључујући и екстраћелијски сигнални протеин киназни систем (*ERK1/2*) и *p38MAPK* (90). Присуство *EGFR* киназног система доводи се у везу са активацијом *MAPK* посредством *SP*, па се активацијом *NKR* на ћелијама глиобластома повећава фосфорилација и активација *Akt* и протеин киназе *B*, серин-треонин протеин киназа која се активира посредством фосфатидил-3-киназе *PI3K* (91). Активацијом *Akt* изазива се супресија апоптозе у туморској ћелији, док антагонисти *NKR* овакву активност спречавају, повећањем и процеса фосфорилације и блокадом активности *SP*. Истоветном блокадом *NKR* антагонистима *L-733,060* инхибира се базална киназна активност *Akt*. Ова сазнања су јако важна, јер је активност *Akt* у глиобластома повезана са лошијом прогнозом (92). Познато је да након везивања *SP* заједно са рецептором улазе у ћелију и уносе се у рани ендозом, након неколико минута. *SP* индукује интернализацију *NKR* која зависи од клатрина; након тога комплекс *SP/NKR* се разлаже унутар ацидификованог ендозома, при чему се *SP* разлаже, а *NKR* враћа на површину ћелије. *NKR* је експримиран на многобројним канцерским ћелијским линијама ретинобластома (*WERI-Rb-1, Y-79*), глиома (*U373 MG, GAMG*), неуробластома (*SKNBE, IMR-32*), леукемија (*T-ALL BE-13, B-ALL SD-1*), карцинома панкреаса (*CAPAN-1, PA-TU 8902*), ларинкса (*HEP-2*), желуца (*23132/87*) и колона (*SW-403*). Такође, доказано је да туморске ћелије поседују *mRNA* за синтезу *NKR* за тахикинине и да је иста вишеструко повећана у малигним ткивима (нпр биопсијама дојке), у поређењу са оном присутном у нормалном и бенижном ткиву биоптираних узорака. Уз помоћ примењене имунохистохемијске анализе узорака карцинома желуца, аденокарцинома колона и примарног ретинобластома, откривена је јака позитивност *NKR*. Иста анализа рађена је и на узорцима астроцитома, глиобластома, медуларног карцинома штитасте жлезде, карцинома дојке, ганглионеуробластома, али нешто слабије на узорцима ситноћелијског карцинома плућа, неуробластома, аденокарцима панкреаса, лимфома. Висока експресија *NKR* детектована је и у туморима сквамозне диференцијације на различитим локалитетима и већином је била присутна у ћелијама базалног слоја, а ова експресивност се доводила у везу са присутним диспластичним ткивом са високо експримираним маркером пролиферације *Ki67*, у супрабазалном слоју. У већини испитиваних карцинома, експресија *NKR* детектована је и у крвним судовима унутар и у околини тумора, што може имати одређен клинички значај, посредством блокирања ангиогенезе преко овог система. Имунохистохемијски, имунореактивност *NKR* је јасна на ћелијској мембрани туморских ћелија, мада извесна, слабија се може очекивати и у једру (86). У испитиваним карциномима описане су две форме *NKR*, пуне дужине и скраћена форма. У скраћеној форми, рецептору недостаје С терминални крај присутан у оном пуне дужине. Рецептор пуне дужине посредује у споријем расту туморских ћелија, док скраћена форма повећава малигнитет истих ћелија, стимулишући производњу цитокина (93). Синтетисани цитокини активирају транскрипциони фактор *NF-κB*, који са друге стране позитивно регулише скраћену форму рецептора, а само постепено повећава синтезу рецептора пуне дужине. Повећана експресија рецептора скраћене дужине постоји у ткиву карцинома колона који је удружен са перзистирањем хроничног колитиса, док је присуство рецептора пуне дужине у истом узорку непромењено. До сада остаје непознаница да ли примењени антагонисти *NKR* неселективно погађају обе форме или пак

постоји одређен степен селективности. Према подацима добијеним из великог броја истраживања недвосмислено је постојање више различитих изоформи *NKR* у испитиваним узорцима различитих хистогенетских облика карцинома (лимфоми, неуробластоми, карцином панкреаса, ретинобластом, карцином ларинкса, аденокарцином желуца и колона, леукемије итд). Осим ове чињенице, испитивањем се дошло до још једног интересантног сазнања, а то је да у овако разнородним туморима постоје готово идентичне изоформе *NKR* (75, 58, 33, 34, 46, 48 су најчешће). Под претпоставком да различити облици *NKR* имају и вероватно различите улоге у туморима, остаје као тема будућих истраживања, испитивање и откривање таквих улога. Поред овога, истраживачи су се бавили и испитивањем броја самих *NKR* у туморима, тј колико пута је њихова експресија повећана у односу на контролна, здрава ткива, при чему је откривено да у појединим туморима је та експресија повећана и преко 30 пута. Примећено је, такође, да узорци тумора у узнапредовалим фазама показују далеко већи ниво експресије у односу на оне који се налазе у ранијим фазама. Због оваквих открића, верује се да је експресија *NKR* у корелацији са степеном малигнитета и агресивношћу тумора, што се и доказало код најмалигнијег облика глијалних тумора, глиобластома, у којем је експресија *NKR* била вишеструко већа у односу на ону у астроцитомима. Описано је и да узорци примарних тумора показују виши ниво експресије *NKR* у поређењу са оном у ћелијским линијама идентичних тумора (94).

И на крају, у малигним туморима постоји повећан ниво *mRNA NK1* нпр. у карциному дојке, док је тај ниво оптималан у бенигим променама. Исти ниво транскрипционог молекула повећан је близу 30 пута у леукемијским ћелијским културама, у поређењу са нормалним ћелијама (95). На основу свих података добијених у истраживањима и чињеници да сви тумори који су били испитивани показују виши ниво експресије *NKR*, постоји оправдано мишљење да би коришћење блокатора (антагониста) ових рецептора могло бити од велике користи за лечење многих тумора.

1.3.1. Супстанца *P (SP)* и прогресија карцинома

Испитивањем експресије *NKR* у лезијама различитог степена малигнитета (нпр. невуси са вретенастим и епителоидним ћелијама, атипични невуси, *in situ melanoma*, инвазивни меланом), уочено је да је она различита и да процентуална заступљеност исте расте са степеном агресивности ових лезија; 40, 58, 60 и 68% респективно. Такође, у бенигим стеченим меланоцитним лезијама експресија *NKR* није уочена (96).

Познато је да је ниво *SP* у ћелијама карцинома дојке повишен, док у нетуморским ова супстанца није детектибилна, при чему су од посебног интересовања били региони на периферији тумора и перитуморско ткиво. У неким туморима у којима у непосредној околини тумора постоје плаже диспластичног ткива, експресија *NKR* у цитоплазми и једру туморских ћелија, показује позитивну корелацију са нивоима експресије *Ki67* у диспластичном ткиву (97). *SP* је широко распрострањена у организму и присутна у готово свим телесним течностима и ткивима, са кратким полуживотом и брзим распадањем, али са могућношћу формирања комплекса обично са фибронектином, чиме се полуживот значајно продужава. Сходно извесној експресији која постоји и у једрима претпоставља се да ова супстанца има могуће неуромодулаторно деловање (98). Из студија од пре више од 30 година познато је да *SP* има митогено дејство у многим ткивима, нарочито у везивним ткивима и онима у регенерацији. У складу са тиме претпостављено је да *SP* посредством *NKR* у бројним туморима изазива пролиферацију туморских ћелија, највероватније

аутокриним и паракриним механизмима и да такав ефекат настаје у веома малим концентрацијама (99). До оваквог закључка дошло се након примене специфичних антагониста *NKR* у великом броју туморских ткива и ћелијским линијама, при чему је са примењеним минималним дозама постигнут ефекат инхибиције пролиферације туморских ћелија и раста тумора (100). Механизми којима *SP* изазива митогени ефекат у ћелији нису до краја описани, али у неким испитивањима је примећен пораст концентрације калцијума у ћелији (101). Такође, постоје индиције да *SP* узрокује активацију *MAPK* пута, укључујући и екстраћелијски сигнал посредован киназом 1 и 2 (*ERK 1 /2*). Након активације ћелије унутар ње се формира читав комплекс рецептора- β -арестин, *src*, *ERK 1 /2*, који инкорпорирани у једро ћелије изазивају пролиферацију и штите је од апоптозе (102). Поред овога, након активације ћелије *SP* примећена је и повишена експресија *c-myc* протеина и да се митогени ефекат може објаснити и овим начином. Закључак је да је *SP* за све туморе који експримирају *NKR* универзални митоген. У астроцитому активацијом *SP* изазива се гликогенолиза и повећава концентрација интраћелијског Ca^{2+} и оба ефекта су дозно зависна, а употребом антагониста рецептора за *SP* и један и други нестају. Познати *Warburg* –ов ефекат у туморским ћелијама настаје као последица тога што туморске ћелије енергију обезбеују доминантно екстремном гликолизом што је праћено ферментацијом млечне киселине. Брзорастући тумори показују и до 200 пута повећан ниво гликолизе у односу на нормално ткиво, без обзира што кисеоник може бити присутан и доступан. Туморској ћелији је неопходна изузетно велика количина глукозе за одржавање *Warburg* – овог ефекта. Под претпоставком да сама туморска ћелија ствара *SP* након њене активације долази до индукције гликогенолизе чиме се ствара велика количина глукозе која стоји ћелији на располагању за одржавање и повећање метаболизма. Супротно, примећени антагонисти *NKR* блокирају гликогенолизу и у туморској ћелији долази до губитка доступне глукозе, због чега *Warburg* –ов ефекат изостаје чиме је метаболизам туморске ћелије и она сама угрожена. Оваква ситуација може да се искористи у клиничке сврхе, јер би давањем лекова који блокирају *NKR* и последичним изостанком *Warburg* –овог ефекта, опстанак и прогресија (раст) тумора могао бити под контролом. Важно је напоменути да је експресија *SP* у туморским ћелијама јаче изражена у једру него у самој цитоплазми (нпр. карциноми плућа и дојке) (86). Недвосмислено је да супстанца присутна у одређеној структури ћелије има утицај на функционалне карактеристике те саме структуре. Са тим у вези, претпоставка је да *SP* експримирана у једру туморских ћелија има регулаторну улогу активности тог једра и својеврстан је епигенетски фактор, са доказаним утицајем на транскрипционе факторе који регулишу и значајни су у канцерогенези (*ER1/2*, *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *AP-1*, *NF- κ B*, *HIF-1 α*) (103). Све наведено и у многим истраживањима доказано, треба узети у комплексније разматрање, како би све било могуће применити у клиничкој пракси, са циљем побољшања прогнозе многих карцинома. Треба знати да је *SP* широко распрострањена у ткиву како централног тако и периферног нервног система. Како је у *In vitro* условима показано да *SP* у изузетно малим концентрацијама има утицај на понашање и пролиферацију туморске ћелије, претпоставља се да постоје други механизми који контролишу локалну активност тумора посредством сензитивних нерава који садрже *SP*. На овај начин *SP* модулира раст тумора, директном интеракцијом између постојећег и нервног система (86). *SP* као што је више пута наглашено, посредством *NKR* показује митогени ефекат на туморску ћелију, вероватно посредством различитих механизма: 1. аутокрини, где сама туморска ћелија ствара супстанцу (нпр. неуробластом, меланом, сквамозелуларни карцином); 2. паракрино, где се супстанца отпушта из туморске ћелије и

делује на околне ћелије (нпр. ендотелне), што за последицу има поспешивање прогресије карцинома; 3. посредством периферног нервног система, где се супстанца отпушта из нервних завршетака; и 4. ендокрино, повезано са емоционалним поремећајима (ЦНС), где супстанца досеже кроз читаво организам путем крви (86). Улога *SP* у прогресији карцинома показана је и доказана на примеру холангиокарцинома, аутокриним путем, где се видело да блокадом синтезе ове супстанце постоји могућност контроле споменутог карцинома (104).

1.3.2. *SP*, запаљење и карцином

SP, ослобођена са нервних завршетака примарног сензорног неурона, у ткиву изазива неурогену инфламацију (нервни завршеци са овом супстанцом обично се налазе око крвних судова). Ослобођена *SP* доводи до промена које се иначе виђају у акутним инфламацијама: вазодилатације (потентан вазодилататор), пропустљивости крвних судова (повећава пропустљивост), дегранулације мастоцита као и модулације активности ћелија имунског система. Постоје неколико чврстих доказа о улози *SP* у имунолошким реакцијама, функцији периферног и централног нервног система, док је повећање експресије *NKR* примећено у стањима праћеним хроничним боловима. Са тим у вези, оправдана је примена антагониста рецептора за *SP*, као лекова са антиинфламаторним и аналгетским дејством. Улогу у модулацији имунолошког система *SP/NKR* систем остварује изменама на многим нивоима имунолошког система, међајући одговор и улогу инфламаторних ћелија, мастоцита, гранулоцита, лимфоцита, моноцита и макрофага. Треба нагласити да *SP* важна за модулацију понашања имунских ћелија потиче не само из нервних завршетака (неурогена инфламација), већ извор ове супстанце могу бити и еозинофили и макрофаги, што је и показано повећаном експресијом ове супстанце и њеног рецептора у набројаним ћелијама током инфламације (105). Као доказ овакве тврдње постоје подаци повећаног нивоа *SP* током запаљења интестиналног тракта, са јасном корелацијом између озбиљности запаљења и клиничких манифестација болести. Оваква запажања сугеришу да локално ослобађање *SP* (нпр. у лимфним нодусима), може бити индикатор имунолошког поремећаја који лежи у основи хроничне инфламаторне болести црева (*IBD*), с обзиром на присуство *NKR* на *T* лимфоцитима присутним у периферној крви оболелих од ове болести (106). Добро је позната и детаљно обрађена повезаност хроничног запаљења и карцинома у бројним случајевима, где су многа и сврстана у групу преканцерозних лезија, јер сама инфламација изазива митоген и мутаген ефекат у ткиву где се развија. Ћелије у деоби изложене су далеко већем ризику за настанак мутација, у поређењу са онима које се не деле. Време потребно за опоравак *DNA* је много краћи код ћелије у деоби, па је самим тим ризик од ендогеног или егзогеног оштећења далеко већи током пролиферације ћелија. Разлог дуготрајног перзистирања инфламације у ткиву може бити сам стимулус који је процес узроковао или то може бити абнормална регулација контролних механизма који би инфламацију зауставили. Примећено је да велики број ћелија, цитокина и процеса као што су миграција леукоцита, дилатација околних крвних судова, ангиогенеза, присутних у многим инфламаторним подручјима, уједно присутни у идентичном облику и у бројним туморима. Важно је напоменути да у већини испитиваних тумора експресија *NKR* била је присутна како у интратуморским тако и у перитуморским крвним судовима (107). Хронична инфламација црева узрокована интестиналном флором доводи до инфламаторне болести црева (*IBD*), улцерозног колитиса и Крнове болести, које су уско повезане са карциномом колона. Код

пацијената са *IBD*-ом потврђене су више вредности *SP* као и повећана експресија *NKR* у ректуму и колону. Као потврда ове теорије наводе се докази да исхрана карциногенима са проинфламаторним ефектом доводе до чешћег обољевања од карцинома простате, као и да хронична инфламација настала као последица езофагеалног рефлукса, доводи до појаве гастроэзофагеалне рефлуксне болести (*GERD*) и Баретове метаплазије, где су и једна и друга повезане са већим ризиком од развоја карцинома једњака. Слично, инфекција *Helicobacter pylori* узрокује хроничну инфламацију чиме је иста потенцијални фактор у карциногенези тумора желуца. Ризик од карцинома панкреаса евидентно расте са присуством хроничног панкреатитиса, који је фактор сам за себе, независно од старости, пола и осталих демографских карактеристика. Са тим у вези, у испитиваним узорцима ткива хроничног панкреатитиса, показана је повећана експресија *mRNA* која кодира синтезу *NKR*, која је код пацијената била у јакој вези са присутним болним синдромом. Сва ова запажања показују да хронична инфламација може да изазове појаву карцинома посредством *SP/NKR* система, који позитивно регулише процес инфламације, а познато је да *SP* има митогени ефекат на туморску ћелију, док је такође експресија *NKR* на њима повећана (86). И док је за прогресију тумора улога инфламације у пролиферацији и деградацији матрикса строме добро дефинисана, њена улога у метастазама није тако јасна, иако је сигурно да је иста од значаја. Током неурогене инфламације ниво *SP* се повећава и примећено је да осим митогеног, ова супстанца испољава и миграторни ефекат на туморску ћелију, што је важно у процесу метастазирања тумора. Због тога би улогу *SP/NKR* система у метастазирању тумора требало детаљније испитати. Да је улога *NKR* важна у карциногенези говори и податак да је исти појачано експримиран у улцерозном колитису са дисплазијом високог градуса, који представља сигурну преканцерозну лезију карцинома дебелог црева, што сугерише да је овај рецептор од важности за трансформацију ћелије у малигну. Због свега наведеног, *NKR* и његова експресија могу бити искоришћени као дијагностички показатељ који може да идентификује пацијенте са хроничним колитисом који су под већим ризиком за развој карцинома дебелог црева, са могућношћу да рецептор послужи и као терапијска мета током лечења карцинома (108).

1.3.3. *SP*, емоционално понашање и карцином

Постојање потенцијалних веза између психосоцијалних фактора и појаве и развоја карцинома утицало је на научно и јавно интересовање за ову тему. Тахикинини (међу њима и *SP*) појављују се као неуротрансмитери у периферном и централном нервном систему, али се исти, заједно са својим рецепторима налазе на ћелијама које не припадају нервном ткиву, што указују на повезаност нервном и периферних органских система (нпр. респираторни, кардиоваскуларни, ендокрини, гастроинтестинални и генитоуринарни). 90-их година прошлог века, претпоставило се да психосоцијални фактори могу имати утицај на развој и прогресију канцера (109). У прилог овој претпоставци говоре и подаци да је у процесу карциногенезе начин живота битан фактор и изложеност различитим изворима стреса код људи. Могућа улога начина живота у развоју карцинома дојке важна је у светлу чињенице да стопа морталитета од ове болести наставља да расте у већини земаља до данашњег дана, јер задовољавајућа терапијска процедура за лечење овог карцинома није постигнута. Интерреакција између стреса, типа личности и психосоцијалне подршке појединца постаје предмет истраживања као један од значајнијих фактора који утичу на раст тумора, заједно са ефектом ове интерреакције која највише зависи од способности индивидуе да се са стресом суочи (110). Као полазна тачка за овакав приступ изучавању

користи чињеница да се депресија и бројни карциноми истовремено појављују као коморбидитет, са претпоставком да хронични и озбиљнији депресивни поремећаји могу представљати ризик за развој карцинома, да се преваленца депресије међу оболелим од карцинома повећава са озбиљношћу болести и симптомима као што су бол и мучнина и да на крају депресија може бити предиктивни фактор за прогресију карцинома и морталитет. Многа истраживања су показале да психосоцијална подршка коју оболели од карцинома добијају, смањује депресију, анксиозност и бол, са значајним повећањем стопе преживљавања оболелих. Постоје докази који указују на бидеркциону везу између депресије и карцинома, што отвара могућности за откривање нових терапијских модалитета за лечења (111). Познато је да су *SP* и *NKR* широко распрострањени у централном нервном систему, доминантно у структурама лимбичког система, као што су таламус и амигдале, и да се претпоставља да имају важан утицај у интеграцији емоционалног одговора на стрес, тако да и сам развој депресије може бити удружен са алтерацијама *SP/NKR* система, пошто је ниво *SP* у депресивним поремећајима значајно повишен (112). Примећено је да након дуготрајне употребе лекова са антидепресивним ефектом долази до смањења концентрације *SP* у стријатуму, *substantia nigra* и амигдалама, и да је експресија гена који кодирају синтезу тахикинина и њихових рецептора (*NKR*) у одређеним деловима мозга измењена након употребе горе поменутих лекова (113).

Смањење нивоа *SP* у одређеним регионима мозга у вези је са узајамним постигнутим терапијским ефектом антидепресива примењених за лечење афективних поремећаја. Сходно оваквим сазнањима, антагонисти *NKR* коришћени су као лекови са антидепресивним ефектом (114). Исти антагонисти показују антитуморски ефекат на велики број туморских ћелијских линија, док други антагонисти рецептора, као Апрепитант који показују широк спектар антитуморског ефекта, истовремено је исто ефикасан као и Пароксетин за лечење депресије (86). Апрепитант је уједно и лек који се добро подноси и нема статистички значајне разлике у учесталости појаве нежељених ефеката поредбено са плацебо ефектом. У складу са свиме што је наведено, закључује се да депресија може индуковати пролиферацију туморских ћелија посредством *SP/NKR* система и да употреба лекова који овај рецепторски систем блокирају може бити корисна за лечење не само депресије, већ да исти могу превенирати појаву карцинома, а у случају развијеног тумора за њихову контролу и лечење. Тако би емоционално понашање (различити облици, као што је депресија) могло да се доведе у везу са карциномом и метастазама и то преко алтерација (измена) у *SP/NKR* систему (115). Овакав систем могао би да олакша међусобну реакцију између прогресије карцинома и можданих механизма, пошто *SP* након везивања за *NKR* унутар лимбичког система узрокује појаву анксиозности и депресије, а да на исти начин, везивањем за истоветне рецепторе на туморским ћелијама доводи до пролиферације ћелија. Због тога, антагонисти овог рецепторског система уједно испољавају антидепресивни и анксиолитички ефекат у централном нервном систему, а антитуморски ефекат на туморским ћелијама. Група хроничних обољења којима је својствена поремећена регулација инфламаторног процеса, делимично се погоршањем истих доводе у везу са стресом и емоционалним поремећајима, и у том светлу постоје и запажања да је ниво депресије и анксиозности много већи код људи који болују од хроничних инфламаторних обољења. *SP* је укључена како у патофизиологију инфламаторних болести тако и у развој депресије и анксиозности (116). На крају, хипотеза је да поремећена регулација синтезе и активности *SP* и њеног рецептора може бити у основи преклапања хроничних инфламаторних болести и поремећаја расположења код

пацијената. Због тога је ова супстанца референтна у процени емоционалног обрасца понашања, хроничних инфламаторних болести и карцинома, а сама употреба антагониста рецепторског система преко којег супстанца делује може умањити емоционални стрес и симптоме хроничне инфламаторне болести, доприносећи превенцији развоја карцинома код исте индивидуе. Употребом само једног таквог лека постижу се вишеструки, веома важни ефекти за лечење разнородних, хроничних болести код исте особе.

1.3.4. Антитуморски ефекат антагониста *NKR*

Антагонисти *NKR* представљају велику породицу чији се број чланова константно повећава. Молекули који припадају овој породици су у структурном погледу различити. Постоје две врсте антагониста овог рецепторског система: пептидни и непептидни; пептидни (нпр. *NY-3460*, *NY-3238*, *Spantide I* и *II*) су алостеричка модификација *SP* у којем је L-амино ацид крај замењен D-амино ацид. Овакав биохемизам доводи до брзе разградње пептидних антагониста дејством пептидаза што резултује ниском ефикасношћу након примене. Поред наведеног, постоји читав низ доказано негативних ефеката пептидних антагониста, попут тог да као целовити молекули не пролазе крвно-мождану баријеру, да је изванредно неуротоксичан, да постоји проблем у неселективном афинитету за повезивање са различитим облицима тахикининских рецептора, као и изражена метаболичка нестабилност. Због свега наведеног, ови антагонисти имају врло мали и занемарљив клинички значај и примену (86). Непептидни антагонисти рецепторског система (нпр. *CP-96,345*, *CP-99,994*, *L-732,138*, *WIN-51,708*, *L-733,060*, *L-742,694* и *Апрепитант*) не разграђују се посредством пептидаза, због чега су стабилнији у поређењу са пептидним, представљају липосолубилне материје које могу да пролазе крвно-мождану баријеру, па је клиничка примена и значај истих евидентан. Непептидни антагонисти такође, подразумевају бројне састојке са различитим биохемијским дејством, али ипак показују сличне стереохемијске особности (нпр. афинитет везивања за *NKR*). Након примене и везивања за *NKR* антагонисти испољавају различите ефекте попут анксиолитичког, антидепресивног, аналгетског, антиинфламаторног и антитуморског ефекта. До данас, откривено је преко 300 различитих непептидних антагониста, са високим афинитетом за *NKR* (117). Оваква чињеница говори да постоје 300 различитих потенцијалних лекова за лечење карцинома. Значајнији напредак постигнут је развојем високо селективних антагониста *NKR* који је допринео бољем разумевању биолошке активности *SP* и патофизиолошког значаја *NKR*. Развој антагониста рецепторског система омогућио је откривање још супстанци са деловањем против овог система које би могле да послуже као нова терапијска средства. Претпостављена антитуморска активност непептидних антагониста *NKR* не заснива се на њиховом хемијском саставу већ на стереохемијским особинама. *SP* и непептидни антагонисти *NKR* везују се за различита места на рецептору; *SP* и хидросолубилни пептидни антагонисти *NKR* везују се за екстрацелуларни домен рецептора, док се липосолубилни непептидни антагонисти *NKR* за дубље трансмембранске структуре, негде између 3, 4, 5 и 6 дела. Из тог разлога, преклапања између *SP* и пептидних и непептидних антагониста *NKR* је изузетно слабо. Оваква ситуација условљена је вероватно због тога што *NKR* функционише по принципу алостеричког молекула, где агонисти и антагонисти погађају различите конформационе облике рецептора (118).

Примењени антагонисти, у дозно-зависном режиму, блокирају дејство *SP* и то након везивања за *NKR*. На нивоу централног нервног система, ови лекови могли би да буду

корисни као потенцијални аналгетици, антидепресиви, анксиолитици и лекови против мучнине, са могућношћу лечења озбиљнијих форми уринарне инконтиненције. У периферном нервном систему примењени антагонисти рецепторског система могу бити корисни у неколико инфламаторних обољења као што је артритис, инфламаторне болести црева (*IBD*) и циститис (119). Истраживање на пољу непептидних антагониста рецепторског система развија се великом брзином и постоји велики број доказа у вези супстанци које испољавају дејство поменутих антагониста. Стероиди, перхидроизоиндолони, бензиламино и бензилетер пиперидини, као и триптофан потврђено поседују антагонистичко дејство на *NKR*.

Инхибиција раста и изазивање смрти туморских ћелија ћелија

L-733, 060 је селективни и потентни непептидни антагониста *NKR* који припада фамилији бензилетер пиперидина антагониста. Његовом употребом постиже се аналгетски и антидепресивни ефекат у организму, а оправдана је и примена за лечење одређених анксиозних и поремећаја расположења, као и за лечење инфламаторних болести јетре, посредством блокирајућег дејства на *SP*. Овај антагониста у потпуности инхибира миграцију туморских ћелија која је посредована *SP* и испољава антитуморски ефекат на неколико туморских ћелијских линија. У *In vitro* студијама показано је да *L-733, 060* антагонисти комбиновани са винбластином или агенсима који нарушавају микротубуле, показују синергистички ефекат за инхибицију раста великог броја туморских ћелијских линија који је посредован *NKR* (*T98G, U87, HeLa, T24* и *MDA-MB-231*), али не и за нормалне фибробласте у пућима *IMR-90*. Комбинацијом ових лекова добија се снажнији ефекат против *NKR* који је појачано експримиран на туморским ћелијама и синергистички ефекат агенаса који нарушавају микротубуле и антагониста *NKR* може имати одређен клинички значај. Овакво откриће може допринети утврђивању нових веза између различитих хемијских састојака који се користе као хемиотерапеутици (120). *L-732, 138* (*N-acetyl-L-tryptophan 3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl ester*), деривати триптофана, показују конкуритивни, селективни антагонизам за *NKR*. Апрепитант (*MK-869, L-754,030*) је селективни антагониста високог афинитета према *NKR*. Примењен за лечење повраћања, утврђено је да користан уједно за сузбијање бола и депресије, као и то да је прилично безбедан за организам, у дози од *300mg* дневно добро се подноси и не показује статистички значајну разлику за појаву нежељених дејстава у поређењу са плацебо ефектом. Истовремено је потврђено да је безбедан и нешкодљив за нормалне фибробластне ћелије које могу бити 3 пута више присутне од туморских. Од интереса је утврдити да ли се третирањем туморских ћелијских линија другим антагонистима *NKR*, као што је елопитант, вофопитант и фосапрепитант, испољавају исти инхибиторни ефекат на ове ћелијске линије који је описан након примене апрепитанта и њему сродних антагониста. Доказано је да испитивани антагонисти *NKR*, па и сам апрепитант имају доказано антитуморско дејство на туморским ћелијским линијама глиома (*GAMG*), карцинома ларинкса (*HEp-2*), неуробластома (*KELLY, SKBBE* и *IMR-32*), ретинобластома (*WERI-Rb-1* и *Y-79*), меланома (*COLO 679, COLO 858* и *MEL HO*), карцинома желуца (*23132/87*) и колона (*SW-403*), као и карцинома панкреаса (*CAPAN-1* и *PA-TU 8902*) (86). Добијени резултати показују да међу примењеним различитим врстама антагониста постоји различита ефикасност на одређеним туморским ћелијским линијама. Најефикаснији показао се *L-732, 138* у концентрацији од *20 μM* у туморским ћелијским линијама неуробластома, при чему је *L-733, 060* био око четири пута потентнији од *L-732, 138*. Показано је да *L-733, 060* показује снажнији антитуморски ефекат на туморским

ћелијским линијама од примењеног апрепитанта, али да је ефикасност апрепитанта већа од *L-732, 138* (121). Познато је да циклоспорин А широко примењиван у клиничке сврхе, лек са имуносупресивним ефектом који своје дејство испољава као антагониста *NKR*. Овај циклични недекапептидни лек има широк спектар антитуморског дејства (нпр. за лечење глиома, неуробластома, ретинобластома, карцинома ларинкса, панкреаса, желуца и колоне), који остварује посредством *NKR* и да том приликом туморске ћелије умиру активирањем апоптозе (122). Могућа употреба циклоспорина А код пацијената оболелих од карцинома може имати озбиљна ограничења која су повезана са нежељеним дејствима приликом примене (нпр. нефротоксичност), мада се као адјувантна терапија, у изузетно малим количинама, може успешно користити. Инхибиција раста туморских ћелија употребом антагониста *NKR* може бити посредована апоптозом, што је доказано на линија карцинома плућа, колоне, рабдомиосаркома и неуробластома, глиобластома (123). Применом антагониста, након везивања за *NKR* који се појачано експримира на туморским ћелијама, постиже се антипролиферативни ефекат који укључује трансдукцију сигнала који регулишу апоптозу. Смрт туморске ћелије се појављује након активације система који регулише апоптозу, што представља значајно место погодно за деловање антитуморских лекова. Са аспекта молекуларних механизма још увек није познато који механизми су одговорни за појаву апоптозе у туморским ћелијским линијама након примене антагониста *NKR*. Мада, бројни гени, молекули или сигнали измењени у ћелијама карцинома, неки од њих могли би бити кључни регулатори процеса апоптозе у тумору, а извесне супстанце, поред антагониста *NKR* узрокују апоптозу туморских ћелија (92). Као пример може се узети селективни инхибитор *COX2* (*NS398*) који узрокује ослобађање цитохрома *c* из митохондрија као и појава каспаза 9 и 3 и *PARP* ензимске активности који сви воде ка апоптози у ћелији, као и *TRAIL* (индукујући лиганди фактора некрозе тумора повезаног са апоптозом), сви они индукују апоптозу у туморским ћелијама везујући се за рецепторе смрти *DR4* и *DR5* (124). Било које оштећење генома може активирати један или више сигналних путева програмиране ћелијске смрти. Туморске ћелије теже да изнађу начин да избегну многобројне сигналне путеве који доводе до ћелијске смрти и претпостављено је да један од значајнијих начина којима то успевају јесте активација или измена фенотипског изражаја *NKR* (125). Повећана експресија овог рецептора на туморској ћелији исту чини изузетно зависном од стимулације *SP*, која изазива снажан митогени ефекат у ћелији. Овакав повећан митогени сигнал може да се супротстави различитим сигналним путевима смрти ћелије који су у туморској ћелији активирани посредством оштећења сопственог генома, активације онкогена или било којим другим узроком, и који је независан од одређеног генетског профила у сваком тумору понаособ. Претпостављено је да заједно и инхибиција раста и смрт ћелије настали након употребе антагониста *NKR* рецепторског система настају секундарно и да је узрок томе губитак стимулације ћелијске пролиферације сигналом преко *NKR* посредством *SP*. Одсуством сигнала за пролиферацију ћелије након блокирања рецептора примењеним антагонистима, може се изместити равнотежа унутар ћелије у смислу преовладавања сигнала апоптозе/смрти, због чега таква ћелије умире. У сваком тумору постоје различите комбинације мутација, активације онкогена и/или губитак супресорних гена, и различити сигнали смрти су утишани митогеним стимулусима посредованим активношћу *SP*. На основу наведеног, антагонисти *NKR* остављају ћелију суочену са ефектом сигнала смрти или у најмању руку утичу на равнотежу живота и смрти где фаворизују ово друго. Скорија истраживања су показала да је *NKR* укључен у вијабилност туморске ћелије (86). У

истраживањима са ткивом КД, показано је да употребом апрепитанта и следственом супресијом *NKR* долази до инхибиције раста туморских ћелија као и индукције апоптозе у бројним ћелијским линијама карцинома дојке, посредством измена у кључним сигнаlima путева ћелијске пролиферације и преживљавања (126). Смрт ћелије која се појављује у туморским ћелијским линијама након примене антагониста *NKR* повезује се са општим токсичним ефектом оваквих агенаса или са друге стране она може настати као резултат неке специфичне активности. У истраживањима је показано да је ова друга могућност извеснија (86, 121) из следећих чињеница: 1. туморске ћелије експримирају *NKR*; 2. *SP* се специфично везује за овај рецептор и изазива митогени ефекат; 3. антитуморска активност антагониста *NKR* је дозно зависна и 4. експерименти на хуманим туморским ћелијским линијама показују да ћелијска пролиферација егзогеном *SP* је делимично обрнуто пропорционална ефекту примењених антагониста *NKR*. Долази се до закључка да антагонисти *NKR* блокирају исте који су појачано експримирани на туморским ћелијама и да структурно разнородни молекули пиперидина (*L-733, 060*), триптофана (*L-732, 138*) и морфолина (апрепитант) испољавају идентичну антитуморску активност након примене (једина заједничка особина ових молекула је пријемчивост за *NKR*). Без обзира на све поменуто, у различитим туморским ћелијским линијама, хуманог неуробластома, глиома, акутне лимфобластне левкемије, ретинобластома, меланома и карцинома панкреаса, ларинкса, желуца и колоне, истоветни антагонисти *NKR* изазивају инхибицију ћелијског раста. Овакве чињенице упућују на постојање заједничког механизма пролиферације туморске ћелијске и *NKR*; чињеница да антагонисти *NKR* могу инхибирати велики број различитих туморских ћелија у којима је експресија овог рецептора повећана и да ти исти антагонисти могу бити кандидати за антитуморске лекове широког спектра деловања (86). Код обичних мишева којима је аплициран ксенографт остеосаркома (*MG-63*) након примене субкутане перитуморске ињекције фосапрепитанта дошло је до значајног смањења величине тумора и у сличном *In vivo* моделу ксенографта хепатобластома у мишева регистровано је да примена *80mg/kg/24h* апрепитанта за 24 дана изазива значајно смањење раста тумора, што се може измерити кроз величину и тежину тумора, смањење нивоа тумор-специфичног алфа фетопротеина у серуму и смањење броја *Ki67* позитивних ћелија (121). Скорија истраживања су показала да примена антагониста *NKR Emend IV* изазива смањење масе тумора и пролиферације туморске ћелије (127). Као могући молекуларни механизми заустављања раста туморских ћелија наводе се следећи: Инхибиција раста туморских ћелија и увођење ћелије у *G1* фазу мировања

У истраживању, уз помоћ различитих метода утврђивања броја ћелија у узорку (*Trypan blue* тест искључивања-за број и вијабилност ћелија; утврђивање метаболичке активности у микрокултури тетразолинским тестом-*MTT*; бромдеоксиуридин тест пролиферације- *BrdU ELISA kit* тест), доказан је антипролиферативни и цитотоксични ефекат апрепитанта у растућим концентрацијама (*5-30mM*) у различитим временским интервалима (24 и 36h). Поред овога, у сличним тестовима доказана је и смањена метаболичка активност ћелија. Даљим испитивањем, утврђено је да апрепитант узрокује накупљање ћелија у *G1* фази, а смањује популацију ћелија у *S* фази и да се субпопулација хиподиплоидних ћелија *G1* фазе повећава у дозно-зависном режиму, указујући тако на проапоптотски потенцијал примењеног инхибитора (128).

- **Индукција апоптозе посредством активације *caspase-3***

Да би се утврдило да ли је цитотоксични ефекат апрепитанта удружен са индукцијом апоптозе у ћелијској култури, уз помоћ flow цитометрије анализирана је

модулација испољеног фосфатидил-серина. *Western blot* анализом испитивана је протеолитичка обрада *caspase-3* и утврђено је да апрепитант, у дозно-зависном режиму доводи до повећања активности *caspase-3*, која даље изазива процес програмиране смрти пре Б ћелија *ALL* (128).

- **Утицај на смањење односа фосфорилисаног/укупног *Akt***

Постоје бројни докази који указују да активација *Akt*, најважнијег чиниоца нисходне регулације *PI3K* сигналног пута, представља главни механизам који је умешан у настанак фенотипа *ALL*, резистентног на хемиотерапију тј тумора са лошијом прогнозом (129). Новија истраживања показују да стимулација *NKR* на ћелијама глиобластома повећава фосфорилацију и активацију *Akt*, па сходно томе покушава се са испитивањем да ли инхибицијом рецептора употребом апрепитанта долази и до инхибиције *Akt*. У овом истраживању утврђено је да редукција односа фосфорилисан/укупни *Akt* постоји код ћелија третираних инхибитором и да је она дозно-зависна, указујући да је апрепитант ефикасан у прекидању мреже сигнала у ћелијама *ALL* блокирањем фосфорилације *Akt* (128).

- **Утицај на експресију нивоа *NF-κB* антиапоптотског гена**

Резултати спроведених новијих истраживања показују да *Akt* регулише активацију *NF-κB* индукујући фосфорилацију и каснију разградњу инхибитора *κBa* (*IκBa*) (130). У истраживању применом *real time PCR* методе праћени су нивои *mRNA* најважнијих антиапоптотских *NF-κB* гена, *Bcl-2*, *MCL1*, *XIAP*, сурвивин и *c-IAP1* при чему није било никаквих промена нити у експресији протеина *p-IκB* нити нивоа антиапоптотских гена након примене апрепитанта, па се сматра да апоптоза настаје путем који је независан од *NF-κB* (128).

- **Индукција накупљања *p53* и експресија проапоптотских *p53* гена**

Осетљивост туморских ћелија на апоптозу умногоме зависи од равнотеже између *p53* и *NF-κB* (92). За разлику од стимулације *NF-κB*, активација *p53* показала се као промотер програмиране ћелијске смрти преко индукције транскрипцијске активности бројних проапоптотских гена. Да би истражили да ли је апрепитантом индукована апоптоза посредована вероватно *p53* сигналним путем, у истраживању је евалуиран ниво и протеина и *mRNA p53*. Поред тога, узети су у разматрање и сви регулаторни гени (*Bad*, *Bax*, *PUMA*, *c-Myc*, *p21* и *p27*) који на било који начин учествују у апоптози и ћелијском циклусу. Резултати истраживања показују да примена апрепитанта од 20 μM доводи до позитивне регулације *mRNA* за *p53* као и нивоа протеина, али да истовремено повећава транскрипцију активност проапоптотских гена *Bad*, *Bax* и *PUMA*, кључних проапоптотских гена. Резултати истраживања показују да примена апрепитанта изазива стимулишући ефекат на транскрипцију активност *p21*, и *p27*, што се поклапа са индукцијом прекида ћелијског циклуса у *G1* фази. И на крају, утврђено је да апрепитант изазива значајан блокирајући ефекат на транскрипцију активност *c-Myc* гена, који је неопходан за подстицај напредовања ћелијског циклуса путем супресије инхибитора циклин-зависне киназе *p21* (128).

- **Индукција акумулације реактивних кисеоничних радикала купловано позитивном регулацијом *FOXO3a* и *p73***

Поред индуктивног ефекта *p53* на проапоптотске чланове фамилије *Bcl-2* гена, исти доказано индукује апоптозу кроз продукцију реактивних кисеоничних радикала (131). У ранијим истраживањима показано је да повећан ниво реактивних кисеоничних радикала води до повећане експресије *p73* који даље активира пут апоптозе углавном преко

активације *FOXO3a* који је кључан у нисходној регулацији *Akt* осовине (132). Сходно оваквим сазнањима, претпостављено је да блокирање *NKR* може утицати на продукцију реактивних кисеоничних радикала што даље може узроковати повећање транскрипционе активности *p73* и *FOXO3a*. У истом истраживању је управо доказано да постоји дозно-зависна повећана продукција реактивних кисеоничних радикала након третмана ћелија апрепитантом. Такође, доказано се да у ћелијама постоји повећање нивоа *mRNA* за *p73* и *FOXO3a*, чиме је указано на могућу унакрсну везу реактивних кисеоничних радикала са *p73* и *FOXO3a* у апоптози индукованој апрепитантом (128). Сви експерименти недвосмислено су указали на антитуморско дејство примењених антагониста *NKR*.

- **Инхибиција ангиогенезе у тумору**

Неоваскуларизација или неоангиогенеза је секвенциони процес, са раном фазом пролиферације ендотелних ћелија која је праћена стварањем нових крвних судова и повећањем протока крви, што је повезано са ендогено створеним факторима неуроваскуларног регулаторног система који почињу да се појављују нешто касније у овом процесу, у подручјима инфламације. Једна од заједничких карактеристика хроничних инфламаторних процеса јесте раст нових крвних судова из постојећих васкуларних структура у ткиву (сматра се да је рана неоангиогенеза кључна у преласку акутног у хронични инфламаторни процес) који је значајан и током процеса зарастања ране. Неоангиогенеза, као показатељ развоја тумора, повезана је са повећаном инервацијом и експресијом *NKR* у тумору. Као што је више пута спомињано, доказано је да велика већина тумора показује повећано присуство *SP* и експресију *NKR* у интра- и перитуморским крвним судовима, а да *SP* који је важан медијатор неурогене инфламације кроз ослобађање различитих пептида из нервних завршетака, узима активно учешће у расту капиларних крвних судова *in vivo* и пролиферацији културе ендотелних ћелија *in vitro*. Доказано је у експерименталним моделима да након примене аналога *SP* (*SPA*), који су истоветни антагонистима *NKR* долази до развоја антитуморског антиангиогеног ефекта, док се сама ангиогенеза може подстаћи употребом *SP* (133). У експерименталном мишијем моделу са ксенографтом хепатобластома показан је инхибиторни ефекат примењеног апрепитанта над процесом ангиогенезе у тумору (121). Пролиферација ендотелних ћелија која је подстакнута агонистом *NKR* повећава се у дозно-зависном режиму (антагонисти *NKR* блокирају пролиферативни импулс *SP*), док са друге стране, селективни агонисти *NKR-2*, 3 немају већи значај за пролиферацију ендотелних ћелија (86). Оваква сазнања указују да агонисти *NKR* као што је *SP*, могу директно стимулисати процес неоваскуларизације, вероватно посредством индукције пролиферације ендотелних ћелија и да овако индукован процес представља резултат директне активности на микроваскуларној мрежи путем *NKR*. Са оваквим значајем рецептора који су високо експримирани на крвним судовима, *SP* која специфично препознаје исте, може имати изузетно велики утицај на структуру и функцију васкуларних елемената како унутар тако и у околини тумора, повећањем перфузије унутар тумора и подстицањем развоја строме у истом (101). Потврђено је да у карциному панкреаса *SPA* изазива антипролиферативни и антитуморски ефекат (који могу бити од користи за клиничку терапијску примену), иако сама суштина ових механизма није до краја разјашњена (134). У покушају да се непознанице разреше, наводе се следеће чињенице за које се сматра да су важне: у карциному панкреаса *NKR* је високо експримиран на крвним судовима (не само унутар туморске масе, већ и у њеној околини) (135); наномоларне концентрације *SP* доводе истовремено до пролиферације туморских ћелија у карциному панкреаса (136) и

стимулишу раст нових крвних судова подстицањем пролиферације постојећих ендотелних ћелија и ангиогенеза условљена селективним агонистима *NKR* (137). Извесно је да на основу свега наведеног, пролиферација туморских ћелија и неоангиогенеза могу истовремено бити инхибирани употребом антагониста *NKR*, који блокирају активност *SP* (121). Закључује се да је *NKR* рецептор одговоран за антипролиферативни и антиангиогени ефекат у тумору, који су посредовани *SPA* и непептидним антагонистима *NKR* (нпр. апрепитант). Извесно је да *SP/NKR* систем контролишу неоангиогенезу и да такође, вероватно истим начином регулише раст тумора, пошто се *NKR* појачано експримирају како на ћелијама самог тумора тако и у околном ткиву. Тако се употребом антагониста рецепторског система може искористити у циљу инхибирања процеса неоангиогенезе и раста тумора.

- **Инхибиција инвазије тумора и метастазирања**

Значај хируршког уклањања тумора познат је више стотина година. Након предузетих успешних оперативних процедура, компликације током касније терапијског поступка су битно превазиђене, тако да се данас смртни исходи у преко 90% случајева повезују не са примарним тумором, већ развијеним метастазама (138). Сходно овоме, највећи акценат током лечења тумора треба ставити на спречавање ширења туморских ћелија, што ће свакако онемогућити даљи развој смртоносних метастаза. У једном моделу у коме је посматран развој метастаза из тумора који је заснован на доказима да рецептори који су купловани *G*-протеином, познати и као серпентински или седмоструки трансмембрански рецептори, регулишу миграторну активност туморских ћелија, на сличан начин којим се одиграва регрутовање и привлачење леукоцита. Осим тога, лиганди (нпр. неуротрансмитери) који се за овакве рецепторе везују могу изазвати директну (хемотактичну) миграцију ћелија (139). Све ово значи да активна миграција туморских ћелија, која је најзначајнија за развој метастаза и прогресију карцинома, може бити контролисана сигналним молекулама, укључујући и неуротрансмитерима. Овакви сигнални молекули производе метастатски профил туморске ћелије директно регулацијом експресије одређених гена, као и повећањем миграторне активности, што може бити спречено употребом антагониста неуротрансмитера. Показано је да је миграција туморских ћелијских линија (*MDA-MB-468* карцинома дојке и *PC-3* карцинома панкреаса) индукована дејством норадреналина, допамина и *SP*, те се сходно овоме, употребом антагониста адренергичких *D2* и *NKR* рецептора овај процес може спречити. Познато је да *SP* доводи до миграције кластера ћелија карцинома панкреаса до ганглија дорзалних коренова и да је иста укључена у процес перинеуралне инвазије истог карцинома (139). Евидентно је да је појава мехурића на мембрани ћелије повезана са ширењем ћелија и процесом инвазије канцера (140). У скоријим студијама са ембрионалним ћелијама бубрега (*HEK-293*), показано је да примењен апрепитант и *L-733,060* веома брзо блокирају промене на површини мембране индуковане активношћу *SP*, укључујући и споменуто „мехурвање“ (141). Детектовано је присуство *NKR* на *MDA-MB-468* ћелијским линијама карцинома дојке; да након примене *L-733,060* долази до комплетног инхибирања *SP* индуковане миграторне активности туморских ћелија и да је код пацијенткиња са карциномом дојке ризик од појаве метастаза четвороструко смањен у периоду од 2,5 до 4 године након хируршке интервенције која је спроведена уз примену паравертебралне анестезије (142). Вероватно је да до оваквог феномена долази услед тога што облик спроведене анестезије блокира *SP* индуковану миграцију, инвазију и метастазирање туморских ћелија. На основу изнетих чињеница закључује се да *SP/NKR* систем имају

веома важну улогу у процесу ширења и метастазирања тумора. Оваква хипотеза је интересантна зато што применом паравертебралне анестезије пре хирушког уклањања тумора може бити смањен број рецидива и метастаза тумора, а да спровођењем претретмана антагонистима *NKR*, пре хирушке интервенције може имати синергистички ефекат (142). У прилог овим тврдњама стоје докази појачане експресије *NKR* у узорцима аденокарцинома желуца и туморским ћелијским линијама истоветног карцинома и то да у *In vitro* условима *SP* преко споменутих рецептора изазива пролиферацију, адхезију, миграцију и инвазију ћелија споменутог карцинома. У светлу оваквих открића, оправдана је употреба антагониста *NKR* за лечење карцинома желуца (143). Ослобађање *SP* има значајну улогу у неурогеној инфламацији. У скорије спроведеном истраживању откривено је да непосредно после повреде ткива централног нервног система један недекапептид изазива повећање пропустљивости крвно мождане баријере (КМБ), који би уједно могао да буде одговоран и за посредовање екстравазације (проласка) туморских ћелија у мозак, што за последицу има формирање метастаза у мозгу (144). Познато је да *SP* омогућава продирање ћелија карцинома дојке кроз КМБ тако што изазива промене у везама између ендотелних ћелија микроваскулатуре. *SP* коју секретује ћелије карцинома дојке, изазива миграцију ових ћелија кроз КМБ, а повећање секреције *TNF-α* и *Ang-2* и нарушеност КМБ на крају доводе до развоја метастатских огњишта у централном нервном систему (145). Насупрот овоме, употреба антагониста *NKR* (апрепитант) може да спречи продирање туморских ћелија кроз КМБ, као и њихово даље насељавање и формирање метастаза у мозгу. Овакве претпоставке отварају могућности за нове, специфичне хемиотерапијске процедуре које би спречиле инвазивност и метастазирање туморских ћелија, из разлога што је сама миграција ових ћелија први корак ка инвазији и метастазирању и зависи од супстанци имунског и неуроендокриног система. Из наведеног се види, да не само процес неоангиогенезе и раст тумора, него и перитуморска инфилтрација и метастазирање су процеси регулисани *SP/NKR* системом, а који је појачано експримиран како на ћелијама тумора тако и у околном, перитуморском ткиву (запаљенске ћелије, фибробласти, крвни судови, нерви и ганглије) (86). Употребом антагониста овог рецепторског система, *NKR* може бити мета која би била корисна у циљу блокирања свих процеса важних за опстанак и ширење карцинома и њихова потенцијална клиничка употреба показује обећавајуће резултате: селективни антагонисти *SP/NKR*, као што је апрепитант доступни су за клиничку употребу за нека друга индикативна подручја.

- **Синергистички ефекат антагониста *NKR* са хемиотерапеутицима**

Као што је више пута наглашено, употребом антагониста *NKR* и конвенционалних цитостатика у *In vitro* условима постиже се јачи, заједнички ефекат примењених супстанци. Пролиферативни и антиапоптотски сигнали који су регулисани преко *NKR*, могу бити кључни за стварање овог синергизма. Цитостатици, као нпр. винбластин, промотер је апоптотског сигнала посредством активности киназе са *c-jun N*- терминалним делом, док са друге стране чиниоци модулације *MAPK* пута могу повећати или умањити овако индуковану апоптозу. Сугерисано је да антагониста *NKR*, *L-733,060* повећава осетљивост туморске ћелије на цитостатиком посредовану инхибицију вијабилности смањивањем антиапоптотског сигнала *NKR*, што на крају резултира поспешивањем смрти ћелија, винбластином индуковану (87). Боље разумевање механизма који су кључни за овакву интеракцију може бити од користи за примену у клиничкој пракси споменутих комбинација лекова који испољавају ефикасан синергизам. Битно је да се нагласи да оваква комбинација показује синергизам када је у питању инхибиција раста посредством

NKR сигнала туморских ћелија, али не и нормалних, неизмењених ћелија. Јасно је да је примена овакве комбинације лекова од изузетне користи током хемиотерапијског протокола пацијената. Постоје докази о синергистичком ефекту примењеног антагонисте *NKR*, *L-733*, *060* и сличних цитостатских лекова (адриамицин, митомицин, ифосфамид, цисплатин) у *MG-63* ћелијама остеосаркома, али да је ефекат изостао након примене истоветне комбинације на нетуморским *HEK 293* ћелијама. Интересантно је да претретман *HEK 293* ћелија антагонистом *NKR*, *L-733*, *060* пре саме употребе цитостатских лекова, делимично штити ове ћелије од деловања цитостатика (146). Све што је речено може имати клинички значај у хемиотерапији бројних карцинома. Узимајући у обзир снажан цитотоксични ефекат антагонисте *NKR* примењеног самостално, покушало се са испитивањем комбинованог ефекта апрепитанта и доксорубицина, најпознатијег и најчешће коришћеног антрацикличног хемиотерапеутика за лечење *ALL*. Након спроведеног експеримента, пронађено је да је комбинација ова два лека изразито ефикасна у заустављању ћелијског раста и промоцији масивне апоптозе у третираним ћелијским линијама. У складу са изоболограм анализом, фракција-ефекат (*FA*) насупротив анализе комбинованог индекса (*CI*) такође показује синергистички (*CIoI*) антипролиферативни ефекат доксорубицина комбинованог са апрепитантом на пре-*B* ћелијама *ALL*.

- **Смањење нежељених ефеката радио и хемиотерапије антагонистима *NKR***

Антинеопластични лек циклофосфамид и *X*- зрачење могу да узрокују појаву неурогене инфламације мокраћне бешике и гастроинтестиналног тракта, а познато је да је оваква реакција посредована *NKR*. Познато је да антагонисти *NKR* смањују екстравазацију протеина плазме која је честа након примене антитуморских лекова (147). Закључује се да је неурогена инфламација која се појављује након примене антитуморских лекова (цитостатика или зрачења) посредована ослобађањем *SP* из нервних завршетака у ткиву; након везивања за *NKR* експримираним на крвним судовима, *SP* повећава пермеабилност крвних судова, узрокујући на тај начин екстравазацију протеина плазма. Сходно оваквим чињеницама, блокирањем *NKR* антагонистима, започета каскада инфламаторног процеса може бити прекинута, лизом или апоптозом неутрофила, где утицај медијатора инфламације, разумљиво, бива смањен. Оваква запажања су од великог значаја, с обзиром да цитостатици и зрачење изазивају, прво, запаљенску реакцију слузокоже, друго, нарушавају интегритет исте. Све ово за последицу има лакши продор бактерија (микроорганизама) и развој системске инфекције, што још више погоршава неутропенија, секундарно настала након примене горе споменуте терапије. Насупрот овоме, употреба антагониста *NKR* утиче на појаву неурогене инфламације, како директне (узроковане зрачењем) тако и индиректне (узроковане медијаторима инфламације). Закључује се да комбинована примена антагониста *NKR* и хемиотерапеутика и/или зрачења има двојак ефекат: са једне стране, промовише синергистички антитуморски ефекат, а са друге стране, смањује нежељене ефекте примењене хемио и радиотерапије (148).

- **Безбедност и толеранција примењених антагониста *NKR***

Антагонисти *NKR* не изазивају озбиљније нежељене реакције у организму након примене, мада су пријављени симптоми попут главобоље, штуцања, вртоглавице и поспаности непосредно након примене лекова (149). Како неселективни антагониста *NKR* *L-733*, *060* не изазива значајније нежељене ефекте на кардиоваскуларном систему, тако и селективни (Апрепитант) представља прилично сигуран лек за употребу по питању ових нежељених дејстава у организму. Сви други лекове из групе споменутих антагониста који су се користили за смањивање мучнине и повраћања код пацијената генерално су се добро

подносили, са минималним нежељеним ефектима. Апрепитант (*Emend*, МК-869, L-754, 030) и Фосапрепитант (*Ivemend*, МК-0517, L-758, 298; измењена форма Апрепитанта, настала деловањем убиквитарне фосфатазе) су једини лекови доступни за комерцијалну употребу, за превенцију мучнине и повраћања након хемиотерапије и у постоперативном периоду (150). Такође, утврђено је да јединствена доза од 150mg Фосапрепитанта примењена интравенозно код пацијената је исто безбедна и ефикасна као и орална примена Апрепитанта 3 дана (151). Изгледа да је Апрепитант добар кандидат у будућим клиничким истраживањима за тестирање антитуморске активности, јер је тренутно лек у клиничкој употреби једино за превенцију мучнине и повраћања током хемиотерапијског протокола, мада су нека истраживања по питању безбедности примене ових лекова већ спроводена. Поред свега наведеног, доказана је безбедност Апрепитанта према хуманим фибробластима: IC_{50} за туморске ћелије је нижи него исти за фибробласте и IC_{50} за нетуморске ћелије је $90\mu M$, док је IC_{100} за туморске ћелије $60\mu M$. Испитано је и доказано да примену Апрепитанта у дози од 300mg дневно пацијенти добро подносе и да није примењена разлика у појави нежељених ефеката у поређењу са датим плацебом. У складу са свим наведеним, предлаже се да се повећају дозе Апрепитанта у односу на оне примењене за спречавање мучнине и повраћања током хемиотерапије, као и да се дужина примене антагониста *NKR* продужи, што би као крајњи циљ имало постизање антитуморског ефекта примењеног лека (152). Овакве претпоставке захтевају подробнија истраживања како би се доказало да ли лек који је коришћен као антиеметик, може уједно, под промењеним условима да покаже и антитуморски ефекат. На сличну тему постоје истраживања карциногенезе које су се бавиле испитивањем Апрепитанта и у истим је антитуморски ефекат лека био повезан са *CYP* метаболизмом јетре (117).

Само у 2018. години, КД је био одговоран за око 627 000 смртних случајева, са новодијагностикованим случајевима више од 2 милиона широм света. Императив је да се у будућности поради на смањењу како инциденце тако и морталитета од овог облика карцинома са побољшањем прогнозе код оболелих уопште. Тако нешто могуће је само откривањем нових поља на пољу молекуларних механизма укључених у карциногенезу овог карцинома. У основи биологије/природе развоја и прогресије карцинома налазе се изузетно компликовани регулаторни механизми. Захваљујући резултатима високо технолошких метода добијене су значајне информације у вези са кључним генским алтерацијама и биолошким догађајима у КД. Све нове информације пружају увид у нове, модерније и ефикасније стратегије лечења пацијенткиња, као и њихову прераспodelу која је од изузетног значаја током дуготрајног процеса лечења КД. Свакако је да последњих година посебну пажњу истраживача привукла фамилија неуропептида, познатијих као тахикинини, како по питању њиховог учешћа у прогресији и развоју КД, али истовремено не тако мање значајан удео у појави и развоју депресивног/анксиозног поремећаја. Напред наведена чињеница могла би да представља потенцијални одговор на питање коморбидитета карцинома и депресије код оболелих, али и то како болести једна на другу утичу (153). Супстанца *P* (*SP*), неурокинин *A* (*NKA*), и неурокинин *B* (*NKB*) најзначајнији чланови фамилије неуропептида, свој биолошки ефекат испољавају преко неурокининских рецептор (*NK1R*, *NK2R* и *NK3R*), суперфамилија рецептора куплованих *G* протеином. *SP* као најбитнији и широко распрострањен члан ове фамилије своје ефекте остварује преко *NK1R* према којем испољава највећи афинитет. Улоге ове супстанце су јако разноврдне и значајне и крећу се од улоге у зарастању рана, неурогеној инфламацији, вазодилатацији, преношењу сигнала бола, ублажавање мучнине и повраћања након

хемиотерапије (*CINV*), са озбиљним учешћем у покретању процеса туморске иницијације, трансдукцијом интрацелуларних сигнала након везивања за *NK1R* (101). Повећана регулаторна активност *SP/NK1R* система откривена је и описана у многим туморима попут глиобластома, ретинобластома, карцинома плућа, ендометријума и панкреаса, са учешћем како у прогресији тако и даљем ширењу карцинома. Имунохистохемијским методама потврђена је експресија *NK1R* у тумором измењеним ћелијама КД. Поремећена активност *SP/NK1R* система одговорна је за многе про-туморске процесе КД укључујући ћелијски раст, пролиферацију, миграцију, метастазирање, појаву резистентности на дотад ефикасну терапију, као и неоангиогенезу (153). Доказано је да *SP* подстиче туморску прогресију након везивања за *NK1R* и то преко три механизма: 1. као универзални митоген за туморске ћелије које појачано експримирају *NK1R* (пептид такође потенцира антиапоптозни ефекат); 2. стимулацијом раста ендотелних ћелија (неоангиогенеза) и позитивна регулација раста тумора; 3. везивањем за *NK1R SP* изазива миграцију туморских ћелија која је од велике важности за инвазивност и метастазирање тумора. Супротно, антагонисти *NK1R* испољавају три комплементарна механизма: 1. антипролиферативна активност, удружена са инхибицијом раста туморске ћелије, активности која се специфично одвија преко *NK1R* који се појачано експримирају на њима, узрокујући тако смрт туморске ћелије посредством апоптозе; 2. инхибиција ангиогенезе у тумору и 3. блокирање миграције туморских ћелија (утицај на инвазију и метастазирање). Антитуморска активност антагониста *NK1R* изгледа не зависи од саме хемијске структуре, већ да је значајније повезан са стереохемијским карактеристикама. Извесно је да антагонисти инхибирају раст туморске ћелије у дозно-зависном режиму. Поред овога, треба нагласити да је овај рецепторски систем уплетен и у емоционални стрес и хроничну инфламацију, процесе који сигурно имају утицај на повећање ризика за развој карцинома, а касније и на понашање тумора. У прилог таквој тврдњи говоре подаци да након примене антагониста овог рецепторског система настаје озбиљни антидепресивни и анксиолитички ефекат. Сва наведена запажања сугеришу да *SP/NK1R* систем може имати изузетно важну улогу у појави и каснијем развоју тумора и његовом метастазирању; због тога рецептор може бити обећавајућа мета која може помоћи у превенцији и лечењу карцинома; самим тим, употребом антагониста *NK1R* може се унапредити терапијски процес карцинома. У складу са свиме што је наведено, горе поменути антагонисти могли би бити нова генерација антитуморских лекова. У 21. веку, ери молекуларне медицине, где лекови циљано, у виду „магичног метка“ погађају туморске ћелије, антагонисти *NK1R* као нова генерација антитуморских лекова обећавају ефикасност као својеврстан „интелигентни (паметни) метак“ (86).

2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Циљеви истраживања

Основни циљ овог истраживања је анализа везе између депресивности/анксиозности и експресије *NKR* у КД. Да би се ово постигло, поставиће се следећи циљеви:

1. Одредити постојање и степен депресивности/анксиозности код жена оболелих од карцинома дојке, методом самопроцене.
2. Анализирати експресију *NKR* у ћелијама карцинома дојке и у непромењеном/бенигном ткиву дојке, уз дефинисање тачке раздвајања, након чега ће се истраживање усмерити на анализу експресије *NKR* у различитим молекуларним профилима карцинома дојке (Јуминални А и В, *HER-2* позитивни, троструко негативни) уз одређивање могуће повезаности са хистоморфолошким и имунофенотипским карактеристикама тумора.
3. Одредити могућу повезаност експресије *NKR* и параметара ангиогенезе, пролиферативног и апоптотског индекса у карциномима дојке.
4. Крајњи задатак је утврђивање могуће везе између степена депресивности/анксиозности код оболелих жена са једне, и експресије *NKR*, пролиферације, апоптозе, ангиогенезе и молекуларних субгрупа карцинома дојке, са друге стране.

2.2. Основне хипотезе

1. Жене оболеле од КД показују различит степен анксиозности и депресивности
2. Степен депресивности/анксиозности је у корелацији са нивоом експресије *NKR* у КД
3. Пролиферативни индекс *Ki67* је у корелацији са експресијом *NKR*
4. Маркер апоптозе (*caspase-3*) је у корелацији са експресијом *NKR* у КД
5. Експресија *VEGF*-а (маркер ангиогенезе) и експресија *endoglin* (*CD105*)-маркер МВГ су у корелацији са експресијом *NKR* у КД
6. Имунофенотип молекулских подтипова КД је у корелацији са експресијом *NKR*
7. Експресије *NKR* у КД и степен депресивности/анксиозности у корелацији је са хистоморфолошким карактеристикама КД

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Врста студије

Опсервационо, проспективна некохортна студија, при чему постоје две кохорте: кохорта жена са депресијом и кохорта жена без депресије. У области изучавања фундаменталних патогенетских механизма болести коришћењем патохистолошког материјала из постојеће архиве, по дизајну - студија пресека.

3.2. Одобрење етичког комитета

Експериментални део студије је изведен на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија и у Служби за патолошкоанатомску дијагностику, Универзитетског Клиничког центра Крагујевац, Србија, у периоду од јуна 2015. до октобра 2019. године. Спровођење студије на материјалу узетом од болесника одобрио је Етички комитет Универзитетског Клиничког центра Крагујевац, Србија, као клиничко-експерименталну, неинтервентну студију, која се спроводи искључиво у научноистраживачке сврхе, број 01/15/2854 од 11.03.2015. године. Протокол је спроведен у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе (енгл. *Good Clinical Practice, GCP*) и Хелсиншке декларације (енгл. *The World Medical Association, WMA, Declaration of Helsinki*).

3.3. Популација која се истражује

У истраживање су укључене пацијенткиње којима је дијагностикован и патохистолошки верификован КД, на Клиници за хирургију и у Служби за патолошкоанатомску дијагностику, као и пацијенткиње који су долазиле на радио и хемиотерапију у Центру за онкологију УКЦ Крагујевац.

Критеријуми за укључивање испитаница у студију су: патохистолошки верификована малигна болест дојке, старост ≤ 65 година, потписан информисани пристанак за учешће у истраживању.

Искључујући критеријуми за одабир испитаница су старост > 65 година, жене са већ дијагностикованим психијатријским болестима, пацијенткиње са мултиплим, синхроним и метахроним туморима.

3.4. Општи протокол истраживања

Подаци потребни за испитивање прикупљани су проспективно, тако што се пацијенткињама које су долазиле на операцију (преоперативно), онима које су долазиле по патохистолошки налаз (7-20 дана након операције) и пацијенткињама након спроведене онколошке терапије (редовне контроле), давао анкетни лист за самопроцену депресивности/анксиозности (Цунгова скала за самопроцену депресивности/анксиозности; *Zung WW. A self-rating depression scale/Zung WW. A rating instrument for anxiety*) (154, 155). Упитник се састоји од 20 питања која се односе на актуелно стање код испитаника, са могућношћу одабира само једне од четири понуђене опције одговора (1-Ретко, 2-Понекад, 3-Углавном, 4-Најчешће). Укупан скор попуњене анкете добијао се сабирањем вредности појединачних одговора, са тим што се одређена питања (2,5,6,11,12,14,16,17,18 и 20/5, 9, 13, 17 и 19) у скору бодују инверзно (1=4, 2=3, 3=2, 4=1). Укупан скор подразумева постојање/ непостојање поремећаја (депресивност/анксиозност) у следећем облику: скор

до 40-нема поремећаја; 40-50-благи степен поремећаја; 50-60-умерени степен поремећаја; 60-80-тежи степен поремећаја који би захтевао хоспитализацију.

Након хируршке интервенције (тумеректомије/мастектомије) пажљивом анализом материјала, узимани су исечци за патохистолошку евалуацију КД. Пошто је спроведена неопходна фиксација и рутинска обрада ткивног материјала, одрађена је микроскопска анализа хематоксилин-еозин (*H&E*) обојених препарата са постављањем завршне патохистолошке дијагнозе, као и имунохистохемијска анализа ткивне експресије примењених маркера.

3.5. Методе

Експериментални део истраживања спроведен је на материјалу добијеном након хируршког отклањања тумора/дојке (тумеректомија/мастектомија). Као методе коришћене су стандардна патохистолошка анализа и имунохистохемијски метод.

На стандардним, хематоксилин-еозин (*H&E*) обојеним препаратима КД, извршена је патохистолошка анализа, са одређивањем свих параметара од значаја. Сва имунохистохемијска бојења спроведена су уз контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола према пропозицијама *UK NEQAS (UK National Ext Quality Assessment for Immunocytochemistry)*. Након читавања патохистолошких и *ИНС* резултата, извршена је статистичка обрада података. Микроскопска анализа тумора и оцењивање експресије маркера одрађена је на микроскопу типа *Carl Zeiss, Axioscop 40*. Препарати са репрезентативним пољима, фотографисани су коришћењем три микроскопска увељача (*x10, x20* и *x40*), помоћу камере *Canon PC 1089*.

3.5.1. Стандардна патохистолошка обрада и анализа

Приликом рутинске обраде препарата, добијени узорци ткива су фиксирани у 10% неутралном пуферисаном раствору формалина, на собној температури, током 24 часа. Након моделирања, ткивни узорци су стављени у одговарајуће касете које су монтиране у ткивни процесор (*Leica TP 1020, Leica Biosystems, Nussloch, Germany*). Потапањем кроз серију алкохола растуће концентрације узорци су у ткивном процесору дехидратисани, просветљавани у ксилолу и прожимани парафинским воском на следећи начин: два пута у 86%-тном етанолу у трајању од по 90 минута; два пута у 96%-тном етанолу у трајању од по 90 минута; три пута у апсолутном алкохолу у трајању од по 90 минута; три пута у ксилолу у трајању од по 90 минута и потопљени три пута у парафински восак чија је температура од 58-60°C у трајању од по 90 минута. Након обраде, ткивни узорци су разливани и калупљени у парафинске блокове, на којима су начињени попречни серијски пресеци дебљине 4 μm на ротационом микротому (*Leica RM 2135, Leica Biosystems, Nussloch, Germany*), пласирани у водено купатило (*Leica HI 1210, Leica Biosystems, Nussloch, Germany*) на температури од 40°C до 45°C и на крају монтирани на плочице. После сушења у трајању од 30 минута одрађено је бојење ткивних пресека, стандардном хистохемијском методом бојења хематоксилин-еозин (*H&E*). Плочице са ткивним пресецима су загрејане у термостату на температури од 58°C у трајању од 60 минута. Уследила је рехидратација ткива потапањем ткивних пресека исечака у серију алкохола опадајућих концентрација, на следећи начин: 10 минута у апсолутном алкохолу, 10 минута у 96%-тном алкохолу, затим 1 минут у 86%-тном алкохолу, након чега су исечци испирани 5 минута у дестилованој води. Након испирања плочице са ткивним исечцима

потопљене су 4 минута у Mayer-ов хематоксилин (*Hematoksilin M, HEMM-OT-1L, BioGnost S, Zagreb, Croatia*). Након тога су ткивни исечци испирани 1 минут у текућој води и бојени алкохолним еозином у трајању од 3 минута (*Eozin Y 1% vodeni, EOY-10-OT-1L, BioGnost, Zagreb, Croatia*). Након тога је уследила дехидратација исечака потапањем у серију растућих концентрација алкохола: најпре 1 минут у 86%-тном алкохолу, затим 10 минута у 96%-тном алкохолу и на крају 10 минута у апсолутном алкохолу. Потом је одрађен поступак просветљавања када су исечци потопљени 10 минута у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, а затим два пута по 10 минута само у ксилолу. На овако обојене ткивне пресеке на крају нанета је Канада балзам (*Canada balsam, Centrohem, Београд, Србија*) и плочице су покриване покровним стаклима. На овај начин припремљени, ткивни исечци анализирани су светлосним микроскопом (x100, x200, x400).

Класична *H&E* метода омогућила је, микроскопским прегледом постављање дефинитивне дијагнозе, али и детаљну патохистолошку анализу ткивних узорака, која је укључивала одређивање стандардних и нестандартних параметара тј особина тумора (хистолошки тип, хистолошки и нуклеарни градус, дезмоплазија, мононуклеарна стромална реакција, некроза итд.). Формиран патохистолошки извештај садржао је податке о: стадијуму болести (*pTNM*), базиран на величини тумора и присуству метастаза у регионалним лимфним нодусима; хистолошком типу и степену диференцијације тумора; нуклеарном градусу и митотском индексу; присуству стромалне мононуклеарне реакције, екстензивне некрозе у тумору, дезмоплазије и перидукталне еластозе; постојању лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије; конфигурацији туморског рубца; стању ресекционих маргина; одсуству или присуству других патолошких лезија и преканцерозних стања у тумору.

3.5.2. Фотографисање ткивних пресека

Анализирани ткивни пресеци КД, обојених *H&E* методом, фотографисани су уз помоћ дигиталне камере (*Axiocam ICc1, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany*) појединачним фотографијама на микроскопском увећању 200x и уз помоћ софтвера *AxioVision (AxioVision v.4.8.2.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, München, Germany)*. Непосредно након фотографисања просветљивање фотографија је одрађено и применом опције *Automatic White Balance* која је калибрисана на основу референтних параметара произвођача. Фотографије високе резолуције коришћене су за потребе софтверске анализе.

3.5.3. Имунохистохемијски (ИНС) метод

ИНС метод базира се на реакцији антиген-антитело. Применом одговарајућих моноклонских антитела, специфичних за одређене врсте рецептора експримираних у једру, цитоплазми или на мембрани, нормалне или малигне ћелије, омогућена је визуелизација комплекса антиген-антитело, а самим тим и одређивање броја ћелија које су експримирале одређен (туморски) антиген, као и интензитет те експресије.

Ткиво је 24 часа фиксирано у 10%-тном неутралном, пуферизованом формалину и калуљено у парафину. Резови дебљине 4-5 μm , монтирани су на високо адхерентне плочице *SuperFrost®* и сушени 60 минута на температури од 56°C.

Након монтирања ткивних пресека на плочице одрађена је депарафинизација и рехидратација провлачењем кроз серију алкохола опадајућих концентрација. После фиксација ткива у формалину, као и калуљења ткивних узорака у парафину долази до

конфигурацијских промена протеина и формирања интермолекулских веза које често маскирају антигене и тиме смањују ефекат имунохистохемијског бојења. Поступком ослобађања постиже се уклањање нежељених интермолекулских веза, чиме се обнавља примарна конфигурација антигена. Демаскирање антигена постигнуто је у микроталасној пећници (*Samsung MG23F301TAS, Seoul, South Korea*), у трајању од 20 минута, према препорукама произвођача примарних антитела, у 0,1 М цитратном пуферу (*pH 6,0*) или комерцијалним пуферским системима [*10mM EDTA Buffer for Heat-Induced Epitope Retrieval (pH 8), AP-9004-125, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA* или *Target Retrieval Solution, High pH (50x Tris/EDTA buffer, pH 9), K8014, Dako, Gloustrup, Denmark*] на температури од 96°C. Плочнице са ткивним пресецима су након тога испиране дестилованом водом, у трајању од 5 минута. Како би одстранили потенцијално неспецифично бојење и блокирали ефекат ендogene пероксидазе плочице су постављене у кивете са 3% раствором водоник-пероксида (*H₂O₂*), у трајању од 10 минута. Након испирања дестилованом водом, плочице су пласиране у кивете са фосфатним пуфером (енгл. *Phosphate-Buffered Saline, PBS*). Пошто је одрађено сушење плочица приступило се „овичавању“ ткивних пресека посебном оловком за ту намену и плочице су постављене на носач у влажној комори. Ткивни пресеци су на собној температури инкубирани са 100-200 μ l примарног антитела, у трајању од 20-60 минута, следећи препоруке произвођача за свако антитело. Примењена су следећа антитела, спремна за употребу или у одговарајућем разблажењу: *anti-NK-1 receptor antibody (1:1,000 Sigma-Aldrich)*, *anti-VEGFR1 antibody (monoclonal Y103, Abcam, 1:100)*, *anti-CD105 (clone SN6h, 1:20, DAKO M3527)*, *caspase-3 rabbit polyclonal antibody (1:1000 diluted; BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France)* *mAb ER (1D5, ready to use, IR657, DAKO, Denmark)*, *mAb PR (PgR636, ready to use, IR068, DAKO, Denmark)*, *pAb HER2 (1:1200, AO485, DAKO, Denmark)*, *Ki67 (1:200, MIB-1, IR626, DAKO, Denmark)*. За раставрање примарних антитела коришћен је 0,1 М *PBS (pH 7,6)* или комерцијални растварач (*Antibody diluent, TA-125-ADQ, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*). Приликом бојења, у разматрања су узимани раније тестирани негативни и позитивни узорци ткива на примењена антитела. После завршене инкубације, плочице су испиране у *PBS*-у, кроз три кивете, а затим је накапано секундарно антитело, дефинисано препорукама произвођача за свако примарно антитело (*UltraVision LP Large Volume Detection System: HRP Polymer (Ready-To-Use), TL-125-HL, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA* или *EnVision FLEX, High pH, k8000, Dako, Gloustrup, Denmark*). Према протоколу произвођача инкубација плочица секундарним антителом трајала је у просеку од 30-60 минута и обављена је на собној температури. Накапавањем хромогенског супстрата за детекцију пероксидазе из рена (енгл. *Horse-radish peroxidase, HRP*) омогућена је визуализација имунохистохемијске реакције. Као хромаген накапан је *DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)*, а потом су ткивни пресеци инкубирани 5-10 минута. Након испирања ткива одрађено је бојење са *Mayer*-овим хематоксилином. Слично као у горе описаним методама стандардног бојења препарата, ткивни пресеци су дехидратисани у растућим концентрацијама алкохола, затим просветљени у ксилолу и применом *Canada balsam*-а прекривени покровним стаклом.

Сва имунохистохемијска бојења одрађена су уз примену контрола, при чему су за негативне контроле имунохистохемијске реакције узимани ткивни узорци код којих је изостављена инкубација примарним антителом, а као позитивне контроле коришћени су инвазивни тумори дојке са одређеном експресијом анализираних маркера.

- **Очитавање резултата ткивне експресије испитиваних маркера**

Анализа експресије рецептора за естрогене (*ER*) и прогестерон (*PR*) утврђена је применом *Allred skora*, као збир процента позитивних једара туморских ћелија и интензитета *IHC* бојења, при чему се та вредност *Allred score* креће у опсегу од 0 до 8 (табела 1.) (156).

Табела 1. *Allred score* метод очитавања експресије маркера

% имунореактивних једара	Интезитет имунореактивног бојења
0 = нема једарног бојења	0 = нема једарног бојења
1 = >од 1% обојених једара	1 = слаб интензитет бојења једара
2 = 1-10% обојених једара	2 = умерен интензитет бојења
3 = 11-33% обојених једара	3 = веома интензивно бојење
4 = 34-66% обојених једара	
5 = 67-100% обојених једара	

Процена експресије *HER2* рецептора урађена је у складу са препорукама UK NEQAS-ICC-а. Процена се заснивала на одређивању три параметра: процента туморских ћелија чија мембрана показује имунореактивност (гранична вредност је 10%), континуираности тј. дисконтинуираности и интензитет *IHC* бојења мембране. У очитавању је узимана у обзир само експресија у инвазивном делу тумора и искључиво локализована на мембрани. На крају, на основу експресије овог маркера, карциноми су подељени у две групе: негативне (*HER2* -) и позитивне (*HER2*+), при чему су они без (0) и они са слабом (1+) експресијом сврстани у прву групу, а они са континуираном и интензивном мембранском експресијом (3+) у другу, *HER-2*+. Еквивокал *HER2* (2+) је ретестиран техником *SISH* (енгл. *silver in situ hybridization*) након чега су пацијенткиње сврставане у *HER2* позитивне или негативне инвазивне туморе (табела 2.) (157).

Табела 2. Препорука за очитавање *HER-2* експресије

<i>HER-2</i> статус	Оцена	Присутност мембранске експресије
негативан	0	Није присутна
негативан	1+	< или > од 10% ћелија, слабог интензитета, дисконтинуирано
неодређен (<i>borderline</i>)	2+	< од 10% ћелија, слабог и умереног интензитета, континуирано
позитиван	3+	> од 10% ћелија, јаког интензитета, континуирано

Експресија *Ki67* и *caspase-3* одређивана је на основу процента имунореактивних ћелија на 100 избројаних у зони највеће пролиферације тумора. На основу раније дефинисане граничне вредности *Ki67/caspase-3* експресије у нашој лабораторији, инвазивни карциноми су сврстани у 3 групе: са ниским (0-15%), умереним (16-30%) и високим пролиферативним односно апоптотским индексом (31-100%) (158, 159).

За анализу експресије *NKR* у разматрање је узето 10 репрезентативних микроскопских поља високе резолуције користећи објектив увеличања x40. Процењивано је присуство и интензитет имунореактивности, као и број ћелија које су обојене

браонкастом бојом, било да је бојење локализовано у цитоплазми или мембрани туморских ћелија. Експресија *NKR* је одређивана читавањем процентуалне мембранске/цитоплазматске експресије у туморским ћелијама КД. Анализирањем експресије *NKR* дефинисали смо *cut off* за *NKR*. На основу добијеног резултата све КД смо поделили на *NKR* позитивне ($>12,5\%$) и *NKR* негативне ($\leq 12,5\%$). Интензитет бојења процењиван је као „прихватљив“ једино ако су туморске ћелије приказивале јасно бојење локализовано унутар ћелије или на цитоплазматској мембрани и то као: негативан (0) када је у узорку проценат обојених ћелија био мањи од 12,5% од укупног броја присутних ћелија у тумору; позитиван (1) када је имунореактивност туморских ћелија у узорку била између 12,5 и 50%; веома позитиван (2) када је проценат обојених туморских ћелија у узорку био преко 50%.

Приликом читавања експресије *VEGF*-а посматрана су два параметра: интензитет бојења и проценат имунореактивних ћелија. Постоји више начина изражавања експресије *VEGF*-а, вредности могу бити изражене као негативно, слабо, средње и јако бојење, затим као квантитативни, али један од најчешће коришћених који смо у истраживању употребили је семиквантитативни метод, који комбинује интензитет и проценат имунореактивних ћелија. У овом случају експресија *VEGF*-а изражена је као блага (означена 1 са мање од 10% имунореактивних ћелија), умерена (означена 2 са 10-50% имунореактивних ћелија) и јака (означена 3 са преко 50% позитивних ћелија) (160).

Интензитет ангиогенезе одређен је квантитативним мерењем МВГ, бројањем крвних судова у зонама са њиховом највећом густином (“вруће тачке”), према препорукама Weidner-а о величини видног поља и начину бројања. За поља са најинтензивнијом неоваскуларизацијом узимани су делови инвазивног тумора са највећим бројем капилара и венула. Треба нагласити да су тумори по правилу јако хетерогени по питању МВГ, па се поља са најизраженијом неоваскуларизацијом проналазило на светлосном микроскопу на малим увећањима (40 \times и 100 \times) где су идентификована поља инвазивног карцинома са највећим бројем браон обојених мањих крвних судова. Оваква поља могу се наћи било где у карциному, али је правило да је неоваскуларизација најизраженија на рубовима карцинома. Обично у склеротично измењеним пољима унутар тумора детектовани мањи крви судови обично су аутоматски искључени из евалуације МВГ, често коришћени као унутрашња контрола имунохистохемијског бојења. Након идентификације поља са најизраженијом неоваскуларизацијом, субјективно градирано скалом од 1 до 4+, појединачни мањи крвни судови пребројавани су на увећањима 200 и 400. Било која браон бојом обојена ендотелна ћелија или њен кластер који је јасно одвојен од постојећег крвног суда, туморске ћелије и других везивних елемената строге, посматран је као мањи крвни суд који се узима у разматрање приликом пребројавања. Важно је да присуство лумена није било неопходно да би се структура прогласила мањим крвним судом, а да су црвено обојене ћелије изузимане приликом пребројавања. Сва пребројавања извршена су од стране два истраживача независно, при чему се пре пребројавања крвних судова морало сагласити о томе шта је структура за бројање (161).

3.5.4. Узорковање

Критеријуми за укључивање испитаница у студију су: патохистолошки верификована малигна болест дојке, старост ≤ 65 година, потписан информисани пристанак за учешће у истраживању.

Искључујући критеријуми за одабир испитаница су старост >65 година, жене са већ дијагностикованим психијатријским болестима, пацијенткиње са мултиплим, синхроним и метахроним туморима.

Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле:

- примарна независна узрочна варијабла је ниво депресивности код жена са карциномом дојке, одређен Цунговом скалом за самопроцену депресивности.

Зависне варијабле:

примарна зависна исходишна варијабла:

- експресија *NKR* у ћелијама карцинома дојке, испитивана имунохистохемијском анализом, а мерена семиквантитативним методом.

секундарне зависне исходишне варијабле:

- пролиферативни и апоптотски индекс одређивани имунохистохемијском анализом, мерењем експресије *Ki-67* и *caspase-3* семиквантитативним методом
- експресија *VEGF-a* и МВГ, одређиване имунохистохемијском анализом
- имунофенотип КД, одређиван имунохистохемијском анализом

Збуњујуће варијабле:

- старост испитаница, менопаузни статус
- хистоморфолошке и клиничке карактеристике КД
- варијабле везане за личну и породичну анамнезу (позитивна породична анамнеза присуство малигнитета/психијатријских поремећаја у првом степену сродства, значајан стрес у блиској прошлости, епизоде поремећаја понашања током живота, ранија употреба антидепресива и антипсихотика).

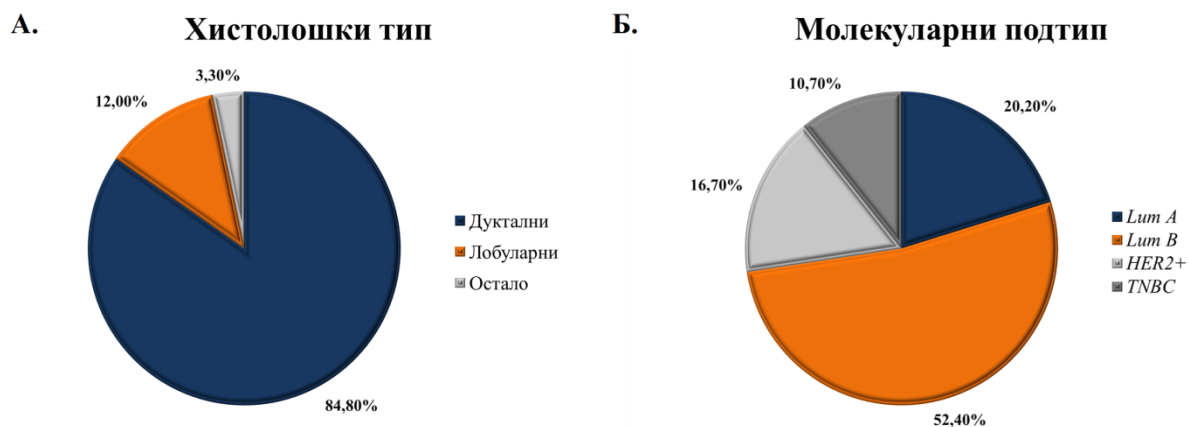
3.5.5. Статистичка обрада података

Статистичка обрада резултата извршена је помоћу комерцијалног програмског пакета *SPSS* (верзија 22.0, *SPSS Inc., Chicago, IL*). За анализу добијених резултата прво је употребљена дескриптивна статистика за опис општих карактеристика узорка: апсолутни бројеви и пропорције (фреквенције, проценти), мере централне тенденције (аритметичке средине) и мере варијабилитета (стандардна девијација). Нормалност расподеле је евалуирана *Колмогоров-Смирнов*-им тестом. За поређење средњих вредности променљиве двеју популација коришћен је независни *T* тест и *Mann-Whitney*-јев тест, а за поређење средњих вредности променљиве више популација *Анализа варијанси* и *Kruskal-Wallis*-ов тест. Испитивање зависности две описне променљиве реализована је помоћу *Hi*-квадрат теста и *Fisher*-овог теста, зависност две нумеричке променљиве помоћу *Pirson*-овог и *Spearman*-овог коефицијента корелације, док је утицај више променљивих на бинарну променљиву испитиван помоћу мултиваријантне бинарне логистичке регресије, при чему је ризик представљен као *odds ratio (OR)* са 95% интервалом поверења. Могућност да нека променљива буде маркер испитивана је помоћу *ROC* криве, при чему је, за погодно утврђен *cut-off*, за потребе утврђивања сензитивности и специфичности. Одређивањем сензитивности и специфичности теста за поједине маркере, указао је на ниво поузданости ових анализа.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Опште социодемографске и клиничко-патохистолошке карактеристике

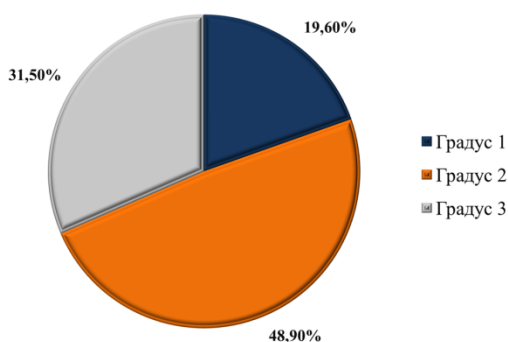
У овом истраживању учествовало је укупно 93 пацијенткиње са дијагностикованим карциномом дојке просечне старости $53,18 \pm 9,884$, при чему је најмлађа пацијенткиња имала 24 а најстарија 65 године. Од укупног броја пацијенткиња, највећи проценат су били пензионерке 44,6% (41), затим раднице 34,8% (32), док је 20,7% (19) било незапослено. Највећи број пацијенткиња је долазио из Крагујевца, односно њих 71 (78,0%). У односу на локализацију учесталост карцинома је била следећа: 45,7% (37) десна дојка и 54,3% (44) лева дојка. Учесталост карцинома у односу на хистолошки тип и молекуларни подтип представљена је на фигури 1.



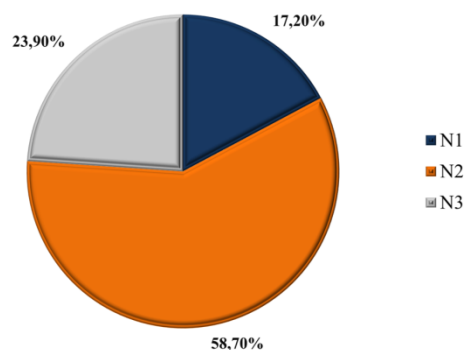
Фигура 1. Учесталост карцинома дојке (n=93) у односу на **А. хистолошки тип** (у односи на хистолошки тип сви карциноми су подељени на дуктални (n=78), лобуларни (n=11) и остало (n=3)) и **Б. молекуларни подтип** (у односи на молекуларни подтип сви карциноми су подељени на Lum A (n=17), Lum B (n=44), HER2+ (n=14) и TNBC (n=9)).

У односу на хистолошки и нуклеарни градус, расподела карцинома је приказана на фигури 2.

А. Хистолошки градус



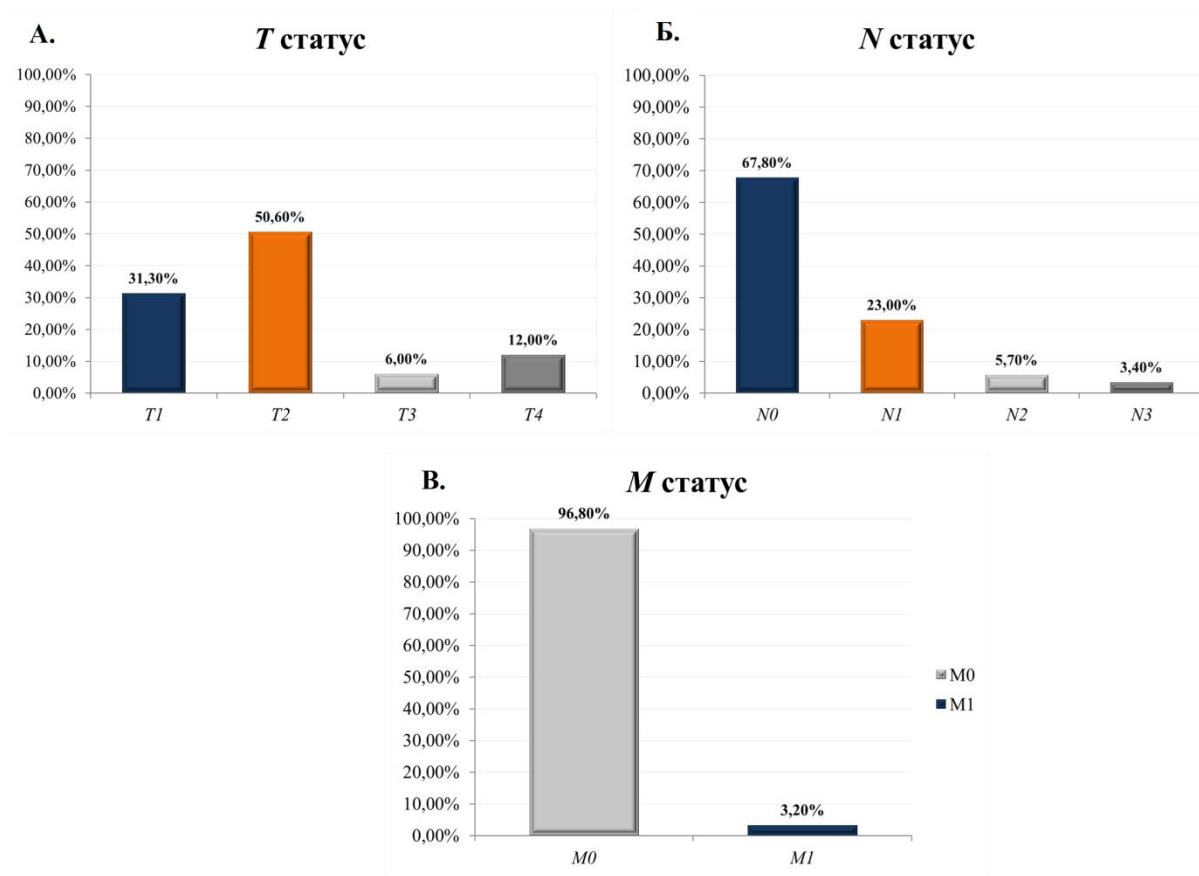
Б. Нуклеарни градус



Фигура 2. Учесталост карцинома дојке ($n=93$) у односу на **А. хистолошки градус** (у односу на хистолошки градус сви карциноми су подељени на Градус 1 ($n=18$), Градус 2 ($n=45$) и Градус 3 ($n=29$)) и **Б. нуклеарни градус** (у односу на нуклеарни градус сви карциноми су подељени на $N1$ ($n=16$), $N2$ ($n=54$) и $N3$ ($n=22$)).

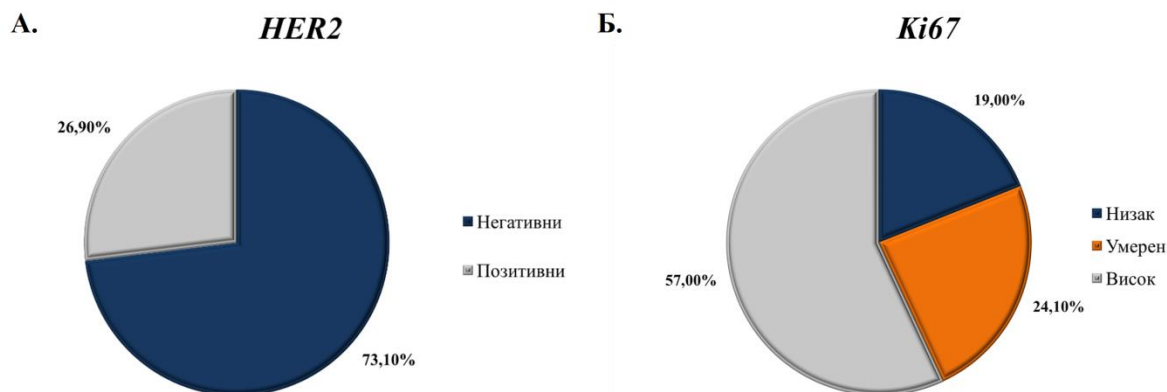
Просечно време протекло од постављања дијагнозе код пацијенткиња било је $7,18 \pm 10,956$ месеци, при чеми је минимално време од постављања дијагнозе било месец дана а максимално 45 месеци односно 3 године и 9 месеци. Просечна величина кацинома је била $25,78 \pm 13,605$ mm, најмањи карцином је био 1mm а највећи 80mm. Просечна вредност експресије *ER* износила је $5,32 \pm 3,114$ док је просечна вредност експресије *PR* износила $3,67 \pm 3,184$. Што се тиче микроваскуларне густине која је одређивана преко експресије *endoglin* (*CD105*), просечна вредност је износила $48,64 \pm 16,53$.

Када су посматране жене са карциномом укључене у ово истраживање у односу на *T*, *N* и *M* статус карцинома, добијена је расподела приказана на фигури 3.



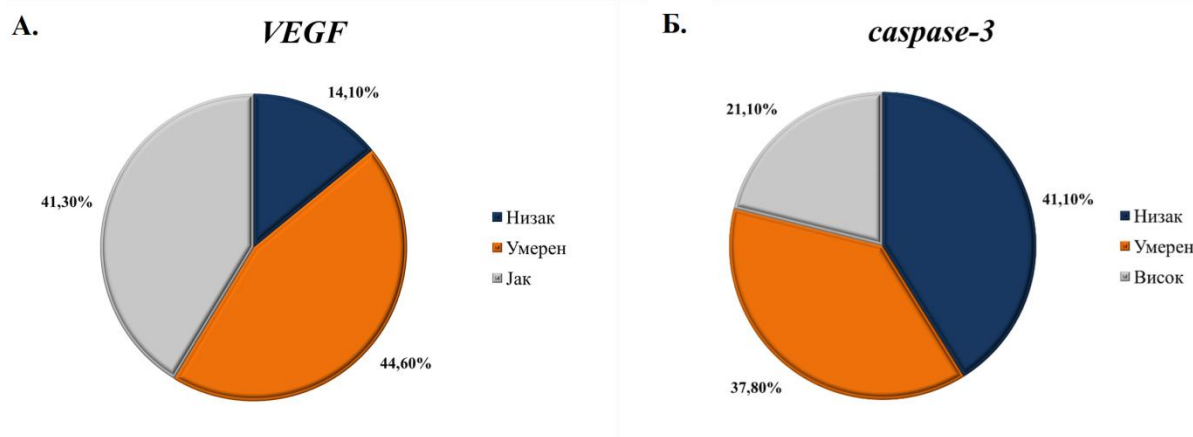
Фигура 3. Учесталост карцинома дојке (n=93) у односу на А.Т статус (у односи на T сви карциноми су подељени на T1 (n=26), T2 (n=42), T3 (n=5) и T4 (n=10)), Б. N статус (у односи на N статус сви карциноми су подељени на N0 (n=59), N1 (n=20), N2 (n=5) и N3 (n=3)), В. M статус (у односи на M статус сви карциноми су подељени на M0 (n=90) и M1 (n=3)).

Процентуална заступљеност карцинома у односу на експресију *HER2* и експресију пролиферативног индекса *Ki67* приказана је на фигури 4.



Фигура 4. Учесталост карцинома дојке (n=93) у односу на **А. експресију *HER2*** (у односи на експресију *HER2* сви карциноми су подељени на негативне (n=68) и позитивне (n=25)) и **Б. експресију *Ki67*** (у односи на експресију *Ki67* сви карциноми су подељени на низак (n=15), умерен (n=19) и висок (n=45) ниво експресије).

Што се тиче нивоа експресије *VEGF* и индекса апоптозе *caspase-3*, на фигури 5 је приказана расподела карцинома у односу на ниво експресије ова два параметра.



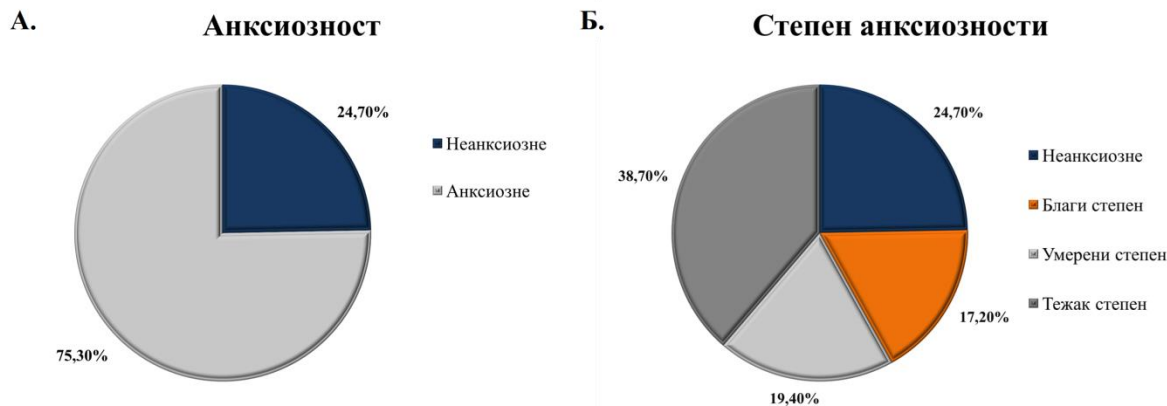
Фигура 5. Учесталост карцинома дојке (n=93) у односу на **А. експресију *VEGF*** (у односи на експресију *VEGF* сви карциноми су подељени на низак (n=13), умерен (n=41) и јак ниво експресије (n=38)) и **Б. експресију *caspase-3*** (у односи на експресију *caspase-3* сви карциноми су подељени на низак (n=37), умерен (n=34) и висок (n=19) ниво експресије).

Друге клиничко-патолошке карактеристике жена са карциномом дојке су представљене у табели 3.

Табела 3. Клиничко-патохистолошке карактеристике пацијенткиња оболелих од карцинома дојке (n=93)

Карактеристика	Број (N)	Учесталост (%)
Дезмоплазија		
Одсутна	32	34,4%
Лакостепена	8	8,6%
Умерена	30	32,3%
Изражена	23	24,7%
Мононуклеарна реакција		
Одсутна	38	40,9%
Лакостепена	28	30,1%
Умерена	20	21,5%
Изражена	7	7,5%
Перидуктална еластоза		
Одсутна	64	68,8%
Фокална	15	16,1%
Умерена	2	2,2%
Изражена	12	12,9%
Некроза		
Одсутна	70	75,3%
Лака	5	5,4%
Умерена	12	12,9%
Тешка	3	6,5%
Перинеурална инвазија		
Одсутна	62	66,7%
Присутна	31	33,3%
Лимфна инвазија		
Одсутна	50	53,8%
Присутна	43	46,2%
Васкуларна инвазија		
Одсутна	72	77,4%
Присутна	21	22,6%

На основу података добијених након попуњавања анкете за самопроцену анксиозности, 70 пацијенткиња испољавало је одређени степен анксиозности, док њих 23 нису испољавале анксиозност. Просечан степен анксиозности код пацијенткиња са карциномом дојке у овом истраживању је износио $53,23 \pm 13,760$, при чеми је минилна вредност била 29 а максимална 74. На основу присуства анксиозности све пацијенткиње су груписане на оне које имају и оне које немају анксиозност, а на основу степена анксиозности на оне које немају анксиозност, и оне са благим, умереним и тешким степеном аксиозности. Дистрибуција пацијенткиња у односу степен анксиозности је приказана на фигури 6.

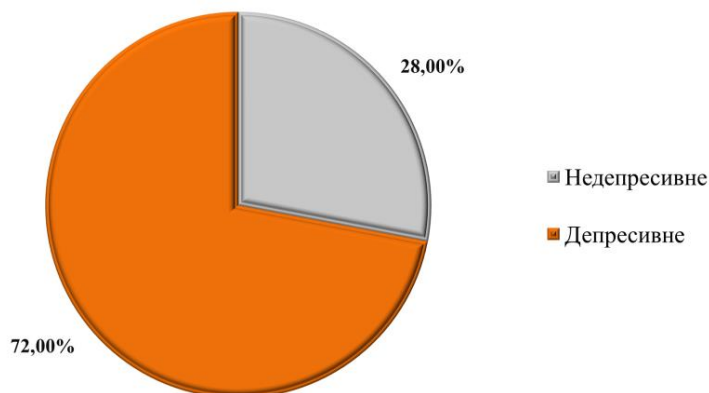


Фигура 6. Учесталост пацијенткиња са карциномом дојке (n=93) у односу на **А. присуство анксиозности** (у односи на присуство анксиозности све пацијенткиње су подељене на неанксиозне (n=23) и анксиозне (n=70)) и **Б. степен анксиозности** (у односи на степен анксиозности све пацијенткиње су подељене на неанксиозне (n=23), благи (n=16), умерени (n=18) и тежак (n=36) степен анксиозности).

4.2. Анализа пацијенткиња са карциномом дојке у односу на присуство депресивности

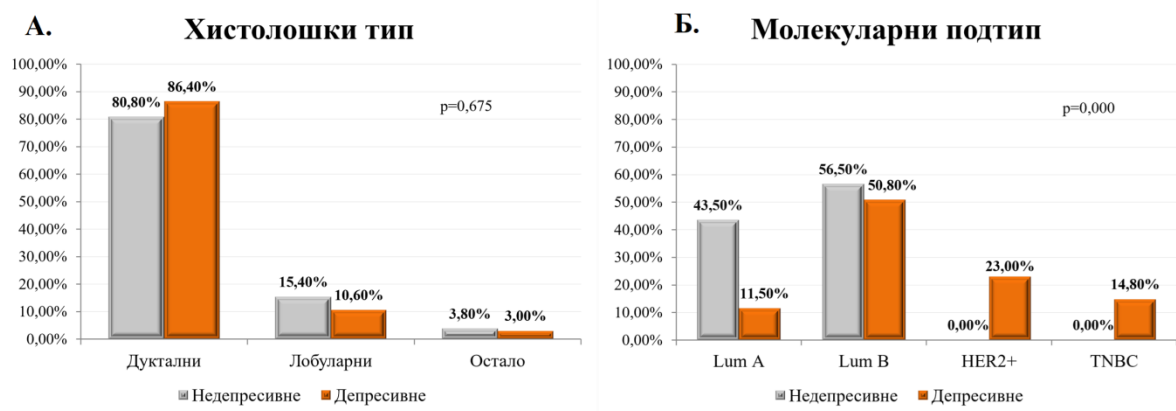
Просечан ниво депресивности код жена са карциномом дојке, одређен Цунговом скалом за самопроцену депресивности, је износио $51,49 \pm 14,446$ од максимално могућих 80 бодова. Најмања вредност на овој скали код жена укључених у ово истраживање износила је 23, а максимална 75 бодова. На основу ових вредности, све пацијенткиње су груписане на депресивне и недепресивне а њихова дистрибуција у односу на присуство депресивности је приказана на фигури 7.

Присуство депресивности



Фигура 7. Учесталост пацијенткиња са карциномом дојке (n=93) у односу на присуство депресивности (у односи на присуство депресивности све пацијенткиње су подељене на недепресивне (n=26) и депресивне (n=67)).

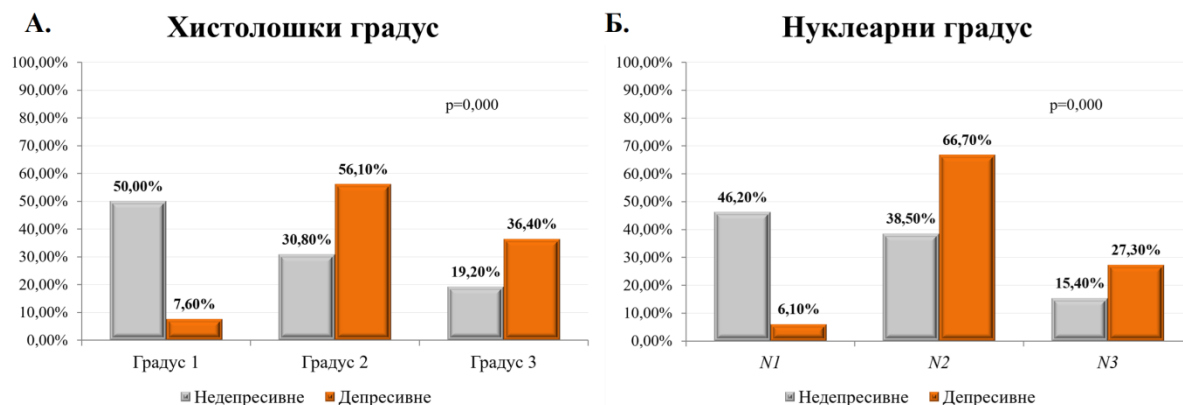
Присуство депресивности се није значајно разликовало у зависности од хистолошког типа карцинома (*Chi-square test*, $p=0,675$), док је значајна разлика у заступљености депресивности постојала у зависности од молекуларног подтипа (*Chi-square test*, $p=0,000$). Код недепресивних пацијенткиња је у највећој мери био заступљен *Lum A* и *Lum B* молекуларни подтип, док је код депресивних у одређеном проценту био заступљен и *HER2+* и *TNBC* молекуларни подтип, као што је приказано на фигури 8.



Фигура 8. Учесталост недепресивних (n=26) и депресивних (n=67) пацијенткиња са карциномом дојке у односу на **А. хистолошки тип** (није показана статистички значајна повезаност присуства депресивности и хистолошког типа, $p=0,675$) и **Б. молекуларни подтип** (показана је статистички значајна повезаност између присуства депресивности и молекуларног подтипа, $p=0,000$).

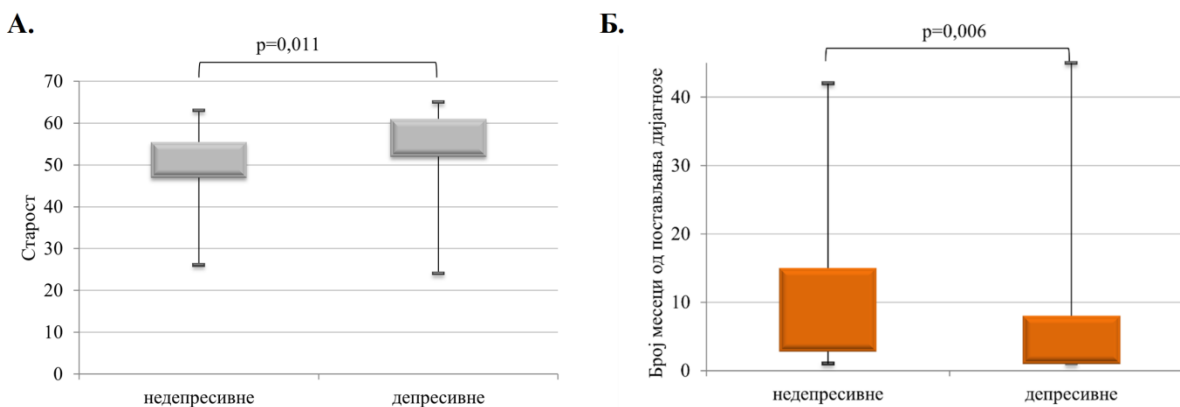
Показана је статистички значајна разлика у погледу учесталости присуства депресивности у односу на хистолошки градус (*Chi-square test*, $p=0,000$) и нуклеарни градус (*Chi-square test*, $p=0,000$) код пацијенткиња са карциномом дојке. Виши хистолошки и нуклеарни градус је био заступљен код депресивних пацијенткиња, док је код недепресивних

пацијенткиња у највећој мери био заступљен хистолошки градус 1 и N1 нуклеарни градус, као што је приказано на фигури 9.



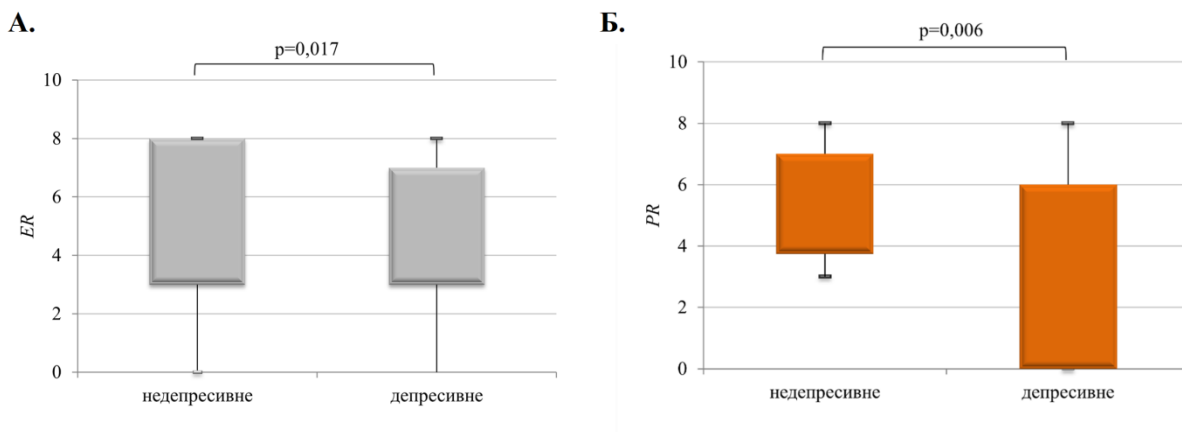
Фигура 9. Учесталост недепресивних ($n=26$) и депресивних ($n=67$) пацијенткиња са карциномом дојке у односу на **А. хистолошки градус** (показана је статистички значајна повезаност присуства депресивности и хистолошког градуса, $p=0,000$) и **Б. нуклеарног градуса** (показана је статистички значајна повезаност између присуства депресивности и нуклеарног градуса, $p=0,000$).

Показана је статистички значајна разлика у старости пацијенткиња које су биле депресивне, и оних код којих се није јавила депресивност (*Man-Whitney U test*, $p=0,011$) при чему су депресивније пацијенткиње биле старије. Такође, статистички значајна разлика је показана између депресивних и недепресивних пацијенткиња у односу на време које је протекло од момента постављања дијагнозе и попуњавање упитника, указујући да се степен депресивности битно смањује са протоком времена (*Man-Whitney U test*, $p=0,006$) (фигура 10).



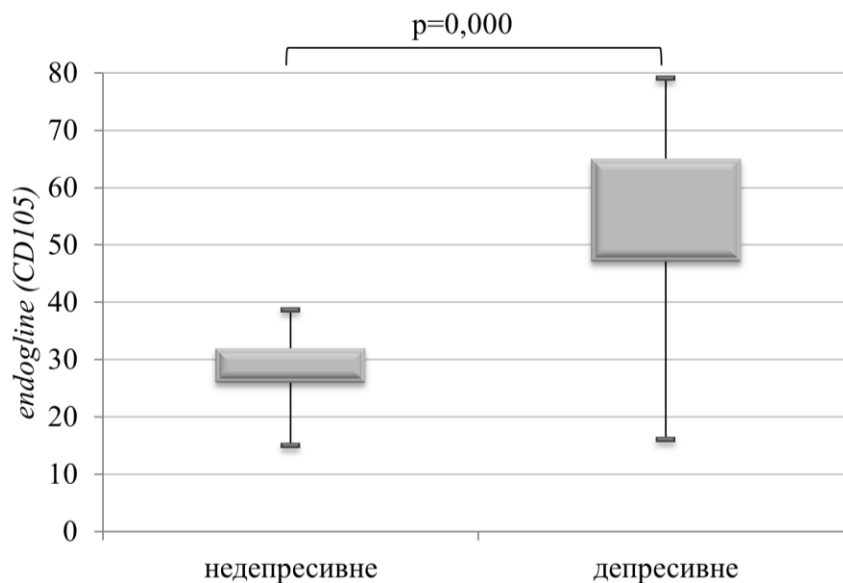
Фигура 10. Разлика између депресивних и недепресивних у односу на **А. старост** (постојала је статистички значајна разлика у старости између депресивних и недепресивних, $p=0,011$), и **Б. број месеци од постављања дијагнозе** (постојала је статистички значајна разлика у времену протеклом од момента постављања дијагнозе и попуњавања упитника између депресивних и недепресивних, $p=0,006$).

Ниво експресије *PR* (*Man-Whitney U test*, $p=0,049$) и *ER* (*Man-Whitney U test*, $p=0,006$) је био значајно већи код пацијенткиња са карциномом које су сврстане у групу недепресивних у односу на оне које су сврстане у групу депресивних пацијенткиња (фигура 11).



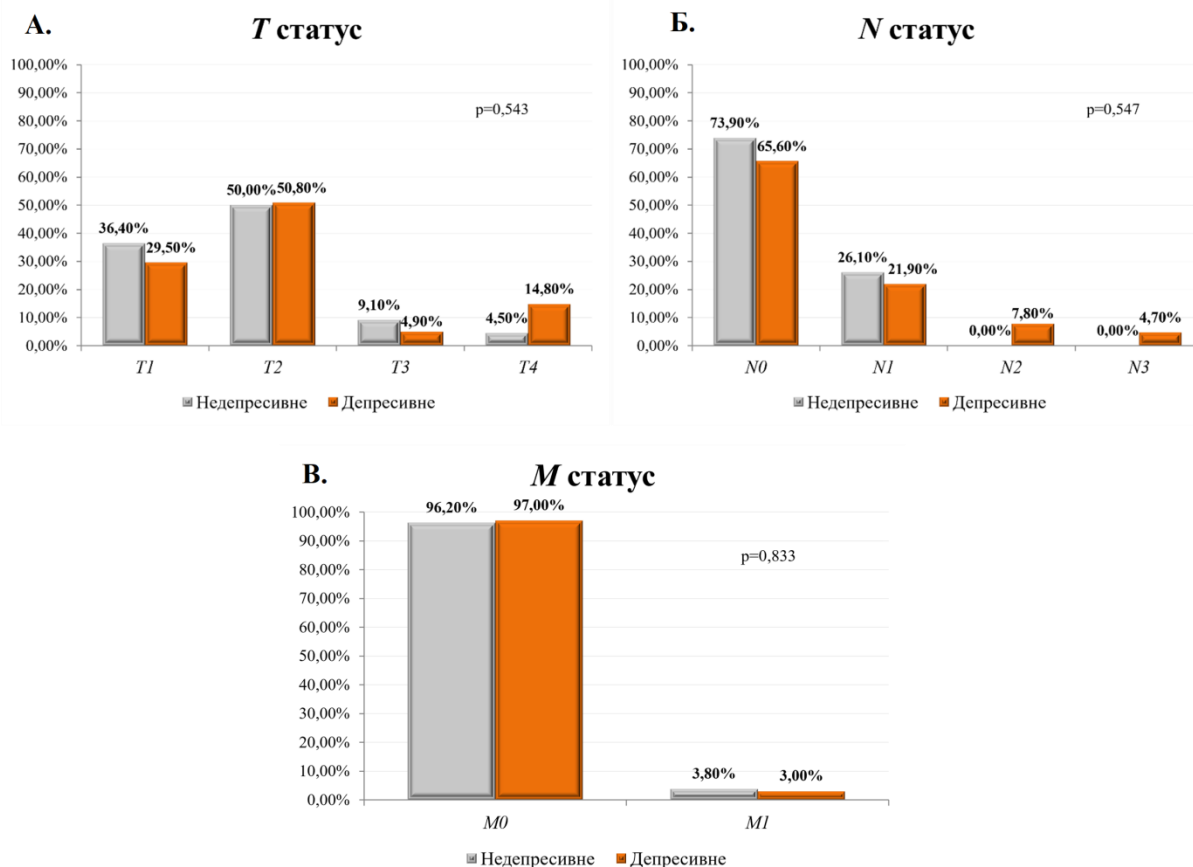
Фигура 11. Разлика између депресивних и недепресивних у односу на А. експресију *ER* (постојала је статистички значајна разлика у експресији *ER* између депресивних и недепресивних, $p=0,017$), и **Б. експресија *PR*** (постојала је статистички значајна разлика у експресији *PR* између депресивних и недепресивних, $p=0,006$).

Статистички значајно већи ниво микроваскуларне густине односно експресије *endogлина* (*CD105*) је показан код пацијенткиња које су спадале у групу депресивних у односу на недепресивне (*Man-Whitney U test*, $p=0,000$) (фигура 12).



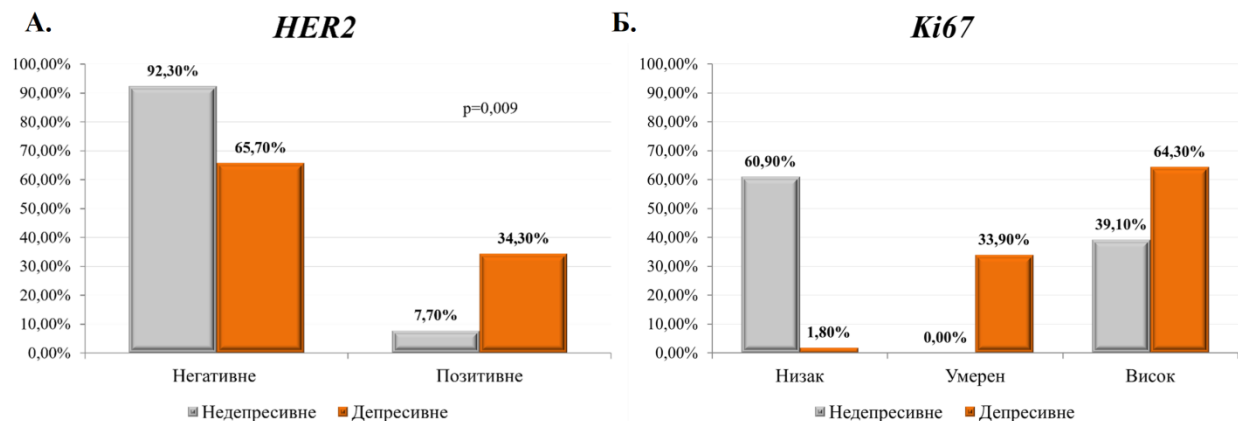
Фигура 12. Разлика између депресивних и недепресивних у односу на ниво експресије *endoglina (CD105)* (постојала је статистички значајна разлика у нивоу *endoglina (CD105)* између депресивних и недепресивних, $p=0,000$).

Није постојала статистички значајна повезаност између депресивности и *T* статуса (*Chi-square test*, $p=0,543$), *N* статуса (*Chi-square test*, $p=0,547$) и *M* статуса (*Chi-square test*, $p=0,833$) код пацијенткиња са карциномом дојке (фигура 13).



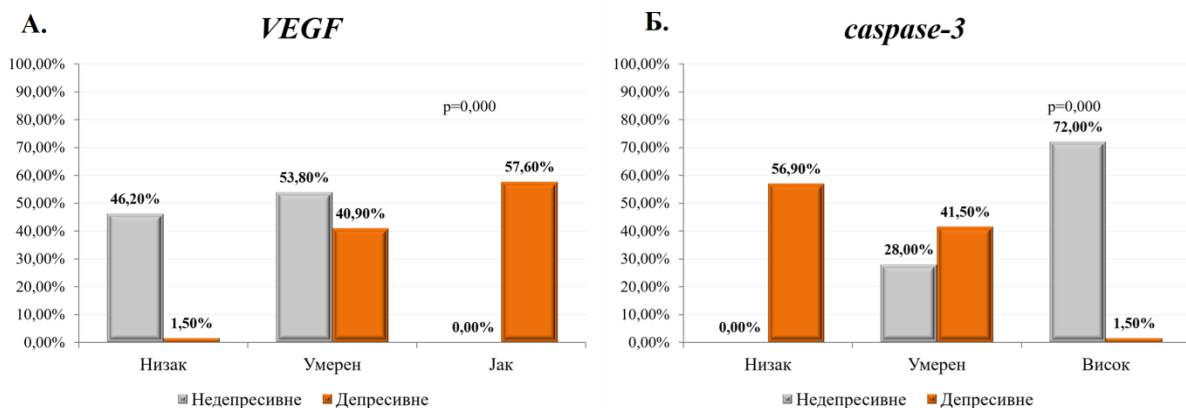
Фигура 13. Учесталост недепресивних ($n=26$) и депресивних ($n=67$) пацијенткиња са карциномом дојке у односу на **А. T статус** (није показана статистички значајна повезаност присуства депресивности и T статуса, $p=0,543$, **Б. N статус** (није показана статистички значајна повезаност између присуства депресивности и N статуса, $p=0,547$) и **В. M статус** (није показана статистички значајна повезаност између присуства депресивности и M статуса, $p=0,833$))

Показана је статистички значајна разлика у заступљености депресивних и недепресивних пацијенткиња са карциномом дојке у односу на експресију *HER2* (*Chi-square test*, $p=0,009$) и експресију пролиферативног индекса *Ki67* (*Chi-square test*, $p=0,000$). Депресивне пацијенткиње су показивале већу експресију *HER2*, као и умерен и висок ниво експресије *Ki67* (фигура 14).



Фигура 14. Учесталост недепресивних ($n=26$) и депресивних ($n=67$) пацијенткиња са карциномом дојке у односу на **А.** експресију *HER2* (показана је статистички значајна повезаност присуства депресивности и експресије *HER2*, $p=0,009$) и **Б.** експресије *Ki67* (показана је статистички значајна повезаност између присуства депресивности и експресије *Ki67*, $p=0,000$).

Такође, разлика је уочена и када је посматран ниво експресије *VEGF* (*Chi-square test*, $p=0,000$) и као и индекса апоптозе *caspase-3* (*Chi-square test*, $p=0,000$). Туморске ћелије код пацијенткиња са депресијом су чешће експримирале умерен или висок ниво *VEGF*, док су супротно томе показивале ниску или умерене експресију индекса апоптозе *caspase-3* (фигура 15).



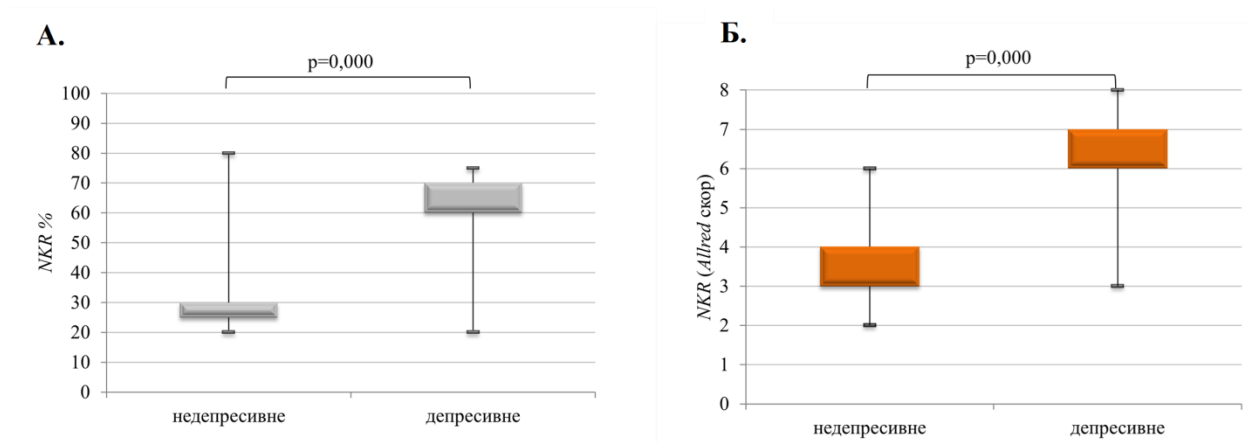
Фигура 15. Учесталост недепресивних ($n=26$) и депресивних ($n=67$) пацијенткиња са карциномом дојке у односу на **А.** експресију *VEGF* (показана је статистички значајна повезаност присуства депресивности и експресије *VEGF*, $p=0,000$) и **Б.** експресију *caspase-3* (показана је статистички значајна повезаност између присуства депресивности и експресије *caspase-3*, $p=0,000$).

Повезаност између присуства депресивности и осталих клиничко-патолошких карактеристика није постојала, што је приказано у табели 4.

Табела 4. Повезаност клиничко-патолошких карактеристика пацијенткиња оболелих од карцинома дојке и депресивности

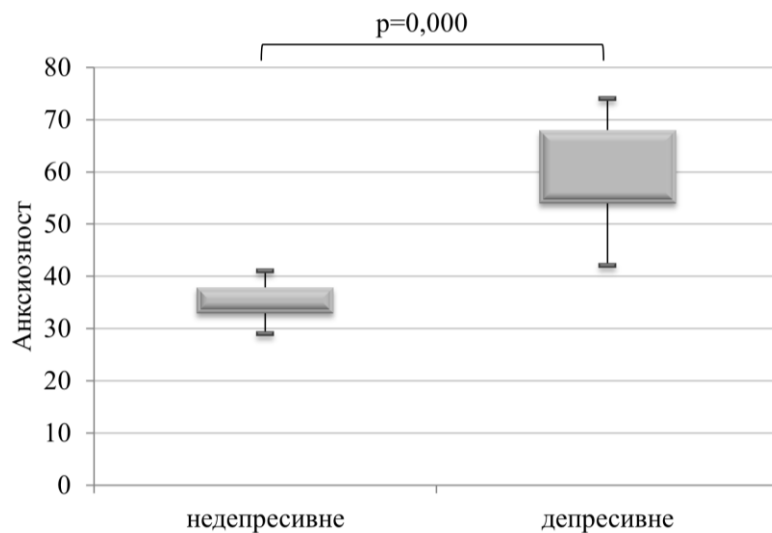
Карактеристика	Недепресивне (n=26)	Депресивне (n=67)	<i>Chi-square test /p</i>
Дезмоплазија			
Одсутна	8 (30,8%)	24 (35,8%)	5,665/0,122
Лакостепена	5 (19,2%)	3 (4,5%)	
Умерена	9 (34,6%)	21 (31,3%)	
Изражена	4 (15,4%)	19 (28,4%)	
Мононуклеарна реакција			
Одсутна	9 (34,6%)	29 (43,3%)	4,238/0,238
Лакостепена	10 (38,5%)	18 (26,9%)	
Умерена	7 (26,9%)	13 (19,4%)	
Изражена	0 (0,0%)	7 (10,4%)	
Перидуктална еластоза			
Одсутна	18 (69,2%)	46 (68,7%)	1,799/0,591
Фокална	5 (19,2%)	10 (14,9%)	
Умерена	1 (3,8%)	1 (1,5%)	
Изражена	2 (7,7%)	10 (14,9%)	
Некроза			
Одсутна	18 (69,3%)	52 (77,6%)	2,145/0,602
Лака	1 (3,8%)	4 (6,0%)	
Умерена	4 (15,4%)	8 (11,9%)	
Тешка	3 (11,5%)	3 (4,5%)	
Перинеурална инвазија			
Одсутна	19 (73,1%)	43 (64,2%)	0,328/0,567
Присутна	7 (26,9%)	24 (35,8%)	
Лимфна инвазија			
Одсутна	16 (61,5%)	34 (50,7%)	0,497/0,481
Присутна	10 (38,5%)	33 (49,3%)	
Васкуларна инвазија			
Одсутна	22 (84,6%)	50 (74,6%)	0,574/0,449
Присутна	4 (15,4%)	17 (25,4%)	

Када је испитивана експресија *NKR* код депресивних и недепресивних пацијенткиња са карциномом дојке, показано је да је значајно већа експресија овог рецептора код пацијенткиња које су спадале у групу депресивних пацијенткиња, било да је мерена експресија *NKR* као % (*Man-Whitney U test*, $p=0,000$), или када је приказана као *Allred* скор (*Man-Whitney U test*, $p=0,000$) (фигура 16).



Фигура 16. Разлика између депресивних и недепресивних у односу на **А.** ниво експресије *NKR* процентуално (постојала је статистички значајна разлика у нивоу експресије *NKR* (%) између депресивних и недепресивних, $p=0,000$), и **Б.** ниво експресије *NKR* (*Allred* скор) (постојала је статистички значајна разлика у нивоу експресије *NKR* (*Allred* скор) између депресивних и недепресивних, $p=0,000$).

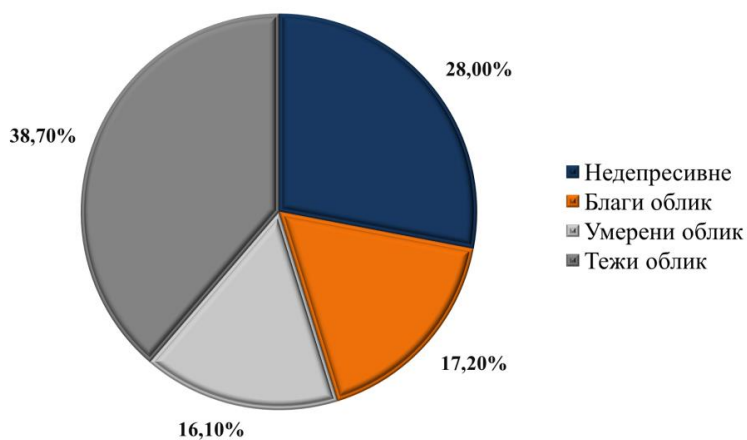
Ниво анксиозност се значајно разликовао између жена које су спадале у групу депресивних у односу на оне коју су биле недепресивне, при чему су депресивне жене имале већи ниво анксиозности (*Man-Whitney U test*, $p=0,000$), као што је приказано на фигури 17.



Фигура 17. Разлика између депресивних и недепресивних у односу на ниво анксиозности (постојала је статистички значајна разлика у нивоу анксиозности између депресивних и недепресивних, $p=0,000$).

Анализа пацијенткиња са карциномом дојке у односу на степен депресивности Све пацијенткиње су на основу нивоа депресивности који је одређен Цунговом скалом за самопроцену депресивности сврстане у следеће групе: недепресивне (до 40), благи облик (40-50), умерени облик (50-60), тежи облик (60-70) и тежак облик (70-80). У овом истраживању није било пацијенткиња са тешким обликом док је дистрибуција жена са карциномом у односу на степен депресивности приказана на фигури 18.

Степен депресивности



Фигура 18. Учесталост пацијенткиња са карциномом дојке ($n=93$) у односу на степен депресивности (у односи на степен депресивности све пацијенткиње су подељене на недепресивне ($n=26$) са благим ($n=16$), умереним ($n=15$) и тежим обликом депресивности ($n=36$)).

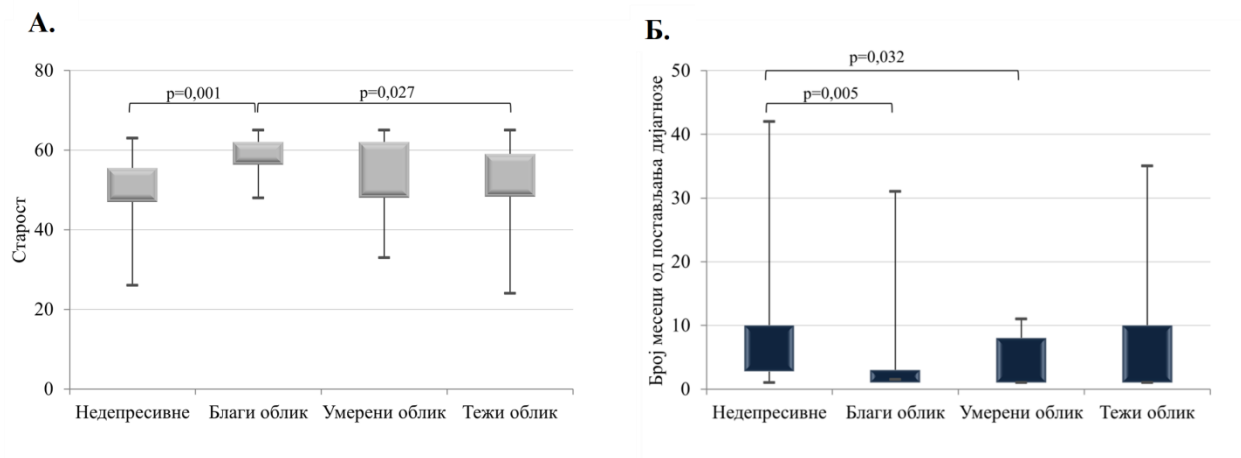
Дистрибуција клиничко-патолошких карактеристика у односу на степен депресивности је приказана у табели 5. Хистолошки тип није био значано повезан са степеном депресије код пацијенткиња са карциномом дојке (*Chi-square test, p=0,935*). Највећи проценат пацијенткиња који је спадао у групу недепресивних и са благим обликом депресивности је спадао у *Lum A* и *Lum B* молекуларни подтип, док су пацијенткиње са тежим обликом у највећем проценту спадале у *HER2+* и *TNBC* подтип, односно молекуларни подтип је био повезан са степеном депресивности (*Chi-square test, p=0,000*). Такође, хистолошки градус је био статистички значајно повезан са степеном депресивности, односно код тежих облика је био заступљенији градус 3 (*Chi-square test, p=0,000*). Статистички значајна повезаност је показана и када је анализиран нуклеарни градус (*Chi-square test, p=0,000*).

Табела 5. Повезаност хистолошког типа, молекуларног подтипа, хистолошког и нуклеарног градуса пацијенткиња оболелих од карцинома дојке и степена депресивности

Карактеристика	Недепресивне (n=26)	Благои облик (n=16)	Умерени облик (n=15)	Тежи облик (n=36)	<i>Chi-square test/p</i>
Хистолошки тип					
Дуктални	21 (80,8%)	15 (93,8%)	12 (80,0%)	30 (85,7%)	2,514/0,935
Лобуларни	4 (15,4%)	1 (6,3%)	2 (13,3%)	4 (11,4%)	
Остало	1 (3,8%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)	1 (2,9%)	
Молекуларни подтип					
<i>Lum A</i>	10 (43,5%)	7 (43,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	54,842/0,000
<i>Lum B</i>	13 (56,5%)	9 (56,2%)	12 (92,3%)	10 (31,3%)	
<i>HER2+</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (7,7%)	13 (40,6%)	
<i>TNBC</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	9 (28,1%)	
Хистолошки градус					
Градус 1	12 (46,2%)	4 (25,0%)	0 (0,0%)	1 (2,9%)	30,146/0,000
Градус 2	10 (38,5%)	10 (62,5%)	11 (73,3%)	16 (45,7%)	
Градус 3	4 (15,4%)	2 (12,5%)	4 (26,7%)	18 (51,4%)	
Нуклеарни градус					
<i>N1</i>	18 (69,3%)	13 (81,3%)	11 (73,3%)	28 (77,8%)	30,197/0,000
<i>N2</i>	1 (3,8%)	2 (12,5%)	1 (6,7%)	1 (2,8%)	
<i>N3</i>	4 (15,4%)	0 (0,0%)	2 (13,3%)	6 (16,7%)	

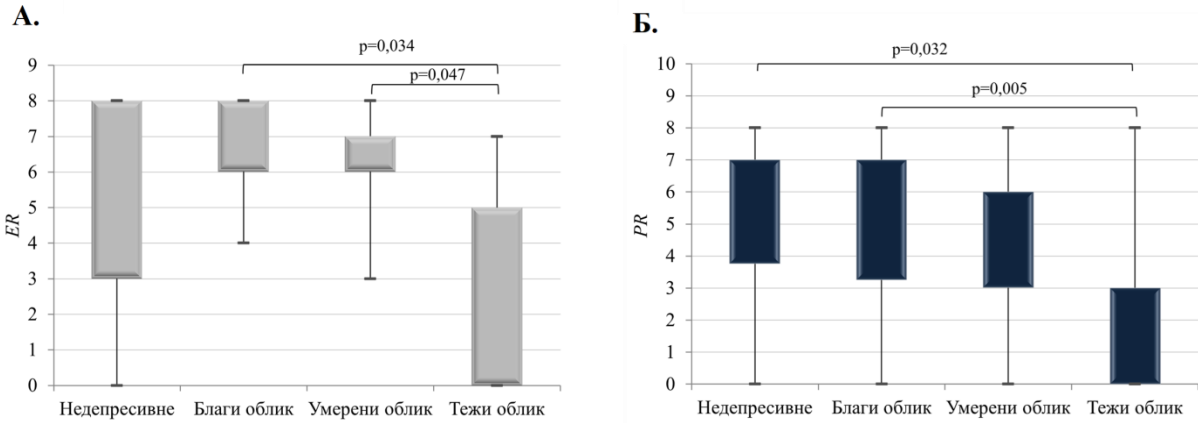
Показана је статистички значајна разлика у старости пацијенткиња у односу на степен депресивности (*Kruskal-Wallis, p=0,010*), односно, пацијенткиње са благим обликом депресије су биле старије у односу на оне које су биле недепресивне или имале тежи облик депресивности (фигура 18). Разлика је уочена и када је посматрано време протекло од постављања дијагнозе (*Kruskal-Wallis, p=0,031*), односно, разликовале су се

недепресивне пацијенткиње у односу на оне са благим или умереним обликом депресивности (фигура 19).



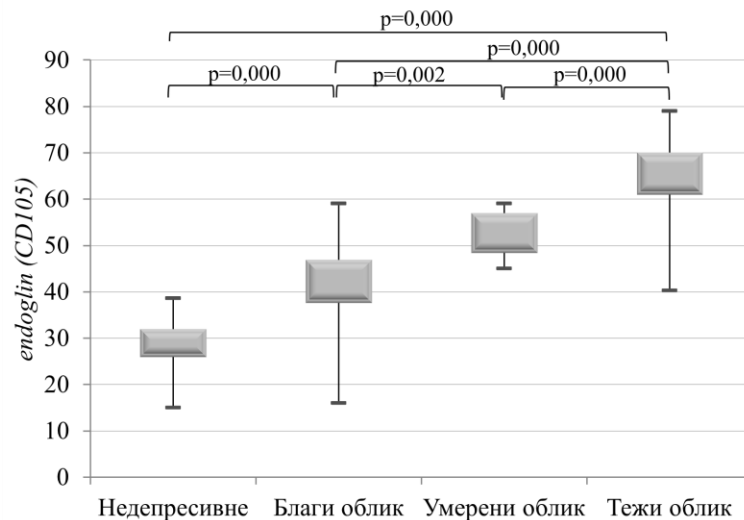
Фигура 19. Разлика између група са различитим степен депресивности у односу на А. старост (постојала је статистички значајна разлика у старости између недепресивних и благог облика депресивности ($p=0,001$), као и између благог и тежег облика депресивности ($p=0,027$), и **Б. број месеци од постављања дијагнозе** (постојала је статистички значајна разлика у броју месеци од постављања дијагнозе између недепресивних и благог облика депресивности ($p=0,005$), као и између недепресивних и умереног облика депресивности ($p=0,032$)).

Ниво експресије *ER* је био значајно нижи код пацијенткиња са тежим обликом депресивности у односу на оне које су имале благи и умерени облик депресивности (*Kruskal-Wallis*, $p=0,000$) (фигура 20). Што се тиче експресије *PR*, значајно нижи ниво експресије је показан код пацијенткиња са тежим обликом у односу на пацијенткиње које су спадале у групу недепресивних или са лакшим обликом депресивности (*Kruskal-Wallis*, $p=0,000$) (фигура 20).



Фигура 20. Разлика између група са различитим степен депресивности у односу на **А. експресију ER** (постојала је статистички значајна разлика у експресији ER између благог и тежег облика ($p=0,034$), као и између умереног и тежег облика депресивности ($p=0,047$)) и **Б. експресију PR** (постојала је статистички значајна разлика у експресији PR између недепресивних и тежег облика ($p=0,032$), као и између благог и тежег облика депресивности ($p=0,005$)).

Између свих испитиваних група у погледу нивоа микроваскуларне густине, односно експресије *endoglin* (CD105) је постојала статистички значајна разлика (*Kruskal-Wallis*, $p=0,000$) при чему се са порастом тежине депресивности повећавао и ниво експресије *endoglin* (CD105), као што је приказано на фигури 21.



Фигура 21. Разлика између група са различитим степен депресивности у односу на експресију *endoglin* (CD105) (постојала је статистички значајна разлика у експресији *endoglin* (CD105) између благог и тежег облика ($p=0,034$), као и између умереног и тежег облика депресивности ($p=0,047$)).

T статус (*Chi-square test*, $p=0,821$), *N* статус (*Chi-square test*, $p=0,785$) и *M* статус (*Chi-square test*, $p=0,710$) нису били значајно повезани са степеном депресивности код пацијенткиња са карциномом дојке. Са друге стране, пацијенткиње које су имале тежи облик депресивности су чешће биле у групи са позитивном експресијом *HER2* (*Chi-square test*, $p=0,000$), са високим нивоом експресије *Ki67* (*Chi-square test*, $p=0,000$), као и са јаком експресијом *VEGF* (*Chi-square test*, $p=0,000$), док је њихов ниво експресије индекса апоптозе *caspase-3* чешће био низак (*Chi-square test*, $p=0,000$). Дистрибуција пацијенткиња са карциномом дојке по степену депресивности у односу на *T* статус, *N* статус, *M* статус, *HER2*, *Ki67*, *VEGF*, *caspase-3* је приказана у табели б.

Табела 6. Повезаност *T* статуса, *N* статуса, *M* статуса, *HER2*, *Ki67*, *VEGF* и *caspase-3* пацијенткиња оболелих од карцинома дојке и степена депресивности

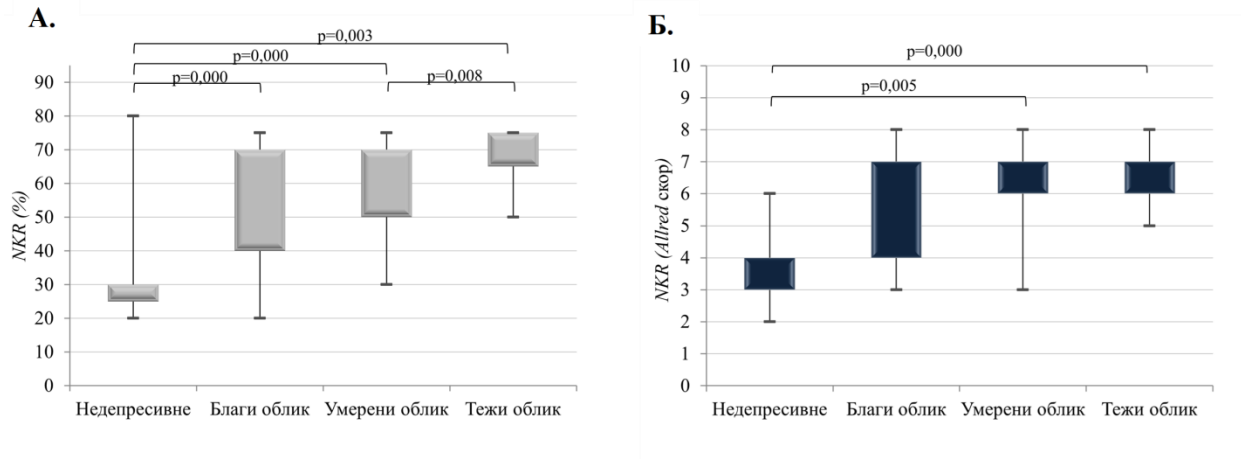
Карактеристика	Недепресивне (n=26)	Благи облик (n=16)	Умерени облик (n=15)	Тежи облик (n=36)	<i>Chi-square test/p</i>
<i>T</i> статус					
<i>T1</i>	8 (36,4%)	6 (42,9%)	5 (33,3%)	7 (21,9%)	5,429/0,821
<i>T2</i>	11 (50,0%)	7 (50,0%)	7 (46,7%)	17 (53,1%)	
<i>T3</i>	2 (9,1%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)	2 (6,3%)	
<i>T4</i>	1 (4,5%)	1 (7,1%)	2 (13,3%)	6 (18,8%)	
<i>N</i> статус					
<i>N0</i>	17 (73,9%)	10 (66,7%)	9 (60,0%)	23 (67,6%)	5,717/0,785
<i>N1</i>	6 (26,1%)	4 (26,7%)	3 (20,0%)	7 (20,6%)	
<i>N2</i>	0 (0,0%)	1 (6,7%)	2 (13,3%)	2 (5,9%)	
<i>N3</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)	2 (5,9%)	
<i>M</i> статус					
<i>M0</i>	25 (96,2%)	16 (100,0%)	15 (100,0%)	34 (94,4%)	1,236/0,710
<i>M1</i>	1 (3,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (5,6%)	
<i>HER2</i>					
Негативне	24 (92,3%)	12 (75,0%)	14 (93,3%)	18 (50,0%)	17,238/0,000
Позитивне	2 (7,7%)	4 (25,0%)	1 (6,7%)	18 (50,0%)	
<i>Ki67</i>					
Низак	14 (60,9%)	1 (6,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	52,102/0,000
Умерен	0 (0,0%)	9 (60,0%)	7 (53,8%)	3 (10,7%)	
Висок	9 (39,1%)	5 (33,2%)	6 (46,2%)	25 (89,3%)	
<i>VEGF</i>					
Низак	12 (46,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,9%)	77,377/0,000
Умерен	14 (53,8%)	14 (87,5%)	10 (66,7%)	3 (8,6%)	
Јак	0 (0,0%)	2 (12,5%)	5 (33,3%)	31 (88,6%)	
<i>caspase-3</i>					
Низак	0 (0,0%)	1 (6,3%)	2 (15,4%)	34 (94,4%)	69,087/0,000
Умерен	7 (28,0%)	14 (87,5%)	11 (84,6%)	2 (5,6%)	
Висок	18 (72,0%)	1 (6,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

Присуство дезмоплазије (*Chi-square test*, $p=0,087$), затим моноклеарна реакција (*Chi-square test*, $p=0,425$), перидуктална еластоза (*Chi-square test*, $p=0,198$), присуство некрозе (*Chi-square test*, $p=0,564$), перинеуралне инвазије (*Chi-square test*, $p=0,293$), и васкуларне инвазије (*Chi-square test*, $p=0,935$) није било повезано са степеном депресивности код пацијенткиња са карциномом дојке. Што се тиче лимфне инвазије, она је била заступљенија код пацијенткиња са умереним и тежим обликом депресивности у односу на пацијенткиње које су имале блажи облик или су биле недепресивне (*Chi-square test*, $p=0,045$). Дистрибуција пацијенткиња са карциномом дојке по степену депресивности у односу на присуство дезмоплазије, моноклеарну реакцију, перидукталну еластозу, присуство некрозе, перинеуралне, васкуларне и лимфне инвазије је приказан у табели 7.

Табела 7. Повезаност присуства дезмоплазије, мононуклеарне реакције, перидукталне еластозе, присуства некрозе, перинеуралне, васкуларне и лимфне инвазије пацијенткиња оболелих од карцинома дојке и степена депресивности

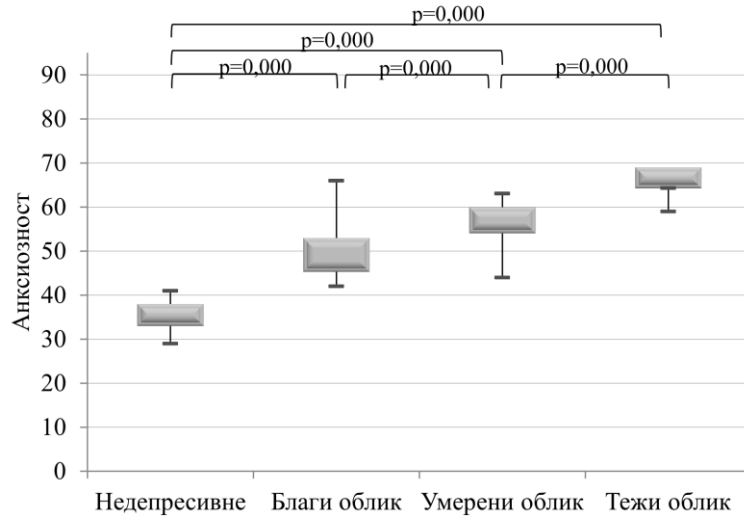
Карактеристика	Недепресивне (n=26)	Благи облик (n=16)	Умерени облик (n=15)	Тежи облик (n=36)	Chi-square test/p
Дезмоплазија					
Одсутна	8 (30,8%)	4 (25,0%)	2 (13,3%)	18 (50,0%)	14,311/0,087
Лакостепена	5 (19,2%)	1 (6,3%)	0 (0,0%)	2 (5,6%)	
Умерена	9 (34,6%)	5 (31,3%)	8 (53,3%)	8 (22,2%)	
Изражена	4 (15,4%)	6 (37,5%)	5 (33,3%)	8 (22,2%)	
Мононуклеарна реакција					
Одсутна	9 (34,6%)	7 (43,8%)	6 (40,0%)	16 (44,4%)	8,898/0,425
Лакостепена	10 (38,5%)	4 (25,0%)	6 (40,0%)	8 (22,2%)	
Умерена	7 (26,9%)	2 (12,5%)	3 (20,0%)	8 (22,2%)	
Изражена	0 (0,0%)	3 (18,8%)	0 (0,0%)	4 (11,1%)	
Перидуктална еластоза					
Одсутна	18 (69,2%)	9 (56,3%)	8 (53,3%)	29 (80,6%)	10,904/0,198
Фокална	5 (19,2%)	4 (25,0%)	2 (13,3%)	4 (11,1%)	
Умерена	1 (3,8%)	1 (6,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Изражена	2 (7,7%)	2 (12,5%)	5 (33,3%)	3 (8,3%)	
Некроза					
Одсутна	18 (69,3%)	13 (81,3%)	11 (73,3%)	28 (77,8%)	7,372/0,564
Лака	1 (3,8%)	2 (12,5%)	1 (6,7%)	1 (2,8%)	
Умерена	4 (15,4%)	0 (0,0%)	2 (13,3%)	6 (16,7%)	
Тешка	3 (11,5%)	1 (6,3%)	1 (6,7%)	1 (2,8%)	
Перинеурална инвазија					
Одсутна	19 (73,1%)	10 (62,5%)	7 (46,7%)	26 (72,2%)	3,712/0,293
Присутна	7 (26,9%)	6 (37,5%)	8 (53,3%)	10 (27,8%)	
Лимфна инвазија					
Одсутна	16 (61,5%)	12 (75,0%)	4 (26,7%)	18 (50,0%)	8,007/0,045
Присутна	10 (38,5%)	4 (25,0%)	11 (73,3%)	18 (50,0%)	
Васкуларна инвазија					
Одсутна	22 (84,6%)	11 (68,8%)	12 (80,0%)	27 (75,0%)	1,697/0,652
Присутна	4 (15,4%)	5 (31,3%)	3 (20,0%)	9 (25,0%)	

Ниво експресије *NKR*, било да је мерен као % (*Kruskal-Wallis*, $p=0,000$), или када је приказан као *Allred* скор (*Kruskal-Wallis*, $p=0,000$) је био значајно нижи код пацијенткиња које су спадале у групу недепресивних у односу на оне које су имале благи, умерени или тежи облик депресивности (фигура 22).



Фигура 22. Разлика између група са различитим степен депресивности у односу на **А.** *NKR* (%) (постојала је статистички значајна разлика у *NKR* (%) између недепресивних и благог ($p=0,000$), умереног ($p=0,000$) и тешког облика депресивности ($p=0,003$), као и између умереног и тешког облика депресивности ($p=0,008$), и **Б.** *NKR* (*Allred скор*) (постојала је статистички значајна разлика у *NKR* (*Allred скор*) између недепресивних и умереног облика депресивности ($p=0,005$), као и између недепресивних и тежег облика депресивности ($p=0,000$))

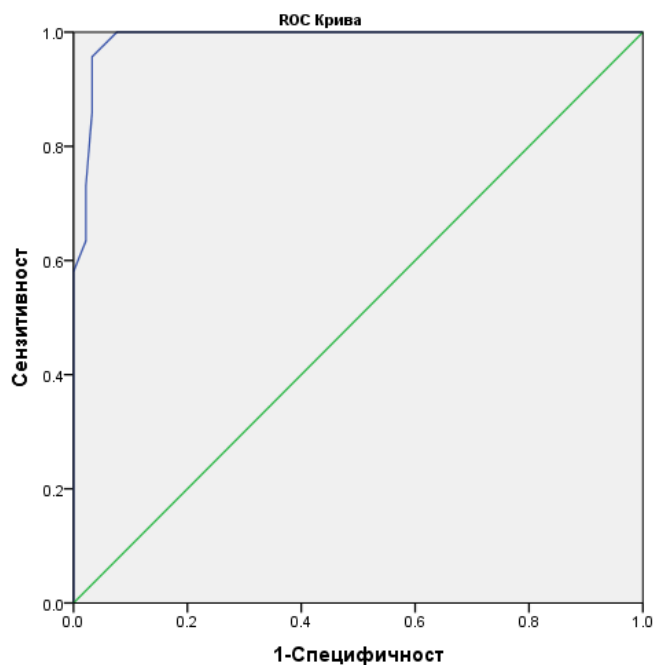
Ниво анксиозност се значајно разликовао између пацијенткиња у односу на степен депресивности (*Kruskal-Wallis*, $p=0,000$), при чему су највећи ниво анксиозности имале пацијенткиње са тешким обликом депресивности (фигура 23).



Фигура 23. Разлика између група са различитим степен депресивности у односу на ниво анксиозности (постојала је статистички значајна разлика нивоу анксиозности између недепресивних и благог ($p=0,000$), умереног ($p=0,000$) и тежег облика ($p=0,000$), као и између благог и умереног облика ($p=0,000$) и умереног и тежег облика депресивности ($p=0,000$))

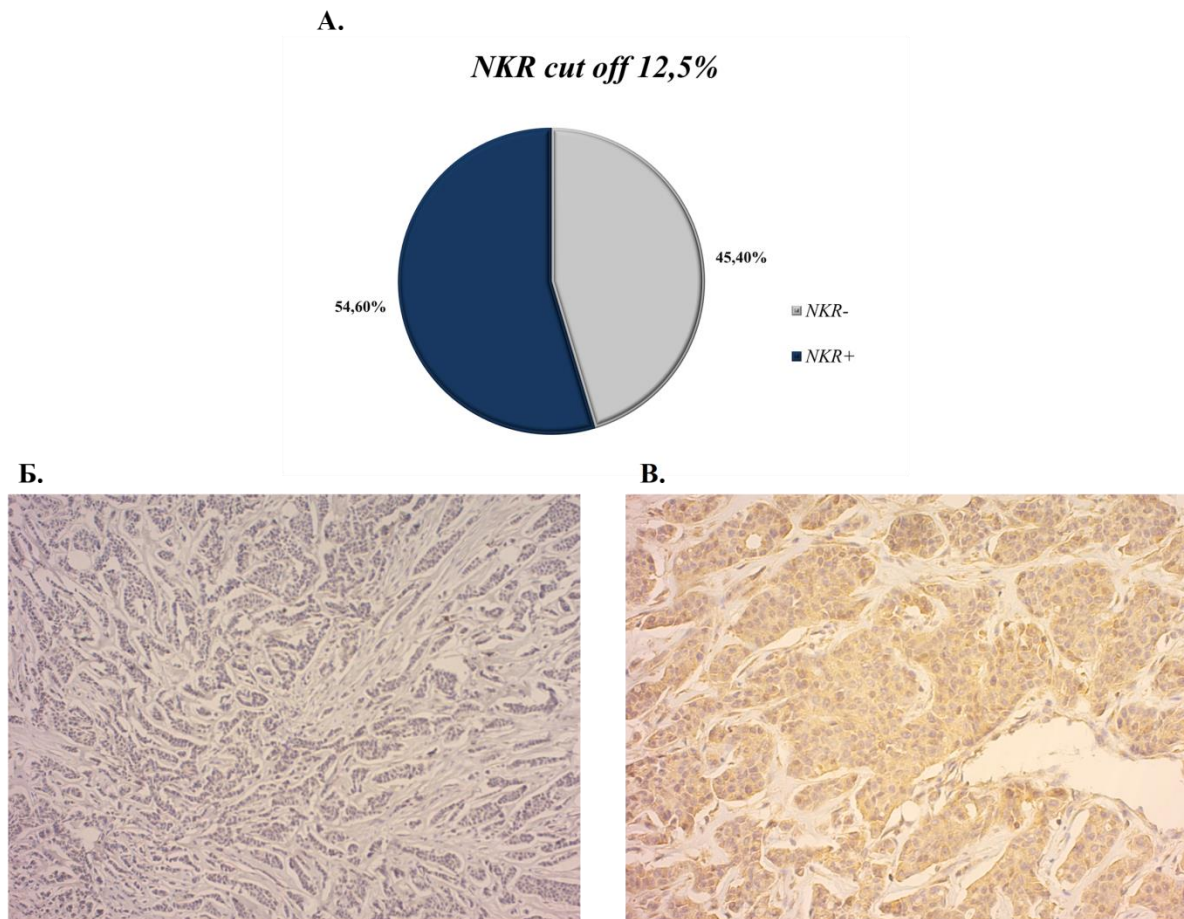
4.3 Анализа експресије *NKR* у односу на клиничко-патхистолошке карактеристике пацијенткиња са карциномом дојке

Анализирана је експресија *NKR* као маркера прогресије карцинома дојке и добијена је *ROC* крива ($AUC=0,988$, $p<0,001$) која указује да повећана експресија *NKR* може бити предиктивни маркер прогресије (фигура 24).



Фигура 24. ROC крива експресије *NKR* код пацијенткиња без и са карцинома дојке ($AUC=0,770$, $cutoff = 12,5\%$, уз сензитивност $100,0\%$ и специфичност $91,3\%$).

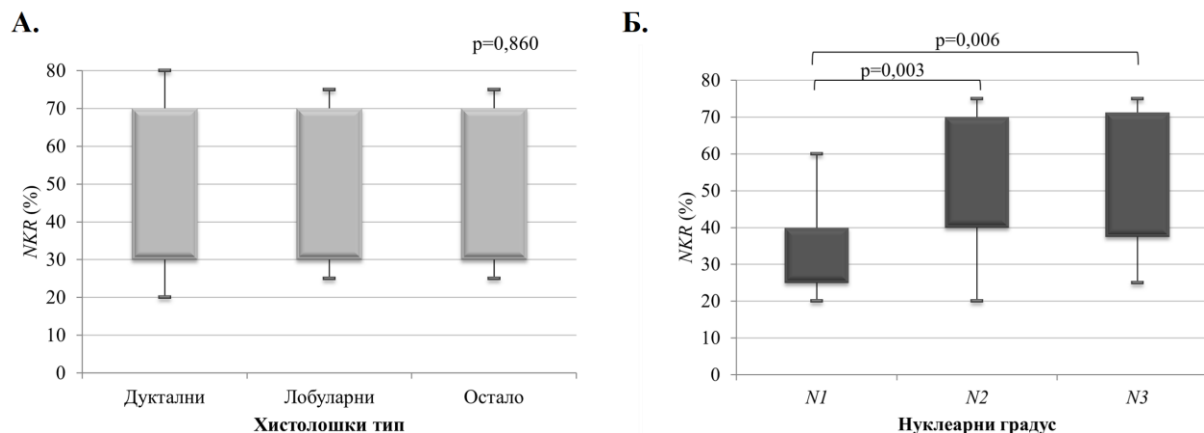
На основу ове анализе дефинисана је тачка раздвајања (*cutoff point*) експресије *NKR* и износи $12,5\%$ уз сензитивност од $100,0\%$ и специфичност од $91,3\%$. Добијеном тачком раздвајања сви карциноми дојке су подељени на групу са негативном ($\leq 12,5\%$) и позитивном ($> 12,5\%$) *NKR* експресијом.



Фигура 25. А. Учесталост *NKR+* и *NKR-* у односу на граничну вредност експресије *NKR*. Микроскопска слика експресије *NKR* у односу на граничну вредност: Б. *NKR+* и В. *NKR-* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x).

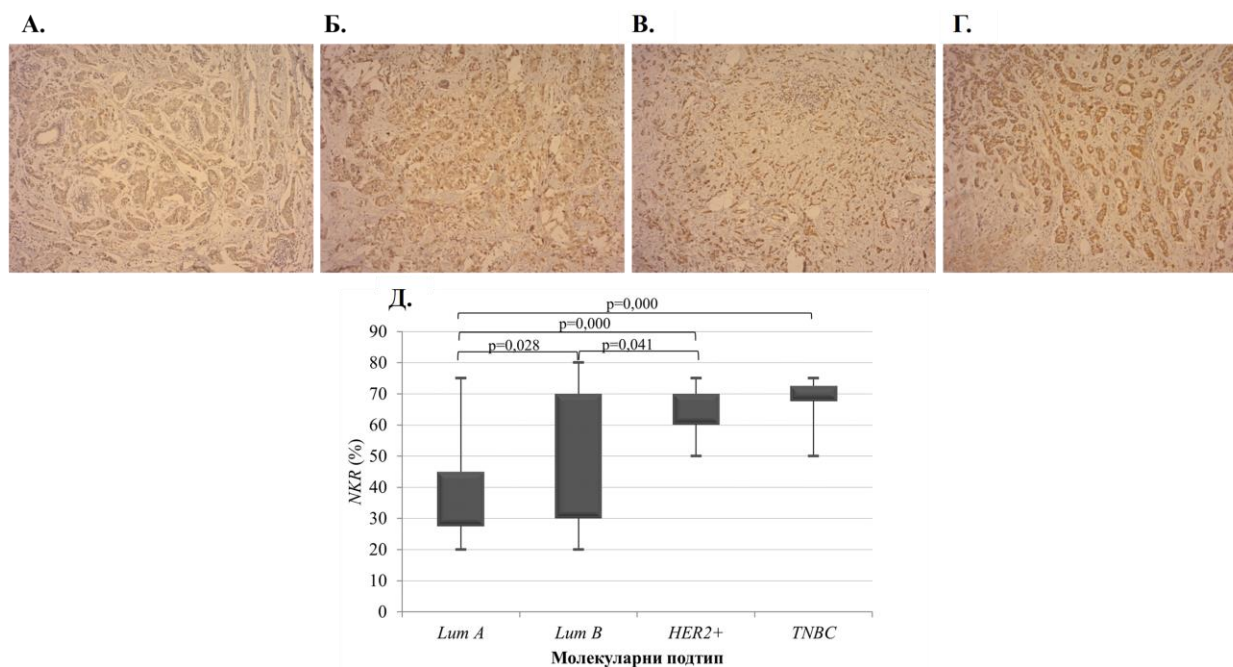
Просечна вредност експресије *NKR* код пацијенткиња са карциномом дојке је износила $53,66 \pm 19,673$, при чему је минимална експресија износила 20, а максимална 80%. Што се тиче експресије посматрано кроз *Allred* скор, просечна вредност скорa је износила $5,63 \pm 1,397$. Минималан *Allred* скор је био 3 а максималан 8 бодова.

Значајна разлика у експресији *NKR* није постојала код различитих хистолошких типова (*Kruskal-Wallis*, $p=0,860$). Насупрот томе, пацијенткиње са нуклераним градусом 1 су имале значајно нижу експресију *NKR* у односу на нуклеарни градус 2 и 3 (*Kruskal-Wallis*, $p=0,006$) (фигура 26).



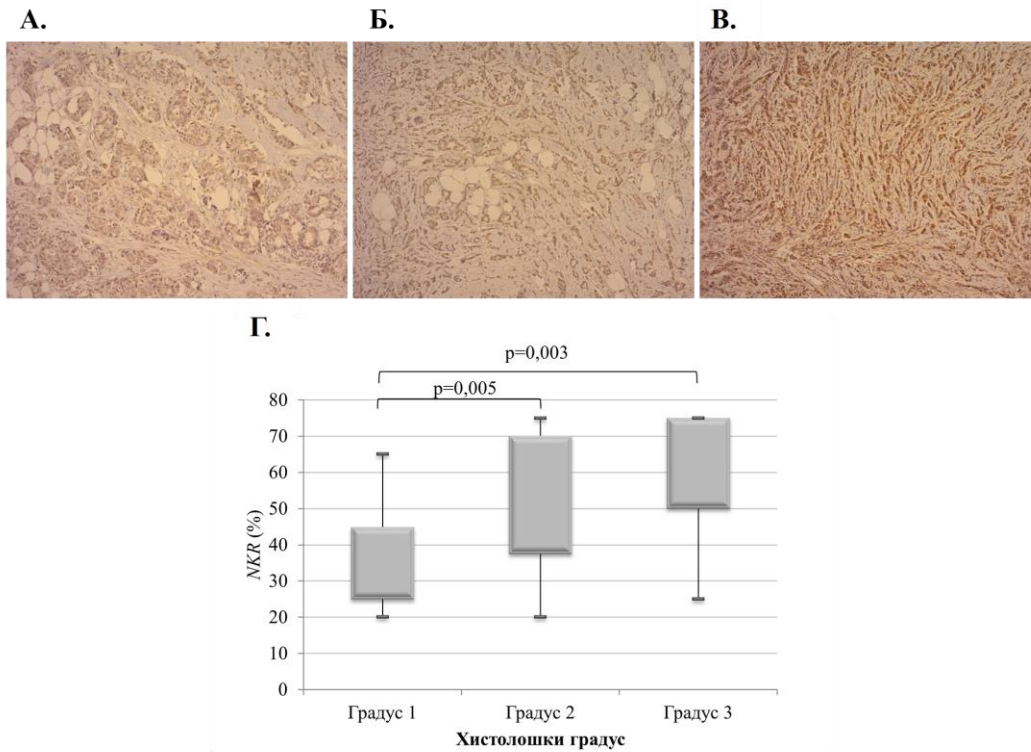
Фигура 26. Разлика у експресији *NKR* у односу на **А. хистолошки тип** (није постојала статистички значајна разлика у експресији *NKR* у односу на хистолошки тип, $p=0,860$) и **Б. нуклеарни градус** (постојала је статистички значајна разлика у експресији *NKR* код пацијената са *N1* нуклеарним градусом у односу на *N2* ($p=0,003$) и *N3* ($p=0,006$)).

У односу на молекуларни подтип, пацијенткиње које су имале *Lum A* подтип су имале значајну нижу експресију *NKR* у односу на остале молекуларне подтипове (*Kruskal-Wallis*, $p=0,000$) (фигура 27).



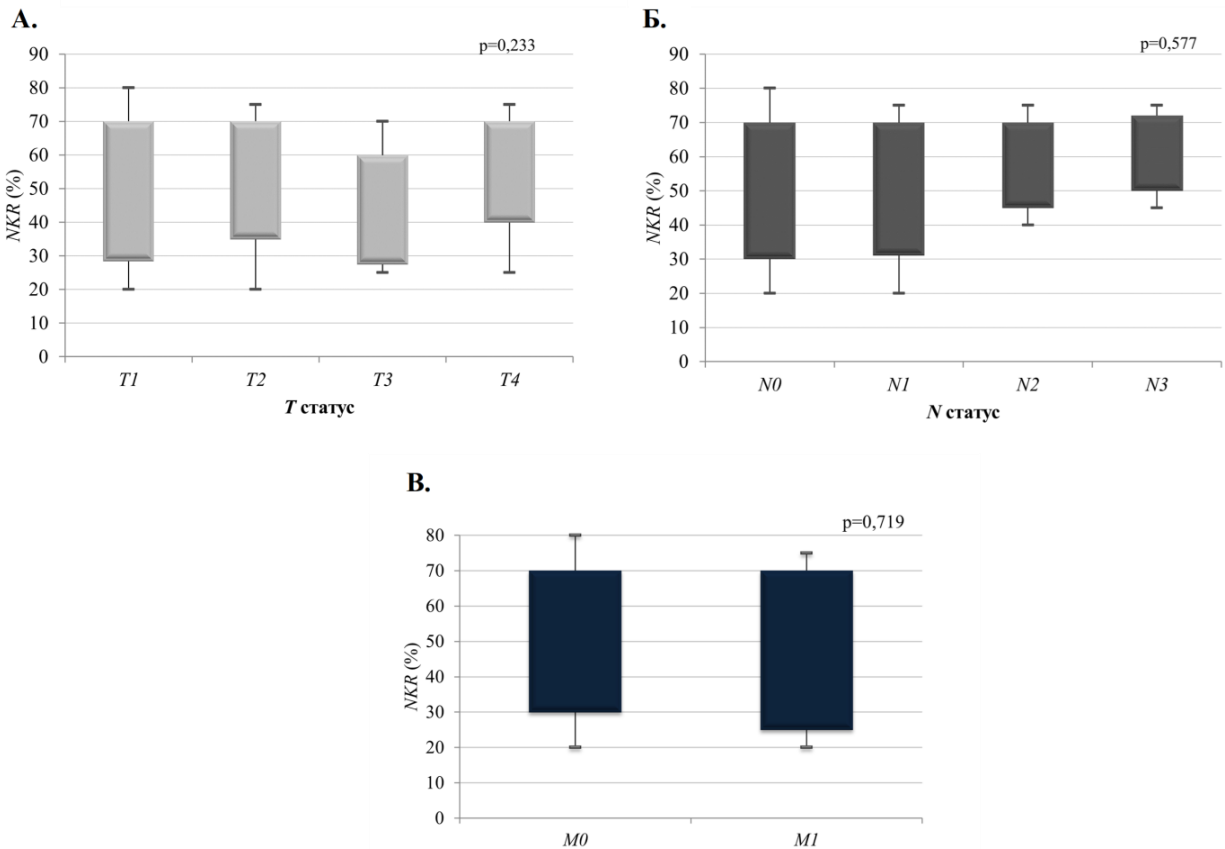
Фигура 27. Микроскопска слика експресије *NKR* у туморским ћелијама карцинома дојке код **А. *Lum A***, **Б. *Lum B***, **В. *HER2+***, **Г. *TNBC*** молекуларног подтипа (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x) **Д.** Разлика у експресији *NKR* у односу на молекуларни подтип (постојала је статистички значајна разлика у експресији *NKR* између *Lum A* групе у односу на *Lum B* ($p=0,028$), *HER2+* ($p=0,000$) и *TNBC* ($p=0,000$) молекуларни подтип).

Веће вредности експресије *NKR* су показане код хистолошког градуса 2 и 3 у односу на градус 1 (*Kruskal-Wallis*, $p=0,002$)(фигура 28).



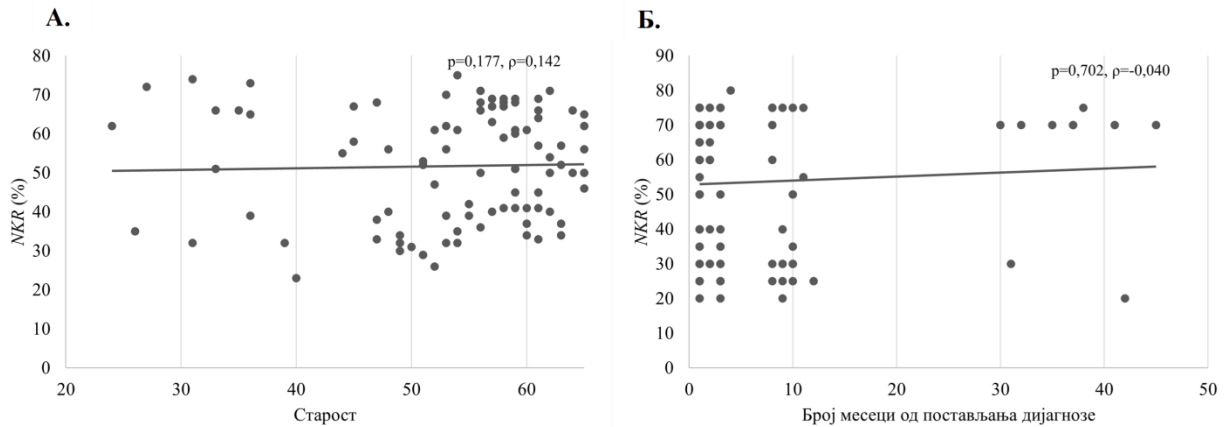
Фигура 28. Микроскопска слика експресије *NKR* у туморским ћелијама карцинома дојке код хистолошког А. градуса 1, Б. градуса 2, В. градуса 3 (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), Г. Разлика у експресији *NKR* у односу на хистолошки градус (постојала је статистички значајна разлика у експресији *NKR* код пацијената са хистолошким градусом 1 у односу на градус 2 ($p=0,005$) и градус 3 ($p=0,003$))

Није постојала статистички значајна разлика у експресији *NKR* у односу на Т статус (*Kruskal-Wallis*, $p=0,233$), N статус (*Kruskal-Wallis*, $p=0,577$) и M статус (*Kruskal-Wallis*, $p=0,719$) (фигура 30).



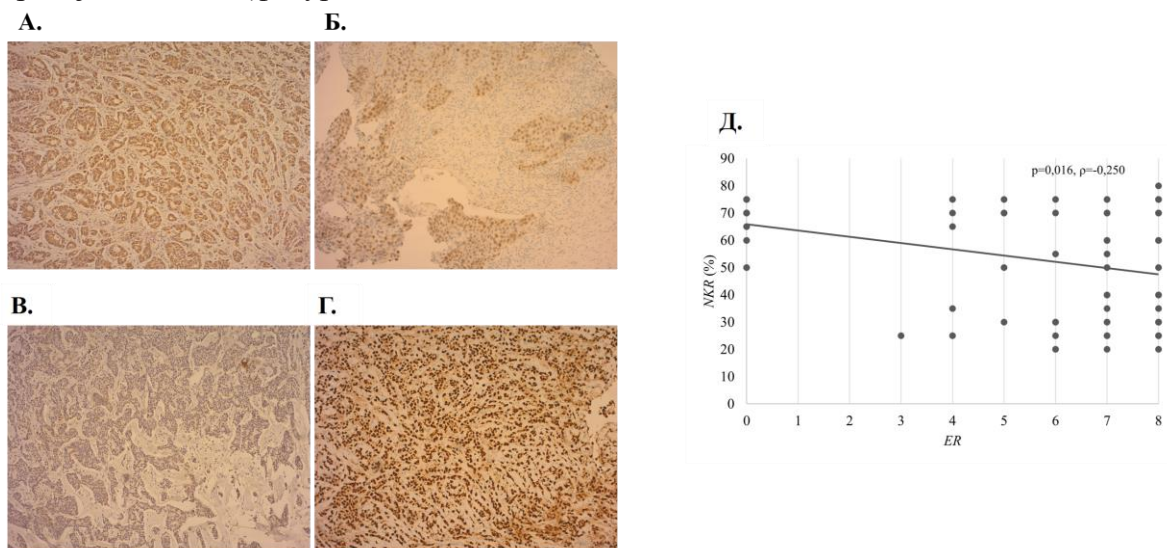
Фигура 29. Разлика у експресији *NKR* у односу на **А. T статус** (није постојала статистички значајна разлика у експресији *NKR* у зависности од *T* статуса, $p=0,233$), **Б. N статус** (није постојала статистички значајна разлика у експресији *NKR* у зависности од *N* статуса, $p=0,577$) и **В. M статус** (није постојала статистички значајна разлика у експресији *NKR* у зависности од *M* статуса, $p=0,719$)

Није постојала значајна корелација између старости пацијенткиња и експресије *NKR* ($p=0,177$, $\rho=0,142$), као ни између броја месеци протеклих од дијагнозе и експресије *NKR* ($p=0,702$, $\rho=-0,040$) (фигура 31).



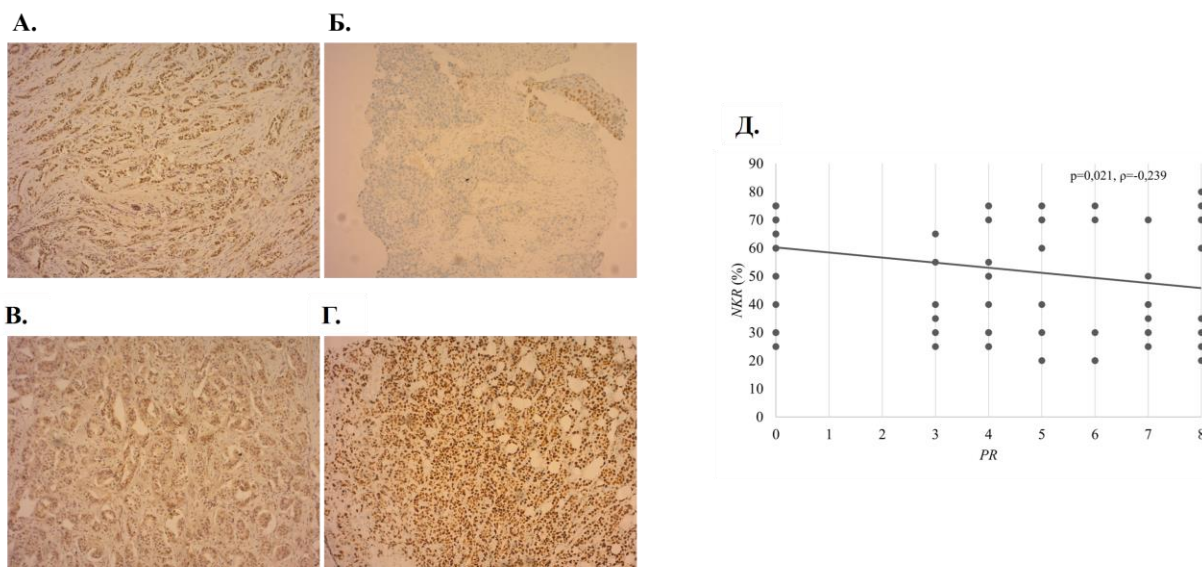
Фигура 30. Корелација између експресије *NKR* изражене у процентима и **А.** старости (није показана статистички значајна корелација између експресије *NKR* и старости, $p=0,177$) **Б.** Броја месеци протеклих од постављања дијагнозе (није показана статистички значајна корелација између експресије *NKR* и броја месеци протеклих од постављања дијагнозе, $p=0,702$).

Утврђена је значајна повезаност између експресије *NKR* и експресије *ER* ($p=0,016$, $\rho=-0,250$), код пацијенткиња са карциномом дојке, при чему са повећањем експресије *NKR* експресија *ER* опада (фигура 31).



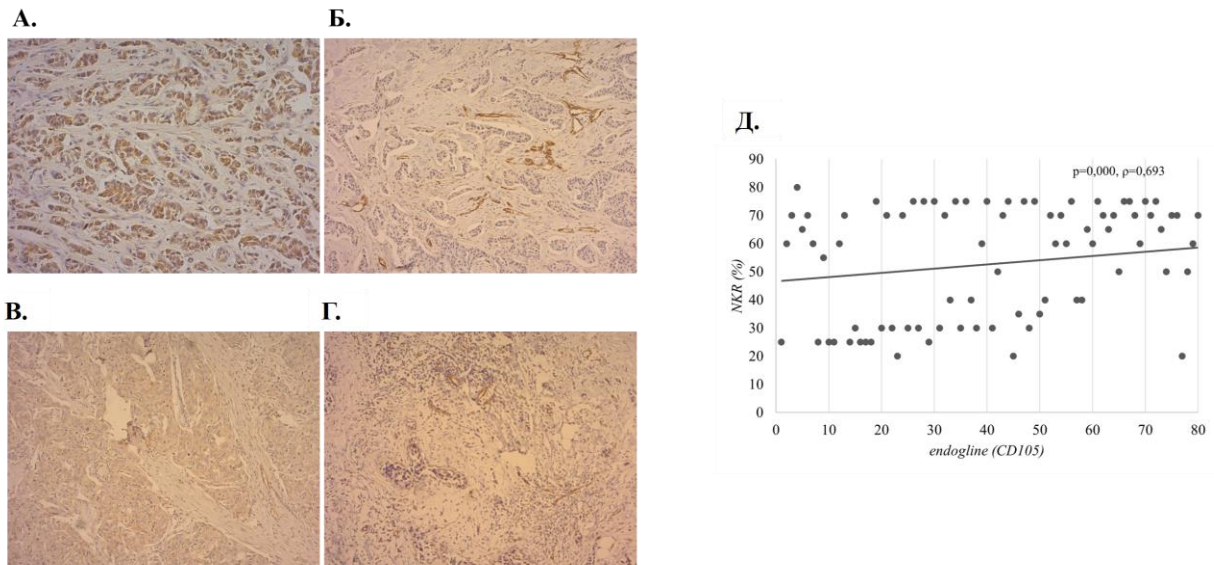
Фигура 31. Микроскопска слика експресије *NKR* у туморским ћелијама карцинома дојке (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), **А.** Висока експресија *NKR* **Б.** Микроскопска слика експресије *ER* у туморским ћелијама карцинома дојке, ниска експресија **В.** Ниска експресија *NKR* **Г.** Висока експресија *ER* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), **Д.** Корелација између експресије *NKR* изражене у процентима и експресије *ER* (показана је статистички значајна корелација између експресије *NKR* и експресије *ER*, $p=0,016$)

Значајна повезаност је утврђена и између експресије *NKR* и експресије *PR* ($p=0,021$, $\rho=-0,239$) код пацијенткиња са карциномом дојке, при чему са повећањем експресије *NKR* експресија *PR* опада (фигура 32).



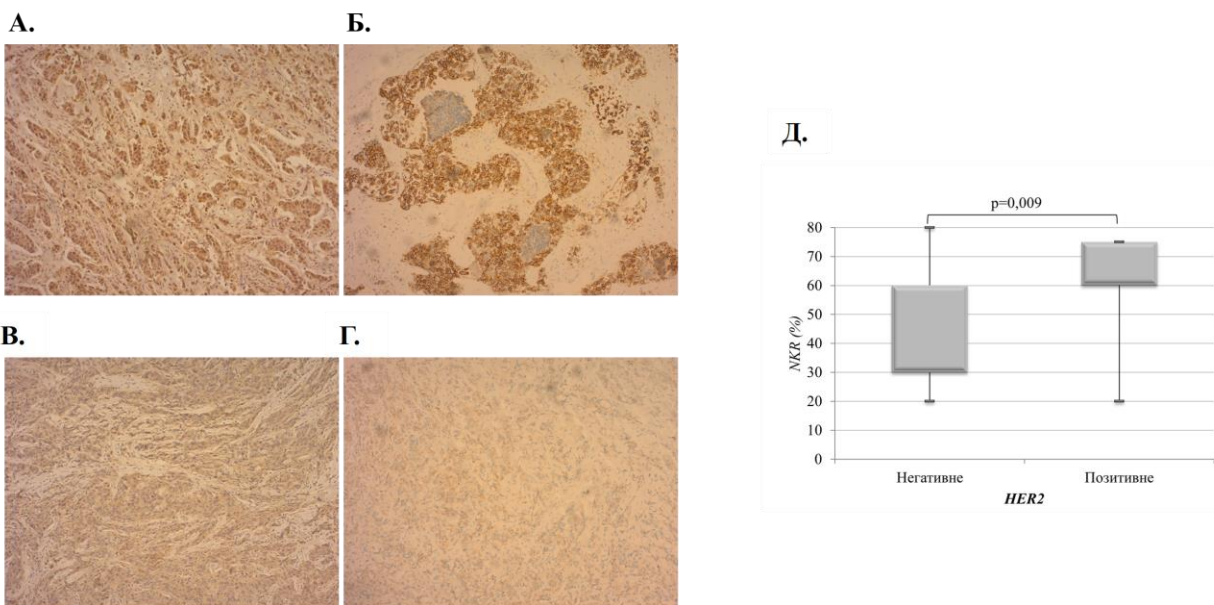
Фигура 32. Микроскопска слика експресије *NKR* у туморским ћелијама карцинома дојке (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), А. Висока експресија *NKR* Б. Микроскопска слика експресије *PR* у туморским ћелијама карцинома дојке, ниска експресија В. Ниска експресија *NKR* Г. Висока експресија *PR* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x) Д. Корелација између експресије *NKR* изражене у процентима и експресије *PR* (показана је статистички значајна корелација између експресије *NKR* и експресије *PR*, $p=0,021$).

Показана је јака позитивна корелација између експресије *NKR* и експресије *endoglin* (*CD105*) ($p=0,000$, $\rho=0,693$), односно са повећањем експресије *NKR* расте и експресија *endoglin* (*CD105*) (фигура 33).



Фигура 33. Микроскопска слика експресије *NKR* у туморским ћелијама карцинома дојке (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), **А.** Висока експресија *NKR* **Б.** Микроскопска слика експресије *CD105* у туморским ћелијама карцинома дојке, висока експресија **В.** Ниска експресија *NKR* **Г.** Ниска експресија *CD105* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x) **Д.** Корелација између експресије *NKR* изражене у процентима и *endogline (CD105)* (показана је статистички значајна корелација између експресије *NKR* и експресије *endogline (CD105)*, $p=0,000$).

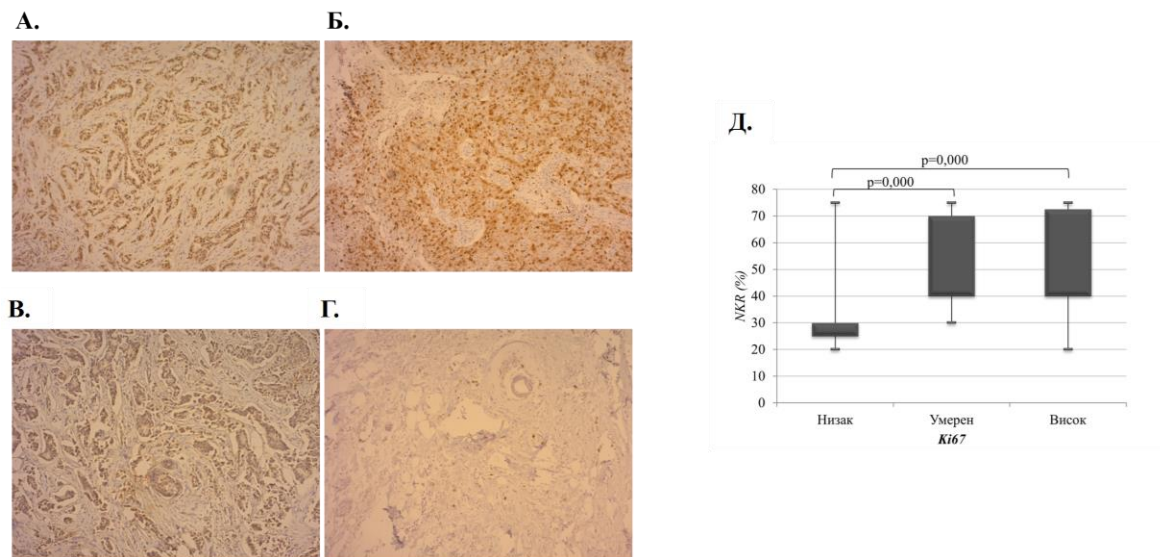
Показана је статистички значајна разлика у експресији *NKR* у односу на експресију *HER2* (*Mann-Whitney U*, $p=0,009$), односно пацијенткиње које су биле *HER2* позитивне, су имале веће вредности експресије *NKR* (фигура 34).



Фигура 34. Микроскопска слика експресије *NKR* у туморским ћелијама карцинома дојке (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), **А.** Висока експресија

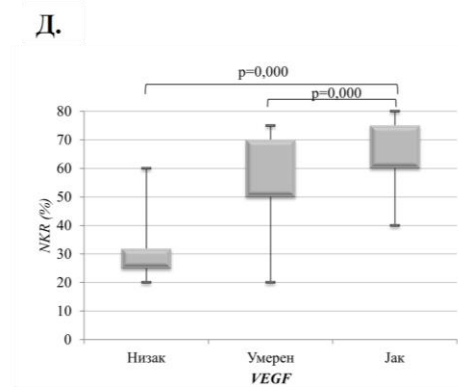
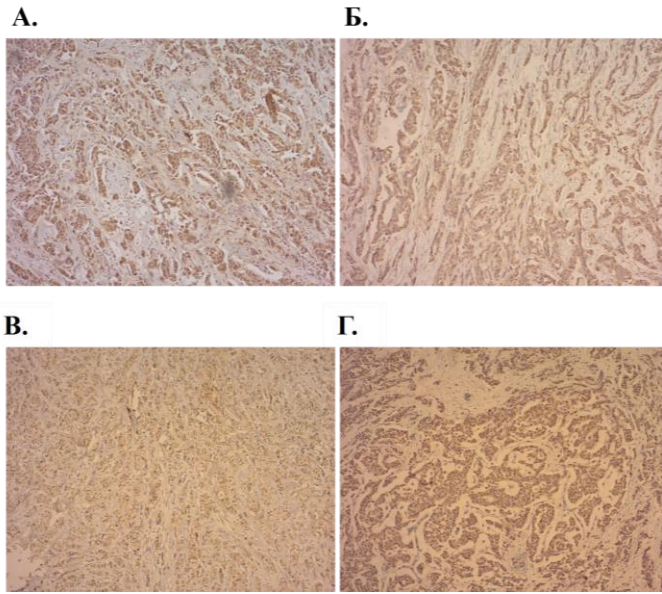
NKR Б. Микроскопска слика експресије *HER2* у туморским ћелијама карцинома дојке, висока експресија **В.** Ниска експресија *NKR* **Г.** Ниска експресија *HER2* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), **Д.** Разлика у експресији *NKR* у односу на експресију *HER2* (постојала је статистички значајна разлика у експресији *NKR* у зависности од експресије *HER2*, $p=0,009$).

Постојала је статистички значајна разлика у експресији *NKR* у односу на експресију пролиферативног индекса *Ki67* (*Kruskal-Wallis*, $p=0,000$), при чему су пацијенткиње које су имале висок ниво експресије пролиферативног индекса *Ki67*, имале и веће вредности експресије *NKR* (фигура 35).



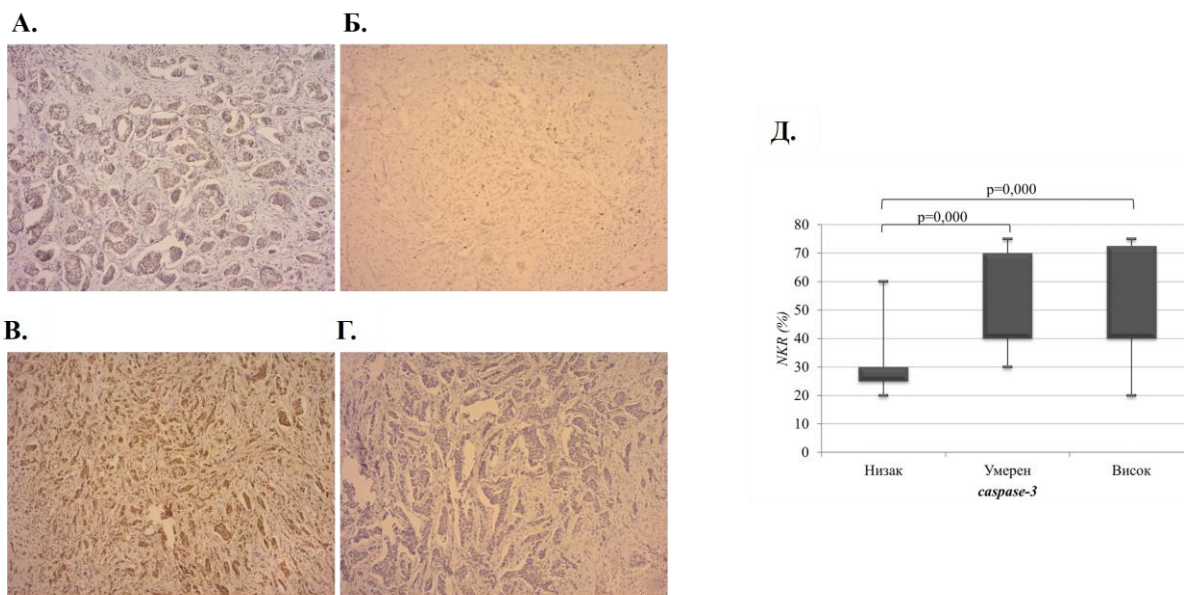
Фигура 35. Микроскопска слика експресије *NKR* у туморским ћелијама карцинома дојке (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), **А.** Висока експресија *NKR* **Б.** Микроскопска слика експресије *Ki67* у туморским ћелијама карцинома дојке, висока експресија **В.** Ниска експресија *NKR* **Г.** Ниска експресија *Ki67* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), **Д.** Разлика у експресији *NKR* у односу на експресију *Ki67* (постојала је статистички значајна разлика у експресији *NKR* између пацијената са ниском у односу на умерену ($p=0,000$) и високу експресију *Ki67* ($p=0,000$)).

Значајно веће вредности експресије *NKR* су показане код пацијенткиња са умереном или јаком експресијом *VEGF* (*Kruskal-Wallis*, $p=0,000$) (фигура 36).



Фигура 36. Микроскопска слика експресије *NKR* у туморским ћелијама карцинома дојке (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), **А.** Висока експресија *NKR* **Б.** Микроскопска слика експресије *VEGF* у туморским ћелијама карцинома дојке, висока експресија **В.** Ниска експресија *NKR* **Г.** Ниска експресија *VEGF* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), **Д.** Разлика у експресији *NKR* у односу на експресију *VEGF* (постојала је статистички значајна разлика у експресији *NKR* код пацијенткиња са ниском експресијом *VEGF* у односу на оне са умереном ($p=0,000$) и јаком експресијом ($p=0,000$),

Пацијенткиње које су имале умерен или висок ниво експресије *caspase-3* су имале значајно веће вредности експресије *NKR* (*Kruskal-Wallis*, $p=0,000$) (фигура 37).



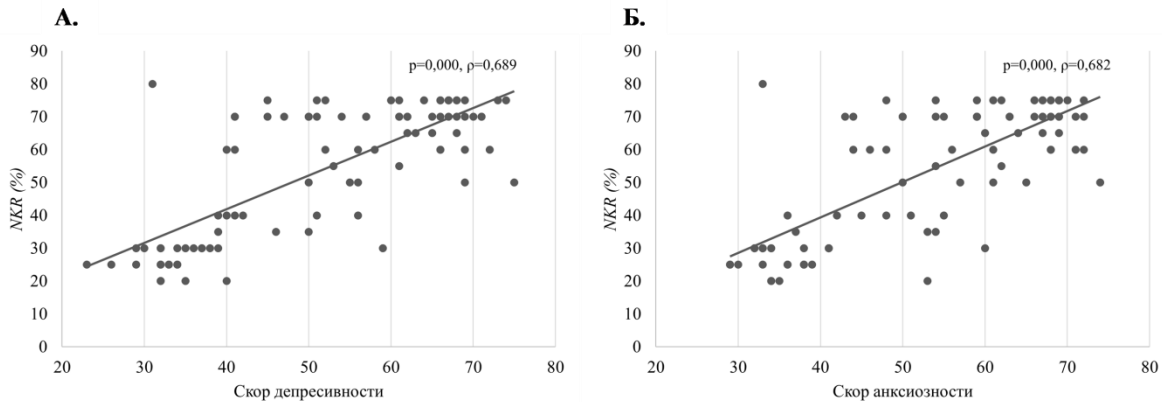
Фигура 37. Микроскопска слика експресије *NKR* у туморским ћелијама карцинома дојке (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), А. Ниска експресија *NKR* Б. Микроскопска слика експресије *Caspase-3* у туморским ћелијама карцинома дојке, висока експресија В. Висока експресија *NKR* Г. Ниска експресија *VEGF* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x), Д. експресија *caspase-3* (постојала је статистички значајна разлика у експресији *NKR* између пацијената са ниском у односу на умерену ($p=0,000$) и високу експресију *caspase-3* ($p=0,000$)).

Није показана значајна разлика у вредностима експресије *NKR* у односу на дезмоплазију, моноклеарну реакцију, перидукталну еластозу, некрозу, перинеуралну, лимфну и васкуларну инвазију код пацијенткиња са карциномом дојке (табела 8).

Табела 8. Експресија *NKR* у односу на клиничко-патолошке карактеристике пацијената

Карактеристика	Медијана (<i>IQR</i>)	Просечна вредност (стандардна девијација)	<i>Kruskal-Wallis test/p</i>
Дезмоплазија			
Одсутна	62,5 (43,0)	55,31±19,3	2,138/0,544
Лакостепена	45,0 (43,0)	46,88±22,9	
Умерена	60,0 (40,0)	51,83±20,9	
Изражена	65,0 (35,0)	56,09±17,8	
Мононуклеарна реакција			
Одсутна	60,0 (36,0)	53,95±18,5	3,373/0,338
Лакостепена	57,5 (44,0)	49,46±20,9	
Умерена	67,5 (45,0)	55,5±21,5	
Изражена	70,0 (35,0)	63,57±13,5	
Перидуктална еластоза			
Одсутна	60,0 (40,0)	53,28±19,6	0,597/0,897
Фокална	70,0 (30,0)	57,67±20,1	
Умерена	50,0 (36,0)	50,00±28,3	
Изражена	57,0 (39,0)	51,25±20,3	
Некроза			
Одсутна	67,5 (35,0)	56,29±19,6	7,250/0,064
Лака	40,0 (38,0)	43,00±19,8	
Умерена	50,0 (36,0)	50,42±17,6	
Тешка	30,0 (33,0)	38,33±17,2	
			<i>Man-Whitney U test/p</i>
Перинеурална инвазија			
Одсутна	60,0 (41,0)	53,39±20,0	932,5/0,814
Присутна	60,0 (40,0)	54,19±19,3	
Лимфна инвазија			
Одсутна	60,0 (40,0)	52,00±20,3	1008,5/0,604
Присутна	65,0 (35,0)	55,58±18,9	
Васкуларна инвазија			
Одсутна	60,0 (40,0)	53,68±19,7	736,0/0,853
Присутна	60,0 (38,0)	53,57±19,8	

Утврђено је да су експресија *NKR* и скор на скали депресивности у јакој позитивној корелацији ($p=0,000$, $\rho=0,689$), односно да са порастом експримирања овог параметра расте и скор депресивности код пацијенткиња са карциномом дојке. Такође, утврђена је и јака позитивна корелација ($p=0,000$, $\rho=-0,682$) између скорa на скали анксиозности указујући на то да са порастом експресије *NKR* расте и анксиозност код ових пацијенткиња (фигура 38).



Фигура 38. Корелација између експресије *NKR* изражене у процентима и А. скорa депресивности (показана је статистички значајна корелација између експресије *NKR* и скорa депресивности, $p=0,000$) **Б. скорa анксиозности** (показана је статистички значајна корелација између експресије *NKR* и скорa анксиозности, $p=0,000$).

4.4. Анализа експресије *NKR* у односу на клиничко-патохистолошке карактеристике код недепресивних и депресивних пацијенткиња са карциномом дојке

Просечна вредност експресије *NKR* код депресивних пацијенткиња са карциномом дојке је износила $62,99 \pm 13,256$, док је код недепресивних пацијенткиња просечна вредност *NKR* била $29,62 \pm 11,218$. Посматрано кроз *Allred* скор, просечна вредност скорa је износила $6,21 \pm 1,162$ код депресивних, а $4,15 \pm 0,675$ код недепресивних пацијенткиња са карциномом дојке.

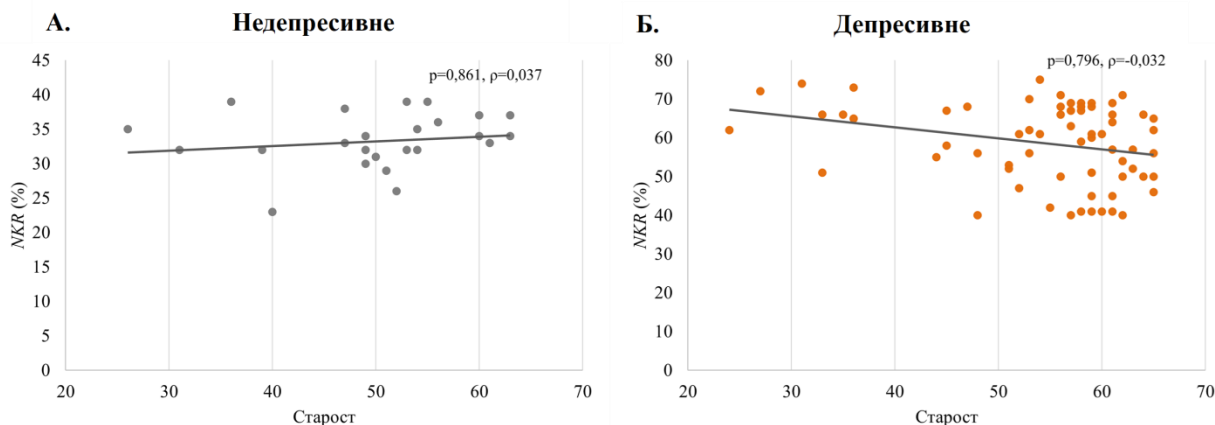
У односу на хистолошки тип, значајна разлика у експресији *NKR* није постојала када су посматране одвојено депресивне (*Kruskal-Wallis*, $p=0,159$), и недепресивне пацијенткиње са карциномом дојке (*Kruskal-Wallis*, $p=0,812$). Значајна разлика у експресији *NKR* у односу на молекуларни подтип није постојала код недепресивних пацијенткиња (*Kruskal-Wallis*, $p=0,141$), док је код депресивних уочена статистички значајна разлика, односно депресивне пацијенткиње са *Lum A* подтипом су имале значајно нижи ниво *NKR* у односу на остале подтипове (*Kruskal-Wallis*, $p=0,045$). Такође, значајно веће вредности експресије *NKR* су показане код хистолошког градуса 3 код депресивних пацијенткиња (*Kruskal-Wallis*, $p=0,050$), док код недепресивних статистички значајна разлика није показана (*Kruskal-Wallis*, $p=0,426$). Када су посматране одвојено депресивне и недепресивне пацијенткиње, није показана статистички значајна разлика код пацијенткиња у односу на нуклеарни градус, *T*, *M* и *N* статус (табела 9).

Табела 9. Експресија *NKR* у односу на клиничко-патолошке карактеристике (хистолошки тип, молекуларни подтип, хистолошки градус, нуклеарни градус, *T* статус, *N* и *M* статус) недепресивних и депресивних пацијенткиња

Карактеристика	Недепресивне		Депресивне	
	Медијана (<i>IQR</i>)	Просечна вредност (стандардна девијација)	Медијана (<i>IQR</i>)	Просечна вредност (стандардна девијација)
Хистолошки тип				
Дуктални	30,0 (5,0)	30,00±12,5	70,0 (18,0)	61,67±13,8
Лобуларни	27,5 (5,0)	27,50±2,8	70,0 (5,0)	70,71±5,3
Остало	-	-	67,0 (5,0)	67,50±10,6
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>		0,417/0,812		3,680/0,159
Молекуларни подтип				
<i>Lum A</i>	30,0 (5,0)	29,5±4,4	50,0 (30,0)	50,71±19,2
<i>Lum B</i>	25,0 (5,0)	30,0±15,4	70,0 (15,0)	62,10±14,2
<i>HER2+</i>	-	-	70,0 (15,0)	67,14±8,3
<i>TNBC</i>	-	-	70,0 (5,0)	68,33±7,5
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>		2,168/0,141		4,844/0,045
Хистолошки градус				
Градус 1	30,0 (5,0)	32,69±14,8	60,0 (23,0)	53,00±22,8
Градус 2	27,5 (10,0)	26,25±5,8	65,0 (20,0)	60,95±12,9
Градус 3	25,0 (5,0)	27,0±2,7	70,0 (10,0)	67,71±9,7
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>		1,661/0,436		5,708/0,050
Нуклеарни градус				
<i>N1</i>	30,0 (5,0)	33,33±15,3	50,0 (46,0)	48,75±23,9
<i>N2</i>	25,0 (10,0)	26,0±5,2	70,0 (15,0)	62,95±12,1
<i>N3</i>	27,5 (5,0)	27,5±2,9	70,0 (11,0)	65,56±12,2
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>		2,789/0,248		2,294/0,318
<i>T</i> статус				
<i>T1</i>	25,0 (9,0)	31,88±19,8	62,5 (20,0)	58,33±15,8
<i>T2</i>	30,0 (5,0)	29,09±5,4	70,0 (15,0)	65,97±11,4
<i>T3</i>	27,5 (5,0)	27,5±3,536	50,0 (18,0)	536,33±15,3
<i>T4</i>	-	-	65,0 (28,0)	61,11±13,9
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>		1,583/0,663		6,185/0,103
<i>N</i> статус				
<i>N0</i>	25,0 (5,0)	30,29±13,6	65,0 (21,0)	61,07±14,3

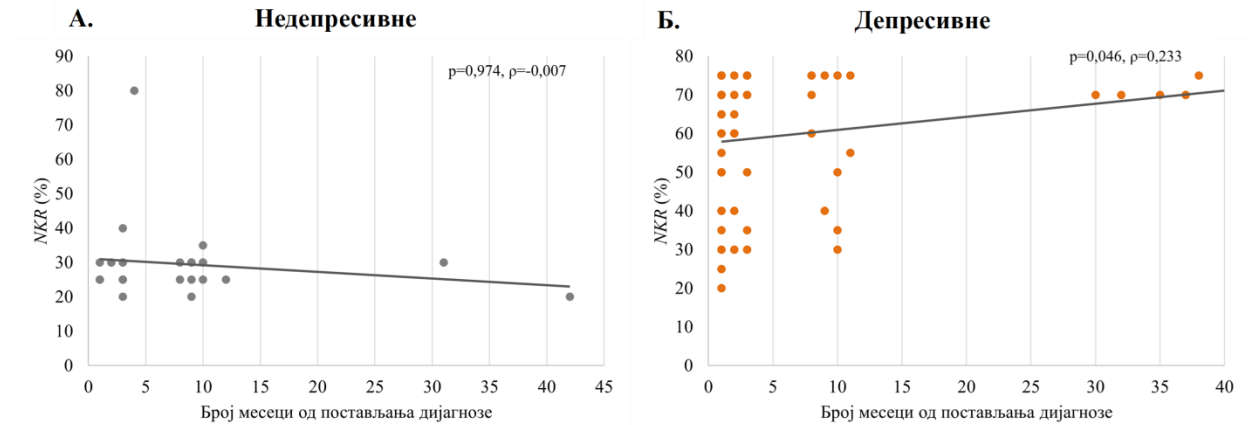
<i>N1</i>	30,0 (8,0)	28,33±5,2	70,0 (3,0)	66,43±10,5
<i>N2</i>	-	-	55,0 (25,0)	57,0±13,0
<i>N3</i>	-	-	75,0 (4,0)	73,3±2,9
Kruskal-Wallis test/p		0,231/0,631		5,873/0,118
M статус				
<i>M0</i>	30,0 (9,0)	31,50±9,2	70,0 (13,0)	62,69±13,3
<i>M1</i>	30,0 (5,0)	29,8±11,40	72,5 (5,0)	72,5±3,5
Mann-Whitney test/p	U	7,000/0,615		33,000/0,277

Није постојала значајна корелација између старости пацијенткиња и експресије *NKR* ни код недепресивних ($p=0,861$, $\rho=0,037$), као ни код депресивних ($p=0,796$, $\rho=-0,032$) пацијенткиња са карциномом дојке (фигура 39).



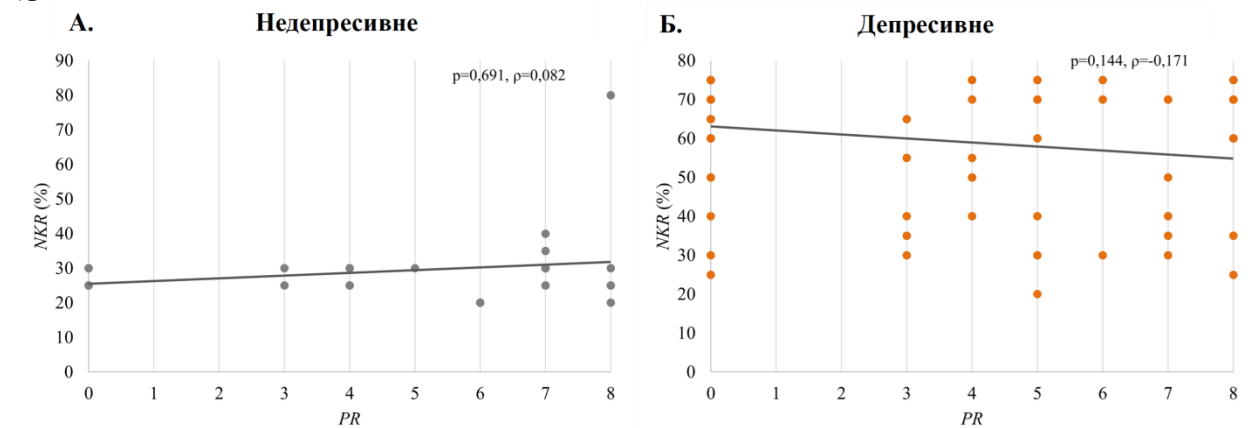
Фигура 39. Корелација између експресије *NKR* изражене у процентима и **А. старости код недепресивних пацијенткиња** (није показана статистички значајна корелација између експресије *NKR* и старости, $p=0,861$) **Б. старости код депресивних пацијенткиња** (није показана статистички значајна корелација између експресије *NKR* и старости, $p=0,796$).

Значајна корелација није показана између број месеци протеклих од дијагнозе и експресије *NKR* код недепресивних ($p=0,974$, $\rho=-0,007$) пацијенткиња са карциномом дојке. Са друге стране, показана је слаба позитивна корелација између броја месеци протеклих од дијагнозе и експресије *NKR* код депресивних пацијенткиња ($p=0,046$, $\rho=0,233$) (фигура 40).



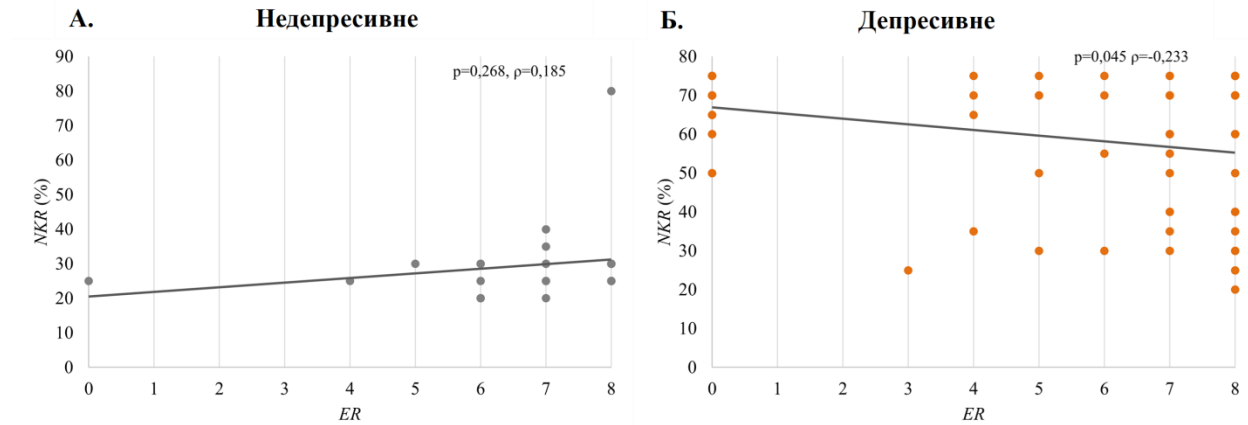
Фигура 40. Корелација између експресије *NKR* изражене у процентима и **А. броја месеци од постављања дијагнозе код недепресивних пацијенткиња** (није показана статистички значајна корелација између експресије *NKR* и броја месеци од постављања дијагнозе, $p=0,974$) **Б. броја месеци од постављања дијагнозе код депресивних пацијенткиња** (показана је статистички значајна корелација између експресије *NKR* и броја месеци од постављања дијагнозе, $p=0,046$).

Када су посматране одвојено недепресивне ($p=0,691, \rho=0,082$) и депресивне ($p=0,144, \rho=-0,171$) пацијенткиње, није показана статистички значајна корелација са експресијом *PR* (фигура 41).



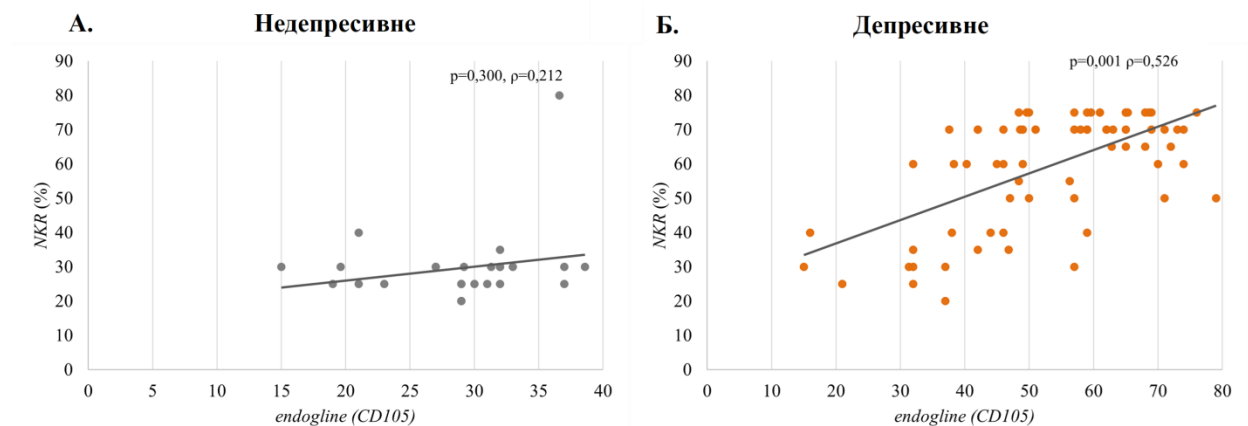
Фигура 41. Корелација између експресије *NKR* изражене у процентима и **А. експресије *PR* код недепресивних пацијенткиња** (није показана статистички значајна корелација између експресије *NKR* и експресије *PR*, $p=0,691$) **Б. експресије *PR* код депресивних пацијенткиња** (показана је статистички значајна корелација између експресије *NKR* и експресије *PR*, $p=0,144$).

Експресија *ER* није била у корелацији са експресијом *NKR* код недепресивних пацијенткиња ($p=0,282, \rho=0,185$), док је код депресивних постојала слаба негативна корелација ($p=0,045, \rho=-0,233$), односно са повећањем експресије *NKR* експресија *ER* опада (фигура 42).



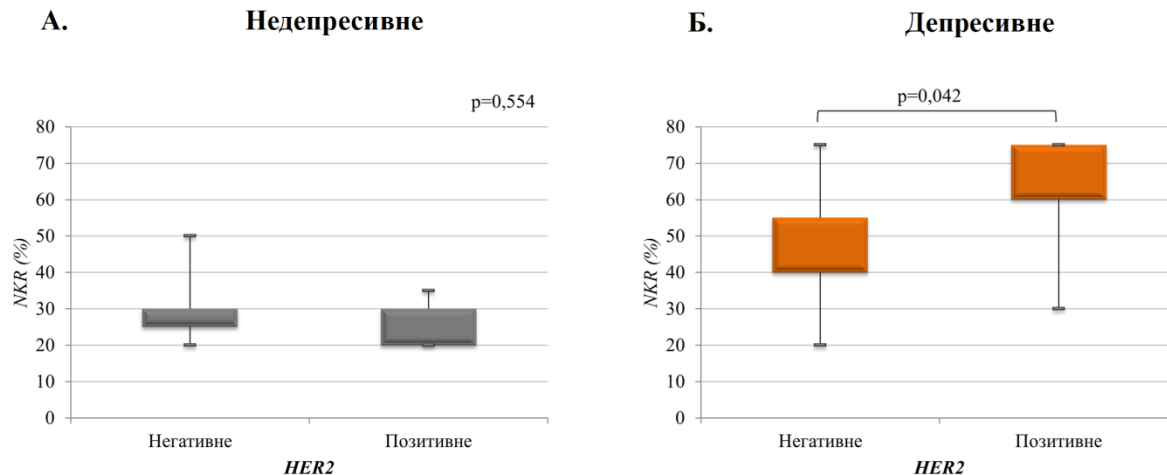
Фигура 42. Корелација између експресије *NKR* изражене у процентима и **А.** експресије *ER* код недепресивних пацијенткиња (није показана статистички значајна корелација између експресије *NKR* и експресије *ER*, $p=0,268$) **Б.** експресије *ER* код депресивних пацијенткиња (показана је статистички значајна корелација између експресије *NKR* и експресије *ER*, $p=0,045$).

Показана је јака позитивна корелација између експресије *NKR* и експресије *endoglina (CD105)* ($p=0,001$, $\rho=0,526$), односно са повећањем експресије *NKR* расте и експресија *endoglina (CD105)* код депресивних пацијенткиња. Што се тиче недепресивних значајна корелација није показана ($p=0,300$, $\rho=0,212$) (фигура 43).



Фигура 43. Корелација између експресије *NKR* изражене у процентима и **А.** експресије *endoglina (CD105)* код недепресивних пацијенткиња (није показана статистички значајна корелација између експресије *NKR* и експресије *endoglina (CD105)*, $p=0,300$) **Б.** експресије *endoglina (CD105)* код депресивних пацијенткиња (показана је статистички значајна корелација између експресије *NKR* и експресије *endoglina (CD105)*, $p=0,001$).

Није показана статистички значајна разлика у експресији *NKR* у односу на експресију *HER2* (*Man-Whitney U test*, $p=0,554$) код недепресивних пацијенткиња. Са друге стране, депресивне пацијенткиње које су биле *HER2* позитивне су имале веће вредности експресије *NKR* (*Man-Whitney U test*, $p=0,042$) (фигура 44).



Фигура 44. Разлика у експресији *NKR* у односу на **А.** експресију *HER2* код **недепресивних пацијенткиња** (није постојала статистички значајна разлика у експресији *NKR* у зависности од експресије *HER2*, $p=0,554$), **Б.** експресију *HER2* код **депресивних пацијенткиња** (постојала је статистички значајна разлика у експресији *NKR* у зависности од експресије *HER2*, $p=0,042$).

У односу на експресију пролиферативног индекса *Ki67*, код депресивних пацијенткиња показана је статистички значајна разлика (*Kruskal-Wallis*, $p=0,001$), односно пацијенткиње које су имале висок ниво експресије пролиферативног индекса *Ki67* су имале веће вредности експресије *NKR*. Такође, депресивне пацијенткиње са умереном или јаком експресијом *VEGF* (*Kruskal-Wallis*, $p=0,003$), као и депресивне пацијенткиња које су имале умерен ниво експресије *caspase-3* (*Kruskal-Wallis*, $p=0,000$) су имале статистичко значајно веће вредности експресије *NKR*. Код недепресивних пацијенткиња, значајна разлика у експресији *NKR* у односу на експресију *Ki67* (*Kruskal-Wallis*, $p=0,221$), *VEGF* (*Kruskal-Wallis*, $p=0,381$) и *caspase-3* (*Kruskal-Wallis*, $p=0,585$) није постојала (табела 10).

Табела 10. Експресија *NKR* у односу на експресију *Ki67*, *VEGF*, *caspase-3* недепресивних и депресивних пацијенткиња

Карактеристика	Недепресивне		Депресивне	
	Медијана (<i>IQR</i>)	Просечна вредност (стандардна девијација)	Медијана (<i>IQR</i>)	Просечна вредност (стандардна девијација)
<i>Ki67</i>				
Низак	30,0 (5,0)	32,14±14,4	25,0 (8,0)	26,0±4,2
Умерен	-	-	65,0 (30,0)	59,47±15,4
Висок	25,0 (8,0)	26,11±4,167	70,0 (16,0)	63,03±13,5
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>	1,497/0,221		13,999/0,001	
<i>VEGF</i>				
Низак	30,0 (5,0)	32,08±15,7	32,5 (35,0)	42,5±21,8
Умерен	25,0 (5,0)	27,5±4,7	60,0 (35,0)	53,23±18,3
Јак	-	-	70,0 (15,0)	66,71±8,9
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>	0,768/0,381		11,595/0,003	
<i>caspase-3</i>				
Низак	-	-	55,0 (35,0)	52,12±17,8
Умерен	30,0 (5,0)	28,57±3,8	70,0 (10,0)	67,43±9,4
Висок	37,5 (5,0)	30,0±13,4	-	-
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>	0,298/0,585		15,114/0,001	

Код недепресивних као и код депресивних пацијенткиња са карциномом дојке, није показана значајна разлика у вредностима експресије *NKR* у односу на дезмоплазију, моноклеарну реакцију, перидукталну еластозу, некрозу, перинеуралну, лимфну и васкуларну инвазију (табела 11).

Табела 11. Експресија *NKR* у односу на клиничко-патолошке карактеристике недепресивних и депресивних пацијенткиња

Карактеристика	Недепресивне		Депресивне	
	Медијана (<i>IQR</i>)	Просечна вредност (стандардна девијација)	Медијана (<i>IQR</i>)	Просечна вредност (стандардна девијација)
Дезмоплазија				
Одсутна	30,0 (4,0)	28,75±3,5	70,0 (25,0)	60,56±16,1
Лакостепена	25,0 (10,0)	37,0 ±24,1	60,0 (30,0)	55,00±17,3
Умерена	25,0 (10,0)	26,67±6,6	70,0 (20,0)	59,57±17,1
Изражена	30,0 (5,0)	28,75±2,5	67,5 (20,0)	60,0±15,6
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>		1,564/0,668		1,10/0,765
Мононуклеарна реакција				
Одсутна	30,0 (5,0)	28,89±3,3	65,0 (28,0)	58,91±15,7
Лакостепена	25,0 (6,0)	27,00±5,9	65,0 (19,0)	58,50±17,5
Умерена	30,0 (5,0)	34,29±20,5	70,0 (25,0)	61,67±17,2
Изражена	-	-	70,0 (10,0)	63,57±13,4
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>		1,395/0,498		1,060/0,787
Перидуктална еластоза				
Одсутна	27,5 (5,0)	27,50±3,5	65,0 (28,0)	58,87±16,7
Фокална	30,0 (40,0)	28,00±204,9	70,0 (10,0)	67,50±5,4
Умерена	27,5 (5,0)	27,5±3,5	-	-
Изражена	-	-	60,0 (33,0)	56,0±18,7
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>		0,606/0,895		1,506/0,681
Некроза				
Одсутна	25,0 (5,0)	30,0±13,3	70,0 (14,0)	62,77±14,6
Лака	-	-	47,5 (41,0)	46,25±21,4
Умерена	30,0 (8,0)	30,00±4,1	52,5 (25,0)	54,5±16,4
Тешка	30,0 (5,0)	26,67±5,8	45,0 (30,0)	45,0±17,3
<i>Kruskal-Wallis test/p</i>		1,657/0,646		10,380/0,065
Перинеурална инвазија				
Одсутна	30,0 (5,0)	30,53±13,0	65,0 (30,0)	59,39±16,5
Присутна	25,0 (5,0)	27,14±2,7	70,0 (18,0)	60,60±15,6
<i>Mann-Whitney U test/p</i>		58,000/0,651		57,500/0,861
Лимфна инвазија				

Одсутна	30,0 (5,0)	30,94±13,6	65,0 (35,0)	57,82±17,5
Присутна	27,5 (6,0)	27,50±5,9	70,0 (15,0)	62,00±14,3
Mann-Whitney U test/p		70,000/0,623		62,500/0,551
Васкуларна инвазија				
Одсутна	30,0 (5,0)	30,23±12,1	70,0 (20,0)	60,91±15,2
Присутна	25,0 (4,0)	26,25±2,5	65,0 (30,0)	56,58±18,3
Mann-Whitney U test/p		32,000/0,429		45,000/0,367

Резултати добијени бинарном логистичком регресијом, показали су да пацијенткиње са карциномом дојке који припадају свим подгрупама молекуларног подтипа осим *LumA* имају 5,9 пута веће шансе да буду депресивније ($OR=5,934$). Такође, пацијенткиње са карциномом чији је ниво експресије *Ki67* умерен или висок имају 8,5 пута веће шансе да буду у групи депресивних у односу на оне са ниским нивоом експресије *Ki67* ($OR=8,556$). Даље бинарна логистичка регресија је показала да са повећањем *endogline* за 1, за 30% су веће шансе да пацијенткиња буде у групи депресивних ($OR=1,349$), а са повећањем експресије рецептора за *ER* за 1, 30% су мање шансе да пацијенткиња буде у групи депресивних ($OR=0,726$). Мултиваријантном бинарном логистичком регресијом показано је да на појаву депресивности код пацијенткиња са КД највећи утицај има ниво експресије *endogline* ($OR=1,224$), као и експресија *NKR%* ($OR=1,085$), са повећањем за 1 обе категорије, ризик за појаву депресије се повећава за 22% и 8%, респективно. Остали резултати су приказани у табели 12.

Табела 12. Униваријантна и мултиваријантна логистичка регресија фактора који утичу на присуство депресивности

Карактеристика	УНИВАРИЈАНТНА ЛОГИСТИЧКА РЕГРЕСИЈА			МУЛТИВАРИЈАНТНА ЛОГИСТИЧКА РЕГРЕСИЈА		
	<i>OR</i>	95% интервал поверења	<i>p</i>	<i>OR</i>	95% интервал поверења	<i>p</i>
Молекуларни подтип (<i>LumA</i> /остали подтипови)	5,934	1,898- 18,554	0,002	-	-	-
Хистолошки градус (Градус 1/Градус 2 и 3)	12,200	3,702- 20,206	0,001	-	-	-
Нуклеарни градус (Градус 1/Градус 2 и 3)	13,286	3,725- 37,382	0,002	-	-	-
Старост	1,044	1,023-1,092	0,045	-	-	-
<i>ER</i>	0,726	0,576-0,916	0,007	-	-	-
<i>PR</i>	0,797	0,679-0,935	0,005	-	-	-
<i>endogline (CD105)</i>	1,349	1,164-1,562	0,001	1,224	1,020-1,469	0,030
<i>HER2</i>	6,273	1,361- 28,914	0,019	-	-	-
<i>Ki67</i> (низак/умерен и висок)	8,556	9,989- 17,779	0,004	-	-	-
<i>VEGF</i> (низак/умерен и јак)	5,714	6,686- 40,237	0,020	-	-	-
<i>caspase-3</i> (низак/умерен и висок)	0,006	0,001-0,053	0,001	-	-	-
<i>NKR%</i>	1,166	1,091-1,245	0,001	1,085	1,002-1,175	0,043

5. ДИСКУСИЈА

Глобална оптерећеност жена КД, горући је проблем, мерено инциденцом, али и стопом умирања чиме указује на значајан проблем који има тенденцију раста у многим земљама. Представља најчешћи тип инвазивног карцинома који се дијагностикује код жена у свим расним и етичким групама и узрокује смртни исход оболелих жена, више него било који други карцином, осим карцином плућа (2). Упркос великом броју истраживања и несумњивом напретку у области прогнозе и лечења КД, тумор представља и даље велики, својеврстан недокучив проблем широм света. Као значајан фактор који утиче како на ток тако и на исход и прогнозу болести издваја се свакако доказана изузетна хетерогеност КД, са широким спектром варијација у прогнози (37).

У моменту саопштења да болују од КД жене се суочавају са значајном нелагодношћу која утиче на даљи квалитет живота, а изван број, негде између 10 и 25% показује знаке озбиљног поремећаја као што је велики депресивни поремећај (48). Депресија је сигурно најчешћи психолошки поремећај који се може видети код пацијенткиња оболелих од КД, коју готово по правилу прате знаци анксиозног поремећаја (49). С обзиром да не тако мали број случајева са симптомима великог депресивног поремећаја остаје препознат и нелечен, постоји потреба за истраживањима која би показала преваленцу анксиозних и депресивних симптома међу женама оболелим од КД, али и указала на то како анксиозност/депресија утиче на еволуцију карцинома. Депресивни поремећај код пацијента може значајно да смањи одговор на терапију, са негативним утицајем на ток болести, а све то за последицу има продужен период хоспитализације и повећање трошкова лечења. На основу података добијених у истраживањима која су се бавила питањем могућих веза и међусобног утицаја између карцинома и депресије, недвосмислено је да веза постоји и да је она значајна. Чињеница је да је последњих година посебну пажњу истраживача привукла фамилија неуропептида, познатијих као тахикинини, како по питању њиховог учешћа у прогресији и развоју КД, али истовремено не тако мање значајан удео у појави и развоју депресивног/анксиозног поремећаја. Напред наведена чињеница могла би да представља потенцијални одговор на питање коморбидитета карцинома и депресије код оболелих, али и то како болести једна на другу утичу (153). Супстанца *P* (*SP*), неурокинин А (*NKA*), и неурокинин В (*NKB*) најзначајнији чланови фамилије неуропептида, свој биолошки ефекат испољавају преко неурокининских рецептор (*NK1R*, *NK2R* и *NK3R*), суперфамилија рецептора куплованих *G* протеином. *SP* као најбитнији и широко распрострањен члан ове фамилије своје ефекте остварује преко *NK1R* према којем испољава највећи афинитет. Улоге ове супстанце су јако разноврдне и значајне и крећу се од улоге у зарастању рана, неурогеној инфламацији, вазодилатацији, преношењу сигнала бола, ублажавање мучнине и повраћања након хемиотерапије (*CINV*), са озбиљним учешћем у покретању процеса туморске иницијације, трансдукцијом интрацелуларних сигнала након везивања за *NK1R* (101). Повећана регулаторна активност *SP/NK1R* система откривена је и описана у многим туморима попут глиобластома, ретинобластома, карцинома плућа, ендометријума и панкреаса, са учешћем како у прогресији тако и даљем ширењу карцинома. Имунохистохемијским методама потврђена је експресија *NK1R* у туморски измењеним ћелијама КД. Поремећена активност *SP/NK1R* система одговорна је за многе про-туморске процесе КД укључујући ћелијски раст, пролиферацију, миграцију, метастазирање, појаву резистентности на дотад ефикасну терапију, као и неоангиогенезу (153). Доказано је да *SP* подстиче канцерску прогресију

након везивања за *NKR* и то преко три механизма: 1. као универзални митоген за туморске ћелије које појачано експримирају *NKR* (пептид такође потенцира антиапоптотски ефекат); 2. стимулацијом раста ендотелних ћелија (неоангиогенеза) и позитивна регулација раста тумора; 3. везивањем за *NKR SP* изазива миграцију туморских ћелија која је од велике важности за инвазивност и метастазирање тумора. супротно, антагонисти *NKR* испољавају три комплементарна механизма: 1. антипролиферативна активност, удружена са инхибицијом раста туморске ћелије, активности која се специфично одвија преко *NKR* који се појачано експримирају на њима, узрокујући тако смрт туморске ћелије посредством апоптозе; 2. инхибиција ангиогенезе у тумору и 3. блокирање миграције туморских ћелија (утицај на инвазију и метастазирање). Антитуморска активност антагониста *NKR* изгледа не зависи од саме хемијске структуре, већ да је значајније повезан са стереохемијским карактеристикама. Извесно је да антагонисти инхибирају раст туморске ћелије у дозно-зависном режиму. Поред овога, треба нагласити да је овај рецепторски систем уплетен и у емоционални стрес и хроничну инфламацију, процесе који сигурно имају утицај на повећање ризика за развој канцера, а касније и на понашање тумора. У прилог таквој тврдњи говоре подаци да након примене антагонисте овог рецепторског система постоје озбиљни антидепресивни и анксиолитички ефекат. Сва наведена запажања сугеришу да *SP/ NKR* систем може имати изузетно важну улогу у појави и каснијем развоју тумора и његовом метастазирању; због тога рецептор може бити обећавајућа мета која може помоћи у превенцији и лечењу канцера; самим тим, употребом антагониста *NKR* може се унапредити терапијски процес канцера. У складу са свиме што је наведено, горе поменути антагонисти могли би бити нова генерација антиканцерских лекова. У 21. веку, ери молекуларне медицине, где лекови циљано, погађају канцерске ћелије, антагонисти *NKR* као нова генерација антиканцерских лекова обећавају ефикасност лечења.(86)

5.1. Депресивост и анксиозност код пацијенткиња са КД

Велики број истраживања дуги низ година бавио се питањем депресије/анксизности и карцинома, са веома опречним и контрадикторним подацима који су добијани. Један од важних разлога за овакво стање са подацима лежи у одабиру методолошког приступа и примењених скала којима би се ови психијатријски поремећаји мерили. Тако је проценат депресивног/анксиозног поремећаја код оболелих, зависно од примењеног метода мерења био екстремно варијабилан и кретао се од свега 1% до чак преко 50% у различитим истраживањима (162). Међутим, без обзира на овако значајну варијабилност у добијеним резултатима, не може се занемарити чињеница, а то је да су горе наведени психијатријски поремећаји 2-3 пута чешћи код особа са карциномима у поређењу са оним у општој популацији, људима који карцином немају. Изузетно чест коморбидитет карцинома и депресије код пацијената довео је до бројних истраживања који су покушавали да појасне молекуларне механизме ова два поремећаја, а све са циљем бољег разумевања и једног и другог поремећаја, то како они могу један на други да утичу, али и да се открију нова, потенцијална места терапијског приступа.

Суочавање са дијагнозом болести која прети да озбиљно наруши живот појединца, као што је управо канцер, по правилу је праћено израженим стресним реаговањем, са појавом веома непријатних и негативних осећања попут страха, безнађа, кривице, очаја и озбиљног осећаја напуштениости (163). Надаље, током дуготрајних и исцрпљујућих дијагностичких и терапијских протокола који пролазе пацијенти са канцером, долази до

суочавања са акутним и хроничним стресорима који теже да озбиљно наруше и онако нарушен квалитет живота. Због свега наведеног, не чуди чињеница да је код оболелих депресија најчешћи психијатријски поремећај који се дијагностикује, са готово 1/3 пацијената који испољавају одређене знаке поремећаја у моменту постављања дијагнозе, док 1/4 њих поседује симптоме који задовољавају критеријуме за постављање клиничке дијагнозе озбиљне депресије која захтева лечење (164). Као најважнији извори стреса и психолошке патње код пацијенткиња оболелих од карцинома дојке наводе се: несигурност у вези са терапијским процедурама, физички симптоми, страх од смрти и повратка болести, измене у погледу женствености, физичког изгледа и сексуалности (након мастектомије), ограниченост у обављању свакодневних активности, проблеми у породици и као најважнији, издваја се изостанак емоционалне подршке од блиских особа (58). За сваку жену дојка је веома важан орган, симбол је женствености и сексуалности, па је хируршко одстрањење повезано са карциномом удружено са осећајем губитка привлачности и материнства и на комплетно промењену слику о читавом телесном изражају (165). У једном истраживању показано је да је депресија код пацијенткиња са карциномом дојке повезана са вишим нивоима анксиозности, нижим самопоуздањем и измењеном свешћу о телесном изражају (166). Ништа мање значајан извор стреса код пацијенткиња нису ни продужени сложени терапијски поступци, баш као и нежељени ефекти зрачне и хемиотерапије (167). Тако је пронађено да је ниво анксиозности знатно виши код млађих и пацијенткиња средње животне доби које су примале хемиотерапију. Постоји могућност истовременог појављивања неколико различитих психијатријских поремећаја, па тако поред депресије, код испитиваних пацијенткиња могу да се појаве и анксиозност (24%), панични напади (18%) и посттрауматски стресни поремећај-ПТСП (30%) (168). Овакво стање комплексних поремећаја доводи до знатно дужег останка у болници и драстично смањује квалитет живота након напуштања болнице (56). Систематичним прегледом литературе кроз велики број истраживања постоје врло опречни резултати како по питању инциденце тако и по питању озбиљности депресивног поремећаја код пацијенткиња оболелих од карцинома дојке. Тако у истраживању у Ирану спроведеном систематичним прегледом литературе и мета анализом резултати су показали да је сваки пацијент са карциномом испољавао барем благи облик депресије (169). У другом истраживању у којем је 69.4% жена са карциномом дојке било депресивно и да се углавном радило о озбиљним формама депресије (170). Сигурно је да фактори попут климатских, културолошких и географских имају утицај на појаву депресије код жена са карциномом дојке, па се инциденца међу испитиваним женама у азијским земљама креће око 26% (171), у Индији је било 21.5% (172), док је у Турској било 27.7% жена са умереним и 19.5% са озбиљним депресивним поремећајем (173). У неколико независних истраживања спроведених у Америци, током 2000., 2005., 2010 и 2012. године инциденца депресивног поремећаја код оболелих жена мењала се и износила 26% (174), 10% (175), 42% (176) и 56% (177) респективно. Када су у питању европске земље нпр Немачка, истраживања показују да негде око 11% жена су погођене умереним обликом депресије, док њих 12% испољава знаке озбиљног поремећаја (178). У Италији нпр проценат жена са карциномом дојке и присутним депресивним расположењем је око 18% (179). Као могући разлози за овакве различите резултате у погледу инциденце депресивног поремећаја међу женама са карциномом дојке у различитим земљама, наводе се демографске карактеристике, попут година живота испитаница, њихов брачни статус, време од постављања дијагнозе, врста и број спроведених терапијских процедура, баш као и горе

споменуте географске и културолошке разлике које несумњиво утичу на ментални и психосоцијални статус жена (180). У нашем истраживању од укупно 93 пацијенткиње које су биле укључене, њих 67 (72%) испољавало је одређени степен депресивног расположења, док њих 26 (28%) није имало знаке депресивности. Међу пацијенткињама са депресивним поремећајем, њих 16 (17.20%) имало је знаке благог поремећаја, са умереним обликом било је 15 (16.10%), а тежи облик депресивног поремећаја испољавало је чак 36 пацијенткиња (38.70%). Подаци који су добијени мерењем анксиозности код испитаница, у потпуности су пратили оне из литературе, са готово потпуним преклапањем са онима везаним за депресивни поремећај. Тако је у истраживању њих 70 (75.30%) показивало знаке анксиозности, док су 23 (24.70%) жене биле без анксиозног поремећаја. Међу анксиозним женама, њих 16 (17.20%) имало је благи облик анксиозности, 18 (19.40%) је испољавало умерени облик, док је 36 (38.70%) имало тежак облик анксиозног поремећаја.

5.2. Депресивност и опште клиничко-патохистолошке карактеристике карцинома дојке

У истраживањима која су се бавила испитивањем корелације између социо-демографских и клиничко-патолошких карактеристика са једне и депресије оболелих жена са друге стране, резултати су били изузетно контрадикторни. У неким истраживањима показано је да је депресивност била у вези са старашћу пацијенткиња, њиховим материјалним и брачним статусом (181), док у другим та веза није била значајна (182). Резултати нашег истраживања указали су да веза између присуства депресивности код оболелих жена и већине социо-демографских карактеристика (запосленост, брачни статус, место боравка итд.) није била статистички значајна. Показана је статистички значајна разлика у старости пацијенткиња које су биле депресивне, и оних код којих се није јавила депресивност ($p=0,049$) при чему су оне пацијенткиње са вишим степеном депресивности биле старије. Такође, статистички значајна разлика је показана између депресивних и недепресивних пацијенткиња у погледу времена које је протекло од постављања дијагнозе, односно што је протекло више месеци од постављања дијагнозе пацијенткиње су испољавале нижи степен депресивности. ($p=0,006$). У претходним истраживањима показано је да је степен депресивности највиши у првих 5 година од постављене дијагнозе и да на овакво стање највећи утицај могу имати фактори попут старости, претходно психосоцијално стање, изостанак подршке околине, али и оних који су одлика саме болести и компликованих протокола лечења (183). Друго истраживање у којем је током 5 година од постављања дијагнозе шест пута измерен ниво депресивности код оболелих, показано да је исти био највиши у првој години од саопштавања дијагнозе (184). Без обзира на чињеницу да се ниво депресивности код жена оболелих од карцинома дојке битно смањује са протоком времена, исти нивои показују тенденцију одржавања на вишим вредностима у поређењу са здравом популацијом (179). У једном истраживању где је ниво депресивности мерен непосредно пре саопштавања дијагнозе, затим постоперативно након 1, 3, 6 и 12 месеци, показано је да ниво значајно опада са 40.9% на 27.8% након годину дана, али са извесном вероватноћом да симптоми могу да се поврате под одређеним околностима (185).

На основу доступних информација, ово је једно од ретких истраживања које је спроведено на територији наше земље које се бавило испитивањем повезаности клиничких и патохистолошких карактеристика карцинома дојке и присутног депресивног поремећаја код оболелих жена. Статистичком обрадом података кроз наше истраживање

показано је да разлике у погледу депресивности међу оболелим женама постоје када су у питању следеће категорије: молекуларни подтип КД, жене са карциномом подтипа Lum A и Lum B углавном су биле без знакова депресивности, док већина жена са *HER2+* и *TNBC* молекуларним подтипом су у значајном броју биле депресивније ($p=0,000$); виши хистолошки ($p=0,000$) и нуклеарни градус ($p=0,000$) је био заступљен код депресивних пацијенткиња, док је код недепресивних пацијенткиња у највећој мери био заступљен хистолошки и нуклеарни градус 1; ниво измереног прогестерона ($p=0,049$) и естрогена ($p=0,006$) је био значајно већи код пацијенткиња са карциномом које су сврстане у групу депресивних у односу на оне које су сврстане у групу недепресивних пацијенткиња; у једном истраживању повезаности хормонског статуса КД и депресије код жена са метастатским карциномом указано је на значајну везу између ове две категорије; наиме мултиваријантним моделом показано је да су позитиван статус хормонских рецептора и висок ризик за развој депресије били повезани са знатно лошијом прогнозом (25 месеци насупрот 32 месеца, $P < 0.05$). (186) депресивне пацијенткиње су у већем проценту спадале у групу позитивних на експресију *HER2* ($p=0,009$), као и у групу оних са умереним или високим нивоом експресије *Ki67* ($p=0,000$). Тако је у једној експерименталној студији са мишевима показана јака повезаност између депресије и карцинома. Наиме, у истој мишевима је индукован карцином и једна група је била излагана у дужем временском периоду умереном стресу. Примећено је да је код ове групе мишева карцином знатније напредовао и да је имунохистохемијски потврђен виши ниво експресије пролиферативног индекса *Ki67*. Као даља потврда ове хипотезе, једна група мишева третирана је само цитостатиком док је другој групи даван Пароксетин (антидепресивни лек) и примећено је да у овој комбинацији постоји снажнији антитуморски ефекат и да је ниво измереног *Ki67* у тумору био далеко нижи у односу на групу која је била без Пароксетина. Овакви резултати недвосмислено указују на то да депресија има директан утицај на промоцију и прогресију карцинома и да комбиновани цитостатици и антидепресиви имају значајнији антитуморски ефекат (187). Ранија истраживања показала су да одређени ментални ментални поремећаји попут депресије узрокују промене у нивоима цитокина, компромитујући функцију имунског система када је у питању контрола раста тумора (188). У стању депресије високи нивои ослобођеног кортизола доводе до инхибиције *IL-2*, *IL-6*, *TNF* и других цитокина (189). Постоје докази који указују да примењени антидепресиви не утичу само на уклањање психичких тегоба код пацијената са карциномима већ имају изванредан ефекат на побољшање функције имунског система, мерено нивоима цитокина који су укључени у регулацију туморског раста (190). *IL-22* је доказано значајан у туморској прогресији путем фосфорилације *ERK1/2* и *JNK* протеина и активацијом *MEK-ERK/JNK* сигналног пута којим подстичу ћелијску пролиферацију и раст тумора, а инхибира апоптозу (191). У истраживању са мишевима је показано да је комбинација цитостатика и антидепресива најуспешнија у постизању антитуморског ефекта посредством смањења *p-p38*, *p-ERK* и *p-JNK* протеина и утицаја на *MAPK* сигнални пут, управо смањењем нивоа *IL-22* (187). Слично претходном, појашњење везе између депресивности и *HER2+* карцинома дојке може се објаснити посредством имунског система, преко којег интерреагују. Наиме у истраживању Линглија и сарадника описано је три различита субтипа *HER2+* карцинома дојке на основу записа 33 учесника имунског одговора. Први се означава као Високо-Имуни (*Immune-High IM-H*) са значајном инфилтрацијом тумора имунским ћелијама и јаком антитуморском активношћу, са значајно бољом прогнозом. У основи оваквих карактеристика налазе се сигнални путеви

са карциномом удружени који се код овог субтипа КД налазе у стању хиперактивности (интеракција цитокина и рецептора за цитокине, антиген презентација, цитотоксичност посредована ћелијама природним убицама *NK*, *Th1* и *Th2* диференција ћелија, сигнални пут хемокина, *Th17* диференцијација ћелија, сигнални путеви В и Т рецептора, *NF- κ B*, експресија *PD-L1* и *PD-1* контролни пункт у карциному, *TNF*, *IL-17*, *NOD-like* и *Toll-like* рецептора. Други субтип се означава као Средње-Имуни (*Immune-Medium IM-M*) који је негде између друга два субтипа КД по питању учешћа имунског одговора у контроли тумора. И трећи субтип, Ниско-Имуни (*Immune-Low IM-L*) који показује утишан запис имунског одговора са унапређеном активношћу ликозилфосфатидилинозитол-анхор бисинтезом и репарацијом неусклађености гена (192). Учешће и удруженост депресије и побројаних сигналних молекула код ових различитих сигналних путева вероватно је веза између депресивности и *HER2+* карцинома дојке.

Статистички значајно већи ниво микроваскуларне густине односно експресије *endoglina* (*CD105*) је показан код пацијенткиња које су спадале у групу депресивних у односу на недепресивне ($p=0,000$). Такође, разлика је уочена и када је посматран ниво експресије *VEGF* ($p=0,000$) као и индекса апоптозе *caspase-3* ($p=0,000$). Депресивне пацијенткиње су чешће имале умерен или висок ниво експресије *VEGF*, док су насупрот томе чешће имале низак или умерен ниво експресије индекса апоптозе *caspase-3*. У неколико истраживања показано је да хроничан стрес доводи до неуроваскуларне поремећене функције која је повезана са повећаном пермеабилношћу крвно-мождане баријере, што може бити значајно у патофизиологији депресије повезане са стресом. У истраживању Хитомија и сарадника на мишјем моделу где је постојала изложеност стресу, имунохистохемијски је доказана повећана експресија *VEGF*-а, кључног медијатора ангиогенезе и пермеабилности крвно-мождане баријере. Потврђено је да је *VEGF* значајан у развоју депресије, јер се након фармаколошког блокирања рецептора превенирала и значајно смањила пермеабилност крвно-мождане баријере као и осећај незадовољства у понашању мишева (193). Када је испитивана експресија *NKR* код депресивних и недепресивних пацијенткиња са карциномом дојке, показано је да је значајно већа експресија овог рецептора код пацијенткиња које су спадале у групу депресивних пацијенткиња, било да је мерена експресија *NKR* као % ($p=0,000$), или када је приказана као Allred скор ($p=0,000$). Поремећена функција *NKR* система у мозгу повезана је са великим бројем неуролошких поремећаја. *NKR* се налази широко дистрибуиран у организму и посредством имунског и нервног система регулише многе функције у бројним системима органа, посредује у преношењу бола, али и у неурогеној инфламацији (194). У ЦНС-у *NKR* је најприсутнији у *locus*-у *coeruleus*-у, *ventral*-ном *striatum*-у, хипокампусу, кори великог мозга, амигдалама, церебелуму и таламусу. Многа истраживања су показала значајну улогу *SP/NKR* система у неуроинфламација која је најзначајнија за развој неуролошких поремећаја, па и депресије (195). Доказана је повишена вредност *SP* у цереброспиналној течности код депресивних и пацијената са посттрауматским стресним поремећајем. Доказима из предклиничких студија указује се на примену антагониста *NKR* као обећавајуће мете за лечење депресије која се заснива на неуротрофичној и инфламаторној теорији (196). Апрепитант, антагониста *NKR* примарно коришћен за лечење повраћања изазвано хемиотерапијом, налазио се у трећој фази клиничког испитивања за лечење депресије (*Kenilworth, NJ, USA*). Испитивање спроведено на 2500 пацијената где је коришћена наноформулација Апрепитанта у дози од 80 или 160 mg није се показала као ефикасна у лечењу депресије. Можда један од главних разлога

неуспеха овог антагонисте *NKR* тај што није дефинисана максимална доза наноформулације Апрепитанта која може бити толерисана као нешкодљива; уместо ефикасности окупираности рецептора за лечење мучнине испитивање је усмерено на клиничке бенефите за лечење депресије (114). У светлу доказане неуроинфламације у депресији, велики број предклиничких и истраживања указују на значајну везу између *SP-NKR* система и депресије (197).

У истраживању Хуија и сарадника показано је да КД са вишим градусом у погледу *TNM* класификационог система који описује степен раста и проширености тумора, као и тумори са метастазама у регионалним лимфним чворовима су они који су били у позитивној корелацији са присутном депресијом коју су оболеле жене испољавале (198). Такође су показали да је статус хормонских рецептора на туморским ћелијама повезан са депресивношћу код пацијенткиња, тако нпр. виши нивои експресије рецептора за *ER* и *PR* на туморским ћелијама одговара нижем степену депресије код оболелих, док када је у питању експресија индекса пролиферативности *Ki67* није постојала статистички значајна корелација (186). У истраживању Гуоа и сарадника показано је да је присуство метастаза у регионалним лимфним чворовима било у позитивној корелацији са депресивношћу пацијенткиња и да је депресивност зависила од статуса хормонских рецептора на туморским ћелијама, али супротно нашим и подацима претходног истраживања, где је виша експресија рецептора за *ER* и *PR* указивала на већи ризик од развоја депресије (186).

Резултати нашег истраживања показали су да разлика у погледу присуства депресивности код оболелих жена не постоји када је у питању *TNM* класификациони систем карцинома (величина тумора, статус регионалних лимфних чворова, удаљене метастазе), као ни по питању других хистопатолошких карактеристика КД попут дезмоплазије, моноклеарне реакције, перидукталне еластозе, некрозе, перинеуралне, лимфне и васкуларне инвазије у тумору.

Интересантно је да су и у погледу степена испољене депресивности постојале извесне статистички значајне разлике и то када је у питању молекуларни тип- највећи проценат пацијенткиња који је спадао у групу недепресивних и са благим обликом депресивности је спадао у *Lum A* и *Lum B* молекуларни подтип, док су пацијенткиње са тежим обликом у највећем проценту спадале у *HER2+* и *TNBC* подтип, односно молекуларни подтип је био повезан са степеном депресивности ($p=0,000$); хистолошки и нуклеарни градус је био статистички значајно повезан са степеном депресивности, односно код тежих облика је био заступљенији градус 3 и уједном и другом случају ($p=0,000$); статистички значајна разлика у старости пацијенткиња у односу на степен депресивности ($p=0,034$), односно, пацијенткиње са благим обликом депресије су биле старије у односу на оне које су биле недепресивне или имале тежи облик депресивности. Разлика је уочена и када је посматран број месеци од постављања дијагнозе ($p=0,031$), односно, како је време одмицало степен депресивности се битније смањивао; ниво експресије рецептора за *ER* је био значајно нижи код пацијенткиња са тежим степеном депресивности у односу на оне које су имале благи и умерени облик ($p=0,000$). Што се тиче експресије прогестерона, значајно нижи ниво експресије је показан код пацијенткиња са тежим степеном у односу на пацијенткиње које су спадале у групу недепресивних или са лажим обликом депресивности ($p=0,000$); између свих испитиваних група у погледу нивоа микроваскуларне густине, односно експресије *endoglin* (*CD105*) је постојала статистички значајна разлика ($p=0,000$) при чему се са порастом тежине депресивности повећавао и ниво експресије *endoglin* (*CD105*); пацијенткиње које су имале тежи степен

депресивности су чешће биле у групи са позитивном експресијом *HER2* ($p=0,000$), са високим нивоом експресије *Ki-67* ($p=0,000$), као и са јаком експресијом *VEGF* ($p=0,000$), док је њихов ниво експресије индекса апоптозе *caspase-3* чешће био низак ($p=0,000$); што се тиче лимфне инвазије, она је била заступљенија код пацијенткиња са умереним и тежим обликом депресивности у односу на пацијенткиње које су имале блажи облик или су биле недепресивне ($p=0,045$). Са друге стране у погледу Т статуса ($p=0,821$), N статуса ($p=0,785$) и М статуса ($p=0,710$); хистолошког типа ($p=0,935$); присуства дезмоплазије ($p=0,087$), моноклеарне реакције ($p=0,425$), перидукталне еластозе ($p=0,198$), некрозе ($p=0,564$), перинеуралне инвазије ($p=0,293$) и васкуларне инвазије ($p=0,935$) није било значајне повезаности са степеном депресивности код пацијенткиња са карциномом дојке.

Резултати добијени у нашем истраживању и они из прегледаних су још једна потврда да постоји веза између депресивности код особа са КД и одређених клиничких и патохистолошких карактеристика карцинома, али да су молекуларни механизми баш као и узрочно-последична повезаност између њих и даље недовољно разјашњени. До сада описано у истраживањима, већина истих коморбидитет КД и депресије код оболелих објашњавају на четири могућа начина: инфламација и оксидативно/нитрозативни стрес, смањење имунолошког надзора, абнормална активација аутономног нервног система и хипоталамус-хипофиза-бубрежна осовина (HРА) (199).

5.3. Експресија *NKR* у карциному дојке

Просечна вредност експресије *NKR* код пацијенткиња са карциномом дојке је износила $53,66 \pm 19,673$, при чему је минимална експресија износила 20 а максимална 80%. Пронађене су значајне повезаности између нивоа експресије *NKR* и хистолошког градуса тумора ($p < 0,002$), нуклеарног градуса ($p < 0,006$) и пролиферативног индекса *Ki67* ($p=0,000$). Утврђено је да је експресија *NKR* већа код тумора хистолошког градуса III у поређењу са градусом I и II. У студији *Garsia-Recia* и сарадника *NKR* је позитивно експримиран у 94% анализираних случајева (318 узорака) (200). Студија *Davoodiana* и сарадника је показала да је експресија *NKR* била позитивна у свих тридесет анализираних случајева (201) и била је повишена у око 88% анализираних узорака ткива у другој студији *Huanga* и сарадника (202). Варијације у стопи експресије могу бити последица разлика у хистолошком типу анализираних случајева карцинома дојке, поред разлика у величини узорка. Друго објашњење је присуство две изоформе за *NKR*, пуне дужине (*NKR-fl*) и скраћене (*NKR-Tr*). Овај други карактерише одсуство 96 остатака на његовом цитоплазматском крају, што може смањити ефикасност у погледу десензибилизације и интернализације (93). Још увек није јасно како су *NKR-fl* или *NKR-Tr* функционално повезани са туморогенезом и њиховим специфичним биолошким функцијама у формирању и прогресији тумора. Ипак, претходне студије су показале да су нивои експресије *NKR-fl* очигледно смањени у ћелијским линијама карцинома дојке и туморским ткивима и значајно прекомерно експримирани у нормалним ткивима дојке, док је *NKR-Tr* облик био високо експримиран у ћелијама и ткивима карцинома дојке (203, 204). Висока експресија гена *NKR-Tr* значајно је повезана са *TNM* стадијумом, *ER*, *PR* статусима и експресијом *Ki67*, док *NKR-fl* није била повезана ни са једном од клиничкопатолошких варијабли осим статуса лимфних чворова (203). Са друге стране, у студији *Al-Keilani* и сарадници су применили неспецифично примарно антитело које се везује за екстрацелуларни домен рецептора и открива обе изоформе *NKR*. Будуће студије би требало да се фокусирају на истраживање две изоформе како би се идентификовала

њихова диференцијална експресија и прогностичка вредност код пацијенткиња са карциномом дојке.

Такође, у студији *Davoodiana* и сарадника су проценили нивое супстанце *P* у серуму пацијената, као приступачнији и мање инвазивни узорак за могућу будућу дијагнозу, као и експресију *NKR* у ткиву дојке упоређујући их са различитим карактеристикама тумора укључујући *TNM* стадијум, градус тумора, величину тумора, захваћеност лимфних чворова, *ER*, *PR* и експресију *HER2* (201). Важно је напоменути да је у овој студији експресија *NKR* у различитим ћелијским одељцима такође процењена и упоређена једна са другом, а њена корелација са карактеристикама тумора је процењена појединачно како би се успоставио детаљан однос и понудило детаљно разумевање које би евентуално помогло у развоју ефикасније циљане терапије. Још једна предност ове студије је да су проценат, интензитет и што је још важније, дистрибуција *NKR* упоређивани и пријављени и као средња вредност и у сваком случају појединачно како би се пружио бољи увид и прецизније информације (201). Поред тога показали су повећану количину *mRNA NKR* у малигним ћелијама, док их у бенигним ћелијама и нормалном епителу није било, што је у сагласности са другима, али и са нашим налазима где је експресија у бенигним променама и нормалном епителу била неупоредиво нижа у поређењу са малигним ћелијама где је позитивност била углавном висока (201, 205). Занимљиво је да се у туморском ткиву повећао интензитет бојења *NKR* и био је у корелацији са захваћеношћу лимфних чворова и стадијумом болести (205). Једноставно речено, особе са инвазивнијим туморима дојке и лошијом прогнозом показали су већу експресију *NKR*.

У складу са нашим резултатима, једна студија је открила значајну повезаност између експресије *NKR* и хистолошког градуса тумора, али диференцијална експресија између три градуса није пријављена у тој студији (202). У другој студији, висока експресија *NKR* била је евидентна у ткивима карцинома дојке градуса II и III, али анализа статистички значајне разлике између различитих хистолошких градуса није обављена (115). Ови налази указују на прогностичку вредност *NKR* код пацијената са карциномом дојке.

Познат је и учинак повећане експресије *NKR* на убрзану пролиферацију туморских ћелија. Како бисмо то испитали, анализирали смо повезаност експресије овог рецептора са маркером који указује на пролиферацију ћелија, *Ki67*. Колико нам је познато, ово је једна од ретких студија која је показала повезаност између имунохистохемијске експресије *NKR* и *Ki67* пролиферативног индекса код карцинома дојке. Сличан налаз је забележен код оралног сквамозног карцинома (206) и малигну одонтогених тумора (207). Сходно томе, третман животињских модела тумора на мозгу, карцинома панкреаса и хепатобластома антагонистима *NKR* резултирао је значајним смањењем *Ki67* позитивних ћелија (121, 127, 134), што подржава претходне доказе о онкогеном ефекту *NKR* кроз повећање пролиферативне способности туморских ћелија (136, 208). Једно истраживање се бавило испитивањем утицаја високе експресије *NKR* у ћелијама карцинома дојке на њихову пролиферацију. Дошли су до закључка да снижавањем експресије *NKR* долази до значајног смањења експресије *Ki67* пролиферативног индекса (204). Они су користили *miR-34b/c-5p* тумор супресор у карциному дојке. *MikroRNA (miRNA)* су класа ендогених, малих некодирајућих *RNA*. Они модулирају ћелијско понашање, пролиферацију, диференцијацију и апоптозу истовремено циљајући више гена (209). Код карцинома дојке, породица *miR-34b* је често утишана или слабо експримирана и потенцијални је ген супресор тумора. *MiR-34* може да инхибира пролиферацију ћелија карцинома дојке

супресијом *c-Myc* и активношћу фосфатазе *ERK* и *AKT* (210). Штавише, *miR-34* индукује заустављање ћелијског циклуса и апоптозу код карцинома дојке (211). Значајно за наше истраживање је чињеница да је *NKR* претпостављена мета *miR-34*, како је утврђено анализама коришћењем неколико биоинформатичких база података као што су *TargetScan*, *miRbase* и *RNAhibrid*, тј. *miR-34* смањује експресију *NKR* и последично пролиферацију туморских ћелија.

Интеракција између инфламације и туморског микроокружења (*tumor microenvironment TME*) је позната као један од главних узрока развоја карцинома. *TME* је сложена мрежа састављена од туморских и имуних ћелија, цитокина, ензима и других сродних фактора. Проинфламаторни цитокини, углавном породица *IL-1*, *IL-6* и *TNF-a*, кључни су фактори у стварању хроничне инфламације у контексту тумора. На основу пријављених доказа, ови цитокини показују про-туморогене функције зависне од врсте тумора, *TME* и других сродних фактора. Као про-туморогена функција, проинфламаторни цитокини доводе до хиперинфламације и промоције тумора утичући на различите механизме, укључујући ангиогенезу, пролиферацију, имуносупресију, ремоделирање екстрацелуларног матрикса, инвазивност и метастазе (212). Такође је познато да супстанца *P/NKR* комплекс регулише функцију имуних ћелија путем неурогених и ненеурогених путева; неурогена инфламација се јавља кроз модификацију инфламаторних ћелија као што су мастоцити, лимфоцити, моноцити и макрофаги у туморским и перитуморалним ткивима. Промоција ненеурогене инфламације се дешава кроз активацију макрофага и еозинофила. Поред тога, супстанца *P* делује као директан проинфламаторни цитокин, чиме се појачава запаљење у туморским ткивима. Супстанца *P/NKR* комплекс изазива генетску модулацију кроз трансактивацију рецептора са активношћу тирозин киназе као што су *EGFR* и *HER2*, и регулацију проинфламаторних транскрипционих фактора као што су *NFkB*, цитокини и хемокини (213). Коначно, супстанца *P/NKR* комплекс може накнадно да смањи апоптозу модулацијом имуних маркера *IL-4*, *IL-6* и *IL-10* (214, 215), што доводи до необуздане ћелијске деобе, прогресије ћелије и изражених метастаза карцинома. Све ово упућује на врло значајну улогу *NKR*, његове способности да изазове инфламацију у тумору, у прогресији карцинома дојке.

Данас се све више посвећује пажња биологији карцинома дојке. У односу на имунофенотип, сви карциноми дојке су подељени на *Lum A* и *B*, *HER2* позитивни и троструко негативни подтип (*TNBC*). Карциноми који не показују *HER2*/неу амплификацију и не експримирају рецепторе естрогена/прогестерона називају се троструко негативним карциномима дојке (*TNBC*). *TNBC* представља 15-20% свих карцинома дојке и повезан је са агресивним клиничким током (216, 217). Прогноза пацијената са *TNBC*, преживљавање и одговор на тренутне терапије су лоши и из тог разлога је кључно тражити нове терапијске циљеве у *TNBC* како би се развиле нове терапијске стратегије. Једна од ових мета је неурокинин-1 рецептор (*NKR*). Добро је познато да је систем супстанца *P/NKR* укључен у прогресију карцинома. *TNBC* ћелије прекомерно експримирају *NKR*, а након везивања за овај рецептор, супстанца *P* промовише пролиферацију/миграцију *TNBC* ћелија. Познато је да непептидни *NKR* антагонисти (нпр. апрепитант) испољавају, преко *NKR*, антитуморско дејство; *TNBC* ћелије умиру апоптозом. Извештај о прегледу који је спровео *Miguel Munoz* ажурира податке о обећавајућој терапијској иновацији антагониста *NKR* за лечење пацијената са *TNBC* (218). Пацијент је остао доброг здравља, без нежељених ефеката, а смањен је и волумен тумора (219). Анализом наших резултата добили смо да је највећа експресија

NKR управо била код пацијенткиња које су показивале *TNBC* имунофенотип, што такође упућује на лошу прогнозу пацијената са високом експресијом овог маркера. Неколико нових истраживања пружило је увид у улогу супстанца *P/NKR* у *TNBC*-у. На пример, супстанца *P* има улогу у индукцији хеморезистенције у *TNBC*. Дакле, антагонизам на супстанцу *P* је побољшао способност хемотерапије да убије резистентне *TNBC* ћелије (220). Даље истраживање, употребе цисплатина у комбинацији са антагонистима *NKR*, показало је да служи као нова, ефикаснија и безбеднија терапијска опција од постојећих терапија за *TNBC*, пошто су нивои *NKR* значајно повишени као одговор на цисплатин у неурону пацова и у две *TNBC* ћелијске линије (148). Биомаркер пролиферације ћелија *Ki67* се показао као вредан прогностички и предиктивни маркер код троструко негативног карцинома дојке (221-223).

Даље смо испитивали повезаност експресије *NKR* и експресије *caspase-3* и добили да је проценат позитивних ћелија тумора дојке на *NKR* био нижи код високо позитивних туморских ћелија на *caspase-3* и обрнуто. У студији Векмана и сарадника испитивали су утицај супстанце *P* и стимулације *NKR* на процес апоптозе. Они су закључили да ова стимулација *NKR* има способност да смањи *TNF α* индуковану апоптозу. Наиме *TNF α* значајно повећава количину *mRNA* за *caspase-9* и *caspase-3*, што активира процесе апоптозе у ћелијама. С друге стране, повећаном експресијом супстанце *P*, стимулацијом *NKR*, долази до смањене продукције *TNF α* , што даље омогућава виталност ћелија и њихово преживљавање, на тај начин стимулишући хиперцелуларност ткива (224). Аказави и сарадници показују везу између стимулације и активације *NKR* и супресије апоптозе преко активације *Akt* киназе (још познате као протеин киназа Б - *PKB*) у глиобластомима (225). Још један налаз ове студије је да блокада *NKR* инхибира базалну фосфорилацију и активност *Akt*-а. Овај налаз указује да повишена фосфорилација *Akt*-а уочена код многих пацијената са глиобластомом може имати свој извор у конститутивној активности *NKR* (225). Иначе улога *Akt* киназе је добро проучена и представљају сигналне молекуле раста и диференцијације ћелија. *Akt* је добро окарактерисан ефектор фосфоинозитид 3-киназе (*PI3K*) у *PI3K/Akt/mTOR* сигналном путу и његова дерегулација игра кључну улогу у патогенези многих карцинома код људи. Повећана активност *Akt* киназе је пријављена у ~40% карцинома дојке, плућа, епитела јајника, простате и желуца (226-228). Многи онкопротеини и туморски супресори се укрштају на *Akt* путу, што доводи до пролиферације ћелија, диференцијације, инхибиције апоптозе и реаранжмана актинског цитоскелета (229). *Akt* регулише опстанак ћелија директним фосфорилисањем молекуларних компоненти апоптотичке машинерије сисара (230). Прва компонента апоптотичке машинерије за коју је *Akt* утврдио да је фосфорилисан био је *Bad*, члан породице *Bcl-2*. Фосфорилација *Bad*-а нарушава његову способност да се веже за *Bcl-XL* и инактивира његову способност да индукује ћелијску смрт и промовише опстанак ћелија (231). Фосфорилација посредована *Akt*-ом индукује задржавање ендеогеног *Bad*-а у цитоплазми, чиме се блокира апоптоза спречавањем интеракције *Bad*-а са његовим метама у митохондријама (231). Даље, *Akt* фосфорилише *caspase-9* на *Ser196* и ефикасно је инактивира док је неефикасан у фосфориловању *caspase-3* и 8 и блокирању смрти изазване *caspase-8* (232). Штавише, објављено је да антагонисти *NKR* смањују базалну фосфорилацију *Akt*, што указује на присуство конститутивно активног облика *NKR* за покретање апоптозе у туморским ћелијама и да такође изазивају цепање *caspase-3* и протеолизу поли (*ADP*-рибозе) полимеразе (225).

Неоваскуларизација или неоангиогенеза је секвенцијални процес. Рану пролиферацију ендотела прати формирање нових крвних судова и повећан проток крви праћен сазревањем ендогених неуроваскуларних регулаторних система (233). Важно је да је неоангиогенеза, која се сматра обележјем развоја тумора, повезана са повећаном инервацијом ткива и експресијом *NKR*. Такође је познато да се у великој већини тумора супстанца *P* и *NKR* налазе у интра- и перитуморалним крвним судовима (234), те да су они, главни посредници неурогене инфламације кроз ослобађање пептида из периферних крвних судова, нервних терминала, укључени су у раст капиларних судова *in vivo* и у пролиферацију култивисаних ендотелних ћелија *in vitro*. Штавише, познато је да се пролиферација ендотелних ћелија помоћу агониста *NKR* повећава на начин који зависи од концентрације. Ови налази указују на то да агонисти *NKR* (нпр. супстанца *P*) могу директно стимулирати процес неоваскуларизације, вероватно кроз индукцију пролиферације ендотелних ћелија, и да супстанцом *P* појачана ангиогенеза је резултат директног деловања на микроваскуларне *NKR* (235). Дакле, преко таквих рецептора који се налазе у високој густини у крвним судовима, може се снажно утицати на васкуларну структуру и функцију унутар и око тумора повећањем крвотока тумора и подстицањем развоја строме, што последично утиче на пролиферацију ћелија, преживљавање и миграцију (234). *NKR* игра кључну улогу у супстанца *P* посредованој ангиогенези. На пример, *NKR* се појачано регулише у ендотелним ћелијама након ангиогенезе током хроничне упале дисајних путева код пацова (236). Показало се да производња азот-моноксида (*NO*) функционише на аутокрини начин да посредује у ефектима супстанце *P* на капиларни ендотел (237). Међутим, као природни периферни агонисти налик супстанци *P* и његовом дејству преко *NKR*, у студији *Songa* и сарадника су проучавали ефекте хемокина на ендотелне ћелије и ангиогенезу (238). У овој студији, по први пут су показали да хемокини могу да стимулишу *in vitro* и *in vivo* ангиогенезу активацијом *NKR*. познато је да хемокини имају изразит афинитет за *NKR* (239). Даље су показали да хемокини промовишу фосфорилацију *ERK1/2*, активацију *eNOS* (енгл. *endothelial nitric oxide synthase*) и експресију *VEGF* преко *NKR* у свеже припремљеним ендотелним ћелијама људске пупчане вене (238). Укратко, њихови резултати показују да специфична периферна дистрибуција и висок афинитет према *NKR* чине хемокине значајним регулаторима ангиогенезе преко активације и појачане експресије *VEGF* (238). Све ово је поткрепљено чињеницом да су бројна истраживања која су се заснивала на употреби антагониста *NKR* довела до снижења експресије *VEGF* и сходно томе смањиле инвазивност тумора и његово метастазирање (240). У истраживању *Alsaeed*-а и сарадника проучаван је моћан антагонист *NKR* апрепитан и показана је смањена експресија *VEGF* након његове примене код остеосаркома (241). Сличне резултате су добили и други у проучавању дејства апрепитана у сквамозелуларном карциному једњака (242), штавише, терапијско циљање апрепитана довело је до инхибиције *in vivo* ангиогенезе и накнадних метастаза у хепатобластому (121). Ово је у складу са нашим налазима, где је висока експресија *NKR* праћена високом експресијом *VEGF*. Постоје и алтернативни начини помоћу којих *NKR* учествује у процесу неоангиогенезе. Претходне студије су показале да је након активације *NKR* индукована синтеза и ослобађање *NO* (243). *NO* добијен из ендотела је углавном контролисан активношћу *eNOS* и игра важну улогу у ендотелним ангиогеним процесима (244). *NO* функционише као аутокрини регулатор микроваскуларних догађаја неопходних за неоваскуларизацију и посредује у ангиогенези.

Такође, активација *ERK* пута је кључно укључена у пролиферацију, миграцију, васкуларно ремоделирање и ангиогенезу (245). Откривена је брза фосфорилација *ERK1/2* у ћелијама које експримирају *NKR* (246). Стога је разумно предложити да *ERK1/2* сигнализација посредује про-ангиогене ефекте уз помоћ *NKR*.

Карциноми дојке који прекомерно експримирају *HER2* су агресивни и повезани са лошом прогнозом. Иако се онкогена зависност од *HER2* сигнализације терапеутски користи за лечење карцинома дојке, разочаравајући клинички одговори примећени код значајног процента пацијената сугеришу да се додатни механизми који регулишу *HER2* пут могу користити за фино подешавање одговора ћелија карцинома на анти-*HER2* терапију. Висока експресија *NKR* у нашем истраживању је била повезана за прекомерном експресијом *HER2* рецептора. Сличне резултате су добили и други (200). Исто тако, у овом раду су показали да хемијска инхибиција *NKR*, снажно смањује активност *HER2* у свим ћелијским линијама (200). Даље, њихови резултати имплицирају да би недостатак циљне зависности у неким анти-*HER2* терапијама могао бити делимично последица механизма трансактивације *NKR* у оним туморима који експримирају *NKR*. У ствари, приметили су да прекомерно излагање супстанци *P* *in vivo* повећава експресију *HER2* у *HER2* + или *HER2* – туморима и да би ово могло бити релевантан налаз за разматрање у односу на оне туморе који су првобитно класификовани као *HER2* негативни; константна сигнализација супстанцом *P* у туморским ћелијама могла би да фаворизује дуготрајну селекцију ћелија са повећаним нивоима *NKR*. Иако нису приметили повећање запремине тумора упркос повећаној експресији *HER2*, вероватно је да би се у дужем временском периоду ова стална активација *HER2* превела у повећање запремине тумора, као што се може очекивати у ситуацијама хроничне упале код људи. Штавише, *in vitro* експерименти показују да хронична изложеност супстанци *P* такође повећава експресију и активацију *HER2* у проучаваним ћелијским линијама (200). Поред тога, релевантност сигнализације супстанцом *P* код карцинома дојке може зависити од контекста. На пример, специфичност трансдукције *NKR* сигнала зависи од формирања протеинских комплекса након његове активације (247). У ствари, коекспресија *HER2* у истој ћелији карцинома могла би супстанци *P* обезбедити додатне адаптере за трансдукцију сигнала, чиме би се диверзификовали (створили различити услови) његови ефекти. На сличан начин, апоптотички ефекти инхибиције *NKR* могу зависити од његове способности да блокира онкогену зависност од *HER2*. Модулација стабилног стања тирозин киназних рецептора (*RTK*) као што су *HER2* и *EGFR* неуропептидима као што је супстанца *P* може утицати на клинички одговор тумора. Иако се онкогена зависност од *RTK* терапеутски користи за лечење карцинома дојке, трансмодулација *RTK* помоћу супстанце *P* и других неуропептида и проинфламаторних медијатора (248, 249) може утицати на одговор карциномских ћелија на *RTK* инхибиторе јер служи као механизам за активацију *RTK* на лиганд-независан начин (250). Протеин тирозин киназа *c-Src* може директно да фосфорилише остатке рецептора у домену киназе *HER2* (251, 252) и цитоплазматском репу *EGFR* (253), омогућавајући формирање стабилних хомо- или хетерокомплекса са другим рецепторима или везивање протеина цитоскелета и активирање трансдукције сигнала. Поред тога, активирани *RTK* ће реципрочно активирати *c-Src*, стварајући тако позитивну регулаторну петљу. Ова прекомерна активација може допринети трајној сигнализацији преко *RTK* и одржавању вишеструких сигналних путева низводно од рецептора (254). Затим, трансактивација ових рецептора помоћу механизма зависних од *c-Src* може допринети постојању сигналних путева повезаних са *RTK* чак и у присуству

инхибитора тирозин киназе или антитела против екстрацелуларних домена ових рецептора. Познато је да је *c-Src* протеин прекомерно експримиран у 70% карцинома дојке и да је у већини њих *c-Src* коекспримиран са најмање једним чланом породице *ErbB* (255). Налаз да базална активација *HER2* и *EGFR* зависи, делимично, од активности других додатних сигналних путева сугерише да би се ови путеви покретача могли користити у терапеутске сврхе за дерегулацију активације *RTK*. Примећено је да прекомерна експресија *NKR* у ћелијској линији карцинома дојке повећава фосфорилацију *c-Src* више од 6 пута под стимулацијом супстанцом *P*, поред повећања фосфорилације *HER2* (256). С друге стране, хемијска инхибиција *NKR* смањује *c-Src* фосфорилацију. Стога нам је употреба инхибитора *c-Src* омогућила да покажемо да супстанцом *P* посредована трансактивација *HER2* и *EGFR* делимично зависи од *c-Src* сигналног пута у ћелијским линијама карцинома дојке (256). Ови резултати сугеришу онкогену зависност од *NKR* сигнализације у ћелијама карцинома дојке, где *c-Src* игра важну улогу, вероватно због процеса који зависи од механизма трансактивације *HER2* и *EGFR*.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Експериментални подаци приказани у овом истраживању показали су значајну учесталост анксиозног/депресивног поремећаја код жена оболелих од КД. Добијени резултати указују да постоји веза између депресивности код жена са КД и одређених клиничких и патохистолошких карактеристика карцинома, али да су молекуларни механизми баш као и узрочно-последична повезаност између њих и даље недовољно разјашњени. У истраживању је потврђено да присуство и виши степен депресивности код пацијенткиња прати већу експресију *NKR* у КД и да на тај начин овај коморбидитет може имати потенцијални значајан утицај на понашање и прогнозу карцинома. Изгледа да сложеним испреплетаним механизмима, депресивност преко *NKR* битно утиче на процес пролиферације, ангиогенезе и апоптозе у КД. На основу тога верујемо да откривање депресивности код оболелих жена може имати значајну предиктивну вредност у процени понашања карцинома, са претпоставком да у овим случајевима постоји значајно агресивније понашање и лошија прогноза КД.

Закључак је изведен на основу следећих резултата:

1. Код значајног броја пацијенткиња оболелих од КД потврђено је присуство и изван степен анксиозности и депресивности.
2. Степен депресивности је у корелацији са одређеним клиничким и патохистолошким карактеристикама КД (молекуларни подтип, хистолошки и нуклеарни градус, експресија рецептора за *ER* и *PR*, *HER2*, *Ki67*, *VEGF*, *CD105*, *caspase-3*).
3. Степен депресивности је у позитивној корелацији са нивоом експресије *NKR* у КД
4. Експресија *NKR* је у позитивној корелацији са хистолошким и нуклеарним градусом, експресијом *HER2*.
5. Експресија *NKR* је у негативној корелацији са експресијом рецептора за *ER* и *PR*.
6. Пролиферативни индекс *Ki67* је у позитивној корелацији са експресијом *NKR*.
7. Маркер апоптозе (*caspase-3*) је у негативној корелацији са експресијом *NKR* у КД.
8. Експресија *VEGF*-а (маркер ангиогенезе) и експресија *endoglin* (*CD105*)-маркер МВГ су у позитивној корелацији са експресијом *NKR* у КД .
9. Имунофенотип молекулских подтипова КД је у корелацији са експресијом *NKR*.
10. Експресије *NKR* у КД и степен депресивности/анксиозности у корелацији је са хистоморфолошким карактеристикама КД (хистолошки градус, молекуларни подтип, експресија *ER* и *PR*, *Ki67*, *VEGF*, *CD105*, *caspase-3*).

7. ЛІТЕРАТУРА

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Coughlin SS. Epidemiology of Breast Cancer in Women. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1152:9-29.
3. Wojtyla C, Bertuccio P, Wojtyla A, La Vecchia C. European trends in breast cancer mortality, 1980-2017 and predictions to 2025. *Eur J Cancer.* 2021;152:4-17.
4. Park SH, Hoang T, Kim J. Dietary Factors and Breast Cancer Prognosis among Breast Cancer Survivors: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *Cancers (Basel).* 2021;13(21).
5. Ozoran E, Trabulus FDC, Erhan D, Batar B, Guven M. Association of XRCC3, XRCC4, BAX, and BCL-2 Polymorphisms with the Risk of Breast Cancer. *Int J Breast Cancer.* 2022;2022:5817841.
6. Saleem M, Ghazali MB, Wahab M, Yusoff NM, Mahsin H, Seng CE, et al. The BRCA1 and BRCA2 Genes in Early-Onset Breast Cancer Patients. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1292:1-12.
7. Valko-Rokytovská M, Očenáš P, Salayová A, Kostecká Z. Breast Cancer: Targeting of Steroid Hormones in Cancerogenesis and Diagnostics. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).
8. Dos-Santos-Silva I, De Stavola BL, Renna NLJ, Nogueira MC, Aquino EML, Bustamante-Teixeira MT, et al. Ethnoracial and social trends in breast cancer staging at diagnosis in Brazil, 2001-14: a case only analysis. *Lancet Glob Health.* 2019;7(6):e784-e97.
9. Palmer JR, Boggs DA, Wise LA, Ambrosone CB, Adams-Campbell LL, Rosenberg L. Parity and lactation in relation to estrogen receptor negative breast cancer in African American women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(9):1883-91.
10. Slepicka PF, Cyrill SL, Dos Santos CO. Pregnancy and Breast Cancer: Pathways to Understand Risk and Prevention. *Trends Mol Med.* 2019;25(10):866-81.
11. Opdahl S, Alsaker MD, Janszky I, Romundstad PR, Vatten LJ. Joint effects of nulliparity and other breast cancer risk factors. *Br J Cancer.* 2011;105(5):731-6.
12. Kaunitz AM, Pinkerton JV, Manson JE. Hormonal contraception and risk of breast cancer: a closer look. *Menopause.* 2018;25(5):477-9.
13. Mastorakos G, Iatrakis G, Zervoudis S, Syropoulou S. Progestins and the Risk of Breast Cancer. *Acta Endocrinol (Buchar).* 2021;17(1):90-100.
14. Donat-Vargas C, Guerrero-Zotano Á, Casas A, Baena-Cañada JM, Lope V, Antolín S, et al. Trajectories of alcohol consumption during life and the risk of developing breast cancer. *Br J Cancer.* 2021;125(8):1168-76.
15. Fernandez-Lazaro CI, Martínez-González M, Aguilera-Buenosvinos I, Gea A, Ruiz-Canela M, Romanos-Nanclares A, et al. Dietary Antioxidant Vitamins and Minerals and Breast Cancer Risk: Prospective Results from the SUN Cohort. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(3).
16. Long T, Liu K, Long J, Li J, Cheng L. Dietary glycemic index, glycemic load and cancer risk: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Nutr.* 2022;61(4):2115-27.
17. Freudenheim JL. Alcohol's Effects on Breast Cancer in Women. *Alcohol Res.* 2020;40(2):11.
18. Rangel J, Tomás MT, Fernandes B. Physical activity and physiotherapy: perception of women breast cancer survivors. *Breast Cancer.* 2019;26(3):333-8.

19. McTiernan A, Kooperberg C, White E, Wilcox S, Coates R, Adams-Campbell LL, et al. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *Jama*. 2003;290(10):1331-6.
20. Iyengar NM, Arthur R, Manson JE, Chlebowski RT, Kroenke CH, Peterson L, et al. Association of Body Fat and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women With Normal Body Mass Index: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial and Observational Study. *JAMA Oncol*. 2019;5(2):155-63.
21. Oh H, Wild RA, Manson JE, Bea JW, Shadyab AH, Pfeiffer RM, et al. Obesity, Height, and Serum Androgen Metabolism among Postmenopausal Women in the Women's Health Initiative Observational Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2021;30(11):2018-29.
22. Zhang AMY, Wellberg EA, Kopp JL, Johnson JD. Hyperinsulinemia in Obesity, Inflammation, and Cancer. *Diabetes Metab J*. 2021;45(3):285-311.
23. Tan VY, Bull CJ, Biernacka KM, Teumer A, Richardson TG, Sanderson E, et al. Investigation of the Interplay between Circulating Lipids and IGF-I and Relevance to Breast Cancer Risk: An Observational and Mendelian Randomization Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2021;30(12):2207-16.
24. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol*. 2010;11(6):530-42.
25. Archer M, Dasari P, Evdokiou A, Ingman WV. Biological Mechanisms and Therapeutic Opportunities in Mammographic Density and Breast Cancer Risk. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21).
26. Atakpa EC, Thorat MA, Cuzick J, Brentnall AR. Mammographic density, endocrine therapy and breast cancer risk: a prognostic and predictive biomarker review. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;10(10):Cd013091.
27. Koual M, Tomkiewicz C, Cano-Sancho G, Antignac JP, Bats AS, Coumoul X. Environmental chemicals, breast cancer progression and drug resistance. *Environ Health*. 2020;19(1):117.
28. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, et al. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(20):1563-8.
29. Blask DE, Hill SM, Dauchy RT, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, et al. Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. *J Pineal Res*. 2011;51(3):259-69.
30. Martin EM, Fry RC. Environmental Influences on the Epigenome: Exposure- Associated DNA Methylation in Human Populations. *Annu Rev Public Health*. 2018;39:309-33.
31. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020;27(1):27-35.
32. Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology*. 2017;49(2):111-9.
33. Ethier JL, Ocaña A, Rodríguez Lescure A, Ruíz A, Alba E, Calvo L, et al. Outcomes of single versus double hormone receptor-positive breast cancer. A GEICAM/9906 sub-study. *Eur J Cancer*. 2018;94:199-205.
34. Van Bockstal MR, Agahozo MC, van Marion R, Atmodimedjo PN, Sleddens H, Dinjens WNM, et al. Somatic mutations and copy number variations in breast cancers with heterogeneous HER2 amplification. *Mol Oncol*. 2020;14(4):671-85.

35. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(20):2105-22.
36. Yam C, Mani SA, Moulder SL. Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. *Oncologist*. 2017;22(9):1086-93.
37. Escala-Garcia M, Morra A, Canisius S, Chang-Claude J, Kar S, Zheng W, et al. Breast cancer risk factors and their effects on survival: a Mendelian randomisation study. *BMC Med*. 2020;18(1):327.
38. Phung MT, Tin Tin S, Elwood JM. Prognostic models for breast cancer: a systematic review. *BMC Cancer*. 2019;19(1):230.
39. Belizario JE, Loggulo AF. Insights into breast cancer phenotyping through molecular omics approaches and therapy response. *Cancer Drug Resist*. 2019;2(3):527-38.
40. Bando Y, Kobayashi T, Miyakami Y, Sumida S, Kakimoto T, Saijo Y, et al. Triple-negative breast cancer and basal-like subtype : Pathology and targeted therapy. *J Med Invest*. 2021;68(3.4):213-9.
41. Prat A, Galván P, Jimenez B, Buckingham W, Jeiranian HA, Schaper C, et al. Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy Using Core Needle Biopsy Samples with the Prosigna Assay. *Clin Cancer Res*. 2016;22(3):560-6.
42. Xu J, Chen M, Hu M, Wang H, Zuo Z, Wang J, et al. Claudin 19 inhibits the malignant potential of breast cancer cells by modulating extracellular matrix-associated UBE2C/Wnt signaling. *Am J Cancer Res*. 2022;12(12):5552-63.
43. D'Arcy C, Quinn CM. Apocrine lesions of the breast: part 2 of a two-part review. Invasive apocrine carcinoma, the molecular apocrine signature and utility of immunohistochemistry in the diagnosis of apocrine lesions of the breast. *J Clin Pathol*. 2019;72(1):7-11.
44. Russnes HG, Lingjærde OC, Børresen-Dale AL, Caldas C. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. *Am J Pathol*. 2017;187(10):2152-62.
45. Yeo SK, Guan JL. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends Cancer*. 2017;3(11):753-60.
46. He C, Zhu WX, Tang Y, Bai Y, Luo Z, Xu J, et al. Knowledge of a cancer diagnosis is a protective factor for the survival of patients with breast cancer: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 2021;21(1):739.
47. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.
48. Nikbakhsh N, Moudi S, Alvarzandi S, Niazifar M, Farnoush N, Bijani A, et al. Citalopram and group psychotherapy in breast cancer patients: A randomized clinical trial. *Med J Islam Repub Iran*. 2018;32:68.
49. Tojal C, Costa R. Depressive symptoms and mental adjustment in women with breast cancer. *Psychooncology*. 2015;24(9):1060-5.
50. Cvetković J, Nenadović M. Depression in breast cancer patients. *Psychiatry Res*. 2016;240:343-7.

51. Favez N, Antonini T, Delaloye JF, Notari SC. From breast cancer surgery to survivorship: Insecure attachment tendencies predict negative psychological outcomes. *Health Psychol Open*. 2021;8(1):2055102920987463.
52. Graf J, Junne F, Ehrenthal JC, Schäffeler N, Schwille-Kiuntke J, Stengel A, et al. Unmet Supportive Care Needs Among Women With Breast and Gynecological Cancer: Relevance of Attachment Anxiety and Psychological Distress. *Front Psychol*. 2020;11:558190.
53. Kehl KL, Niu J, Chavez-MacGregor M, Giordano SH. Hospitalization by cytotoxic chemotherapy regimen among older women with stage IV breast cancer. *Cancer*. 2018;124(24):4685-91.
54. Tong T, Lu H, Zong J, Lv Q, Chu X. Chemotherapy-related cognitive impairment in patients with breast cancer based on MRS and DTI analysis. *Breast Cancer*. 2020;27(5):893-902.
55. Országhová Z, Mego M, Chovanec M. Long-Term Cognitive Dysfunction in Cancer Survivors. *Front Mol Biosci*. 2021;8:770413.
56. Dinapoli L, Colloca G, Di Capua B, Valentini V. Psychological Aspects to Consider in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Curr Oncol Rep*. 2021;23(3):38.
57. Fortin J, Leblanc M, Elgbeili G, Cordova MJ, Marin MF, Brunet A. The mental health impacts of receiving a breast cancer diagnosis: A meta-analysis. *Br J Cancer*. 2021;125(11):1582-92.
58. İzci F, İlgün AS, Fındıklı E, Özmen V. Psychiatric Symptoms and Psychosocial Problems in Patients with Breast Cancer. *J Breast Health*. 2016;12(3):94-101.
59. Can G, Durna Z, Aydiner A. Assessment of fatigue in and care needs of Turkish women with breast cancer. *Cancer Nurs*. 2004;27(2):153-61.
60. Pai T, Cornell L, Seneviratne D, Niazi S, Mussallem D, Vallow L. Pre-diagnosis major life stressors and breast cancer outcomes. *Breast Cancer Res Treat*. 2021;188(2):459-64.
61. Wondimagegnehu A, Abebe W, Abraha A, Teferra S. Depression and social support among breast cancer patients in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Cancer*. 2019;19(1):836.
62. Mohd Shariff N, Azman N, Hami R, Mohd Mujar NM, Leong Bin Abdullah MFI. Multicentre prospective cohort study of unmet supportive care needs among patients with breast cancer throughout their cancer treatment trajectory in Penang: a PenBCNeeds Study protocol. *BMJ Open*. 2021;11(3):e044746.
63. Liu B, Wu X, Shi L, Li H, Wu D, Lai X, et al. Correlations of social isolation and anxiety and depression symptoms among patients with breast cancer of Heilongjiang province in China: The mediating role of social support. *Nurs Open*. 2021;8(4):1981-9.
64. Tsaras K, Papathanasiou IV, Mitsi D, Veneti A, Kelesi M, Zyga S, et al. Assessment of Depression and Anxiety in Breast Cancer Patients: Prevalence and Associated Factors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(6):1661-9.
65. Salibasic M, Delibegovic S. The Quality of Life and Degree of Depression of Patients Suffering from Breast Cancer. *Med Arch*. 2018;72(3):202-5.
66. Men YV, Lam TC, Yeung CY, Yip PSF. Understanding the impact of clinical characteristics and healthcare utilizations on suicide among cancer sufferers: a case-control study in Hong Kong. *Lancet Reg Health West Pac*. 2021;17:100298.
67. McFarland DC, Walsh L, Napolitano S, Morita J, Jaiswal R. Suicide in Patients With Cancer: Identifying the Risk Factors. *Oncology (Williston Park)*. 2019;33(6):221-6.
68. Gaitanidis A, Alevizakos M, Pitiakoudis M, Wiggins D. Trends in incidence and associated risk factors of suicide mortality among breast cancer patients. *Psychooncology*. 2018;27(5):1450-6.

69. Che Ya SN, Muhamad R, Zakaria R, Mohd Zain N, Ishak A, Hassan, II, et al. "I Lost My Gift to Him": The Consequences of Female Sexual Dysfunction on Breast Cancer Survivors in Malaysia. *Arch Sex Behav.* 2022;51(3):1625-35.
70. Che Ya SN, Muhamad R, Mohd Zain N, Zakaria R, Ishak A, Hassan, II, et al. Coping Strategies for Sexual Problems and Sexual Dysfunction Amongst Malay Women With Breast Cancer. A Qualitative Study. *Sex Med.* 2021;9(3):100336.
71. Babakhani N, Taravati M, Masoumi Z, Garousian M, Faradmaj J, Shayan A. The Effect of Cognitive-Behavioral Consultation on Sexual Function among Women: a Randomized Clinical Trial. *J Caring Sci.* 2018;7(2):83-8.
72. Yang M, Liou KT, Garland SN, Bao T, Hung TKW, Li SQ, et al. Acupuncture versus cognitive behavioral therapy for pain among cancer survivors with insomnia: an exploratory analysis of a randomized clinical trial. *NPJ Breast Cancer.* 2021;7(1):148.
73. Kwak A, Jacobs J, Haggett D, Jimenez R, Peppercorn J. Evaluation and management of insomnia in women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2020;181(2):269-77.
74. Yanaizumi R, Nagamine Y, Harada S, Kojima K, Tazawa T, Goto T. Prevalence of neuropathic pain in terminally ill patients with cancer admitted to a general ward: a prospective observational study. *J Int Med Res.* 2021;49(1):300060520987726.
75. Ho D, Kim SY, Kim SI, Kim SY, Lim WJ. Insomnia, Anxiety, and Depression in Patients First Diagnosed With Female Cancer. *Psychiatry Investig.* 2021;18(8):755-62.
76. Cho OH, Hwang KH. Association between sleep quality, anxiety and depression among Korean breast cancer survivors. *Nurs Open.* 2021;8(3):1030-7.
77. Grayson S, Sereika S, Harpel C, Diego E, Steiman JG, McAuliffe PF, et al. Factors associated with sleep disturbances in women undergoing treatment for early-stage breast cancer. *Support Care Cancer.* 2022;30(1):157-66.
78. Bellman V, Russell N, Depala K, Dellenbaugh A, Desai S, Vadukapuram R, et al. Challenges in Treating Cancer Patients With Unstable Psychiatric Disorder. *World J Oncol.* 2021;12(5):137-48.
79. Li H, Wu C, Liu Y, Zhang S, Gao X. Baihe Zhimu formula attenuates the efficacy of tamoxifen against breast cancer in mice through modulation of CYP450 enzymes. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(1):240.
80. Wedret JJ, Tu TG, Paul D, Rousseau C, Bonta A, Bota RG. Interactions between antidepressants, sleep aids and selected breast cancer therapy. *Ment Illn.* 2019;11(1):8115.
81. Rahman T, Clevenger CV, Kaklamani V, Lauriello J, Campbell A, Malwitz K, et al. Antipsychotic treatment in breast cancer patients. *Am J Psychiatry.* 2014;171(6):616-21.
82. Reeves KW, Okereke OI, Qian J, Tamimi RM, Eliassen AH, Hankinson SE. Depression, Antidepressant Use, and Breast Cancer Risk in Pre- and Postmenopausal Women: A Prospective Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(3):306-14.
83. Zhang L, Pan J, Chen W, Jiang J, Huang J. Chronic stress-induced immune dysregulation in cancer: implications for initiation, progression, metastasis, and treatment. *Am J Cancer Res.* 2020;10(5):1294-307.
84. Colon-Echevarria CB, Lamboy-Caraballo R, Aquino-Acevedo AN, Armaiz-Pena GN. Neuroendocrine Regulation of Tumor-Associated Immune Cells. *Front Oncol.* 2019;9:1077.
85. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(10):1563-79.
86. Muñoz M, Coveñas R. The Neurokinin-1 Receptor Antagonist Aprepitant: An Intelligent Bullet against Cancer? *Cancers (Basel).* 2020;12(9).

87. Javid H, Afshari AR, Zahedi Avval F, Asadi J, Hashemy SI. Aprepitant Promotes Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death and G2/M Arrest through PI3K/Akt/NF- κ B Axis in Cancer Stem-Like Esophageal Squamous Cell Carcinoma Spheres. *Biomed Res Int.* 2021;2021:8808214.
88. Song D, Oh YI, Kim JM, Cheon DS, Kim DY, Seo KW. Detection of neurokinin-1 receptor by immunohistochemistry in canine mammary gland tumours. *Vet Med Sci.* 2020;6(4):958-64.
89. Spitsin S, Pappa V, Douglas SD. Truncation of neurokinin-1 receptor-Negative regulation of substance P signaling. *J Leukoc Biol.* 2018.
90. Jin P, Deng S, Sherchan P, Cui Y, Huang L, Li G, et al. Neurokinin Receptor 1 (NK1R) Antagonist Aprepitant Enhances Hematoma Clearance by Regulating Microglial Polarization via PKC/p38MAPK/NF κ B Pathway After Experimental Intracerebral Hemorrhage in Mice. *Neurotherapeutics.* 2021;18(3):1922-38.
91. Zhang XW, Li L, Hu WQ, Hu MN, Tao Y, Hu H, et al. Neurokinin-1 receptor promotes non-small cell lung cancer progression through transactivation of EGFR. *Cell Death Dis.* 2022;13(1):41.
92. Ghahremanloo A, Javid H, Afshari AR, Hashemy SI. Investigation of the Role of Neurokinin-1 Receptor Inhibition Using Aprepitant in the Apoptotic Cell Death through PI3K/Akt/NF- κ B Signal Transduction Pathways in Colon Cancer Cells. *Biomed Res Int.* 2021;2021:1383878.
93. Zhou Y, Wang M, Tong Y, Liu X, Zhang L, Dong D, et al. miR-206 Promotes Cancer Progression by Targeting Full-Length Neurokinin-1 Receptor in Breast Cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2019;18:1533033819875168.
94. Afshari AR, Motamed-Sanaye A, Sabri H, Soltani A, Karkon-Shayan S, Radvar S, et al. Neurokinin-1 Receptor (NK-1R) Antagonists: Potential Targets in the Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Curr Med Chem.* 2021;28(24):4877-92.
95. Muñoz M, Coveñas R. The Neurokinin-1 Receptor Antagonist Aprepitant, a New Drug for the Treatment of Hematological Malignancies: Focus on Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2020;9(6).
96. Scheau C, Draghici C, Ilie MA, Lupu M, Solomon I, Tampa M, et al. Neuroendocrine Factors in Melanoma Pathogenesis. *Cancers (Basel).* 2021;13(9).
97. Al-Keilani MS, Elstary RI, Alqudah MA, Alkhateeb AM. Immunohistochemical expression of substance P in breast cancer and its association with prognostic parameters and Ki-67 index. *PLoS One.* 2021;16(6):e0252616.
98. Muñoz M, Muñoz MF, Ayala A. Immunolocalization of Substance P and NK-1 Receptor in ADIPOSE Stem Cells. *J Cell Biochem.* 2017;118(12):4686-96.
99. Kim S, Piao J, Son Y, Hong HS. Substance P enhances proliferation and paracrine potential of adipose-derived stem cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;485(1):131-7.
100. Muñoz M, Coveñas R. Glioma and Neurokinin-1 Receptor Antagonists: A New Therapeutic Approach. *Anticancer Agents Med Chem.* 2019;19(1):92-100.
101. Javid H, Mohammadi F, Zahiri E, Hashemy SI. The emerging role of substance P/neurokinin-1 receptor signaling pathways in growth and development of tumor cells. *J Physiol Biochem.* 2019;75(4):415-21.

102. Yang Y, Zhou W, Xu X, Ge X, Wang F, Zhang GQ, et al. Aprepitant Inhibits JNK and p38/MAPK to Attenuate Inflammation and Suppresses Inflammatory Pain. *Front Pharmacol.* 2021;12:811584.
103. Koh YH, Tamizhselvi R, Bhatia M. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase, through nuclear factor-kappaB and activator protein-1, contribute to caerulein-induced expression of substance P and neurokinin-1 receptors in pancreatic acinar cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;332(3):940-8.
104. Meng F, DeMorrow S, Venter J, Frampton G, Han Y, Francis H, et al. Overexpression of membrane metalloendopeptidase inhibits substance P stimulation of cholangiocarcinoma growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;306(9):G759-68.
105. Esteban F, Ramos-García P, Muñoz M, González-Moles M. Substance P and Neurokinin 1 Receptor in Chronic Inflammation and Cancer of the Head and Neck: A Review of the Literature. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;19(1).
106. Suvas S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J Immunol.* 2017;199(5):1543-52.
107. Rosso M, Muñoz M, Berger M. The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:381434.
108. Patel M, Valaiyaduppu Subas S, Ghani MR, Busa V, Dardeir A, Marudhai S, et al. Role of Substance P in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease and Its Correlation With the Degree of Inflammation. *Cureus.* 2020;12(10):e11027.
109. Hilakivi-Clarke L, Rowland J, Clarke R, Lippman ME. Psychosocial factors in the development and progression of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1994;29(2):141-60.
110. Berry A, Collacchi B, Capoccia S, D'Urso MT, Cecchetti S, Raggi C, et al. Chronic Isolation Stress Affects Central Neuroendocrine Signaling Leading to a Metabolically Active Microenvironment in a Mouse Model of Breast Cancer. *Front Behav Neurosci.* 2021;15:660738.
111. Muzyka M, Tagliafico L, Serafini G, Baiardini I, Braido F, Nencioni A, et al. Neuropsychiatric Disorders and Frailty in Older Adults over the Spectrum of Cancer: A Narrative Review. *Cancers (Basel).* 2022;14(1).
112. Schank JR, Heilig M. Substance P and the Neurokinin-1 Receptor: The New CRF. *Int Rev Neurobiol.* 2017;136:151-75.
113. Nagamine T. Serum substance P levels in patients with chronic schizophrenia treated with typical or atypical antipsychotics. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008;4(1):289-94.
114. Rupniak NMJ, Kramer MS. NK1 receptor antagonists for depression: Why a validated concept was abandoned. *J Affect Disord.* 2017;223:121-5.
115. Mehboob R, Gilani SA, Hassan A, Sadaf, Tanvir I, Javaid S, et al. Prognostic Significance of Substance P/Neurokinin 1 Receptor and Its Association with Hormonal Receptors in Breast Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2021;2021:5577820.
116. Rosenkranz MA. Substance P at the nexus of mind and body in chronic inflammation and affective disorders. *Psychol Bull.* 2007;133(6):1007-37.
117. Majkowska-Pilip A, Halik PK, Gniazdowska E. The Significance of NK1 Receptor Ligands and Their Application in Targeted Radionuclide Tumour Therapy. *Pharmaceutics.* 2019;11(9).
118. Thom C, Ehrenmann J, Vacca S, Waltenspühl Y, Schöppe J, Medalia O, et al. Structures of neurokinin 1 receptor in complex with G(q) and G(s) proteins reveal substance P binding mode and unique activation features. *Sci Adv.* 2021;7(50):eabk2872.

119. Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids*. 2014;46(7):1727-50.
120. Xiong J, Zhao G, Yang S, Chen J. Efficacy, Tolerability and Pharmacokinetic Impact of Aprepitant in Sarcoma Patients Receiving Ifosfamide and Doxorubicin Chemotherapy: A Randomized Controlled Trial. *Adv Ther*. 2019;36(2):355-64.
121. Berger M, Neth O, Ilmer M, Garnier A, Salinas-Martín MV, de Agustín Asencio JC, et al. Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1 receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo. *J Hepatol*. 2014;60(5):985-94.
122. González-Ortega A, Sánchez-Vaderrábanos E, Ramiro-Fuentes S, Salinas-Martín MV, Carranza A, Coveñas R, et al. Uveal melanoma expresses NK-1 receptors and cyclosporin A induces apoptosis in human melanoma cell lines overexpressing the NK-1 receptor. *Peptides*. 2014;55:1-12.
123. Zhang YX, Li XF, Yuan GQ, Hu H, Song XY, Li JY, et al. β -Arrestin 1 has an essential role in neurokinin-1 receptor-mediated glioblastoma cell proliferation and G(2)/M phase transition. *J Biol Chem*. 2017;292(21):8933-47.
124. Li H, Zhou T, Zhang Y, Jiang H, Zhang J, Hua Z. RuvBL1 Maintains Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis by Suppressing c-Jun/AP-1 Activity in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:679243.
125. Esteban F, Muñoz M, González-Moles MA, Rosso M. A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(1):137-45.
126. Muñoz M, González-Ortega A, Salinas-Martín MV, Carranza A, Garcia-Recio S, Almendro V, et al. The neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant is a promising candidate for the treatment of breast cancer. *Int J Oncol*. 2014;45(4):1658-72.
127. Harford-Wright E, Lewis KM, Vink R, Ghabriel MN. Evaluating the role of substance P in the growth of brain tumors. *Neuroscience*. 2014;261:85-94.
128. Bayati S, Bashash D, Ahmadian S, Safaroghli-Azar A, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, et al. Inhibition of tachykinin NK(1) receptor using aprepitant induces apoptotic cell death and G1 arrest through Akt/p53 axis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Eur J Pharmacol*. 2016;791:274-83.
129. Mian AA, Zafar U, Ahmed SMA, Ottmann OG, Lalani EMA. Oncogene-independent resistance in Philadelphia chromosome - positive (Ph(+)) acute lymphoblastic leukemia (ALL) is mediated by activation of AKT/mTOR pathway. *Neoplasia*. 2021;23(9):1016-27.
130. Fang D, Lai Z, Wang Y. Overexpression of Biglycan is Associated with Resistance to Rapamycin in Human WERI-Rb-1 Retinoblastoma Cells by Inducing the Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinases (PI3K)/Akt/Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) Signaling Pathway. *Med Sci Monit*. 2019;25:6639-48.
131. Sugimoto K, Sakamoto K, Kawai M, Kawano S, Munakata S, Ishiyama S, et al. Serum oxidative stress is an independent prognostic marker in colorectal cancer. *Transl Cancer Res*. 2019;8(5):1699-708.
132. Alonso R, López-Guerra M, Upshaw R, Bantia S, Smal C, Bontemps F, et al. Forodesine has high antitumor activity in chronic lymphocytic leukemia and activates p53-independent mitochondrial apoptosis by induction of p73 and BIM. *Blood*. 2009;114(8):1563-75.
133. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. Neurokinin-1 Receptor Antagonists against Hepatoblastoma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9).

134. Guha S, Eibl G, Kisfalvi K, Fan RS, Burdick M, Reber H, et al. Broad-spectrum G protein-coupled receptor antagonist, [D-Arg1,D-Trp5,7,9,Leu11]SP: a dual inhibitor of growth and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2005;65(7):2738-45.
135. Beirith I, Renz BW, Mudusetti S, Ring NS, Kolorz J, Koch D, et al. Identification of the Neurokinin-1 Receptor as Targetable Stratification Factor for Drug Repurposing in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(11).
136. Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(9):2321-34.
137. Gysler SM, Drapkin R. Tumor innervation: peripheral nerves take control of the tumor microenvironment. *J Clin Invest.* 2021;131(11).
138. Li H. Successes and Struggles in the War on Cancer: An Interview with Vincent DeVita, MD. *Yale J Biol Med.* 2019;92(4):805-8.
139. Huang C, Li Y, Guo Y, Zhang Z, Lian G, Chen Y, et al. MMP1/PAR1/SP/NK1R paracrine loop modulates early perineural invasion of pancreatic cancer cells. *Theranostics.* 2018;8(11):3074-86.
140. Schick J, Raz E. Blebs-Formation, Regulation, Positioning, and Role in Amoeboid Cell Migration. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:926394.
141. Chen P, Douglas SD, Meshki J, Tuluc F. Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing and shear stress-induced microparticle formation in HEK293 cells. *PLoS One.* 2012;7(9):e45322.
142. Muñoz M, Rosso M, Casinello F, Coveñas R. Paravertebral anesthesia: how substance P and the NK-1 receptor could be involved in regional block and breast cancer recurrence. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(2):601-3.
143. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. The NK-1 receptor antagonist L-732,138 induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cell lines. *Pharmacol Rep.* 2017;69(4):696-701.
144. Lewis KM, Harford-Wright E, Vink R, Nimmo AJ, Ghabriel MN. Walker 256 tumour cells increase substance P immunoreactivity locally and modify the properties of the blood-brain barrier during extravasation and brain invasion. *Clin Exp Metastasis.* 2013;30(1):1-12.
145. Rodriguez PL, Jiang S, Fu Y, Avraham S, Avraham HK. The proinflammatory peptide substance P promotes blood-brain barrier breaching by breast cancer cells through changes in microvascular endothelial cell tight junctions. *Int J Cancer.* 2014;134(5):1034-44.
146. Muñoz M, Berger M, Rosso M, Gonzalez-Ortega A, Carranza A, Coveñas R. Antitumor activity of neurokinin-1 receptor antagonists in MG-63 human osteosarcoma xenografts. *Int J Oncol.* 2014;44(1):137-46.
147. Yamaguchi K, Yamazaki S, Kumakura S, Someya A, Iseki M, Inada E, et al. Yokukansan, a Japanese Herbal Medicine, Suppresses Substance P-Induced Production of Interleukin-6 and Interleukin-8 by Human U373 MG Glioblastoma Astrocytoma Cells. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2020;20(7):1073-80.
148. Rodriguez E, Pei G, Kim ST, German A, Robinson P. Substance P Antagonism as a Novel Therapeutic Option to Enhance Efficacy of Cisplatin in Triple Negative Breast Cancer and Protect PC12 Cells against Cisplatin-Induced Oxidative Stress and Apoptosis. *Cancers (Basel).* 2021;13(15).
149. Navari RM. The safety of rolapitant for the treatment of nausea and vomiting associated with chemotherapy. *Expert Opin Drug Saf.* 2019;18(12):1127-32.
150. Hata A, Okamoto I, Inui N, Okada M, Morise M, Akiyoshi K, et al. Randomized, Double-Blind, Phase III Study of Fosnetupitant Versus Fosaprepitant for Prevention of Highly

- Emetogenic Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting: CONSOLE. *J Clin Oncol.* 2022;40(2):180-8.
151. Ruhlmann CH, Herrstedt J. Safety evaluation of aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Expert Opin Drug Saf.* 2011;10(3):449-62.
152. Tyler T, Schultz A, Venturini A, Giuliano C, Bernareggi A, Spezia R, et al. Challenges in the Development of Intravenous Neurokinin-1 Receptor Antagonists: Results of a Safety and Pharmacokinetics Dose-Finding, Phase 1 Study of Intravenous Fosnetupitant. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2022;11(12):1405-18.
153. Ebrahimi S, Javid H, Alaei A, Hashemy SI. New insight into the role of substance P/neurokinin-1 receptor system in breast cancer progression and its crosstalk with microRNAs. *Clin Genet.* 2020;98(4):322-30.
154. Zung WW. A SELF-RATING DEPRESSION SCALE. *Arch Gen Psychiatry.* 1965;12:63-70.
155. Zung WW. A rating instrument for anxiety disorders. *Psychosomatics.* 1971;12(6):371-9.
156. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998;11(2):155-68.
157. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3997-4013.
158. Focke CM, Bürger H, van Diest PJ, Finsterbusch K, Gläser D, Korsching E, et al. Interlaboratory variability of Ki67 staining in breast cancer. *Eur J Cancer.* 2017;84:219-27.
159. Sabine VS, Faratian D, Kirkegaard-Clausen T, Bartlett JM. Validation of activated caspase-3 antibody staining as a marker of apoptosis in breast cancer. *Histopathology.* 2012;60(2):369-71.
160. Corlan AS, Cîmpean AM, Melnic E, Raica M, Sarb S. VEGF, VEGF165b and EG-VEGF expression is specifically related with hormone profile in pituitary adenomas. *Eur J Histochem.* 2019;63(1).
161. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324(1):1-8.
162. Zainal NZ, Nik-Jaafar NR, Baharudin A, Sabki ZA, Ng CG. Prevalence of depression in breast cancer survivors: a systematic review of observational studies. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(4):2649-56.
163. Kwon S, Kim J, Kim T, Jeong W, Park EC. Association between gastric cancer and the risk of depression among South Korean adults. *BMC Psychiatry.* 2022;22(1):207.
164. Ribeiro FE, Tebar WR, Ferrari G, Palma MR, Fregonesi CE, Caldeira DT, et al. Comparison of Quality of Life in Breast Cancer Survivors with and without Persistent Depressive Symptoms: A 12-Month Follow-Up Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2023;20(4).
165. Álvarez-Pardo S, De Paz JA, Montserrat Romero-Pérez E, Portilla-Cueto KM, Horta-Gim MA, González-Bernal JJ, et al. Factors Associated with Body Image and Self-Esteem in Mastectomized Breast Cancer Survivors. *Int J Environ Res Public Health.* 2023;20(6).
166. Ju HB, Kang EC, Jeon DW, Kim TH, Moon JJ, Kim SJ, et al. Associations Among Plasma Stress Markers and Symptoms of Anxiety and Depression in Patients with Breast Cancer Following Surgery. *Psychiatry Investig.* 2018;15(2):133-40.

167. Bhattacharyya S, Bhattacharjee S, Mandal T, Das DK. Depression in cancer patients undergoing chemotherapy in a tertiary care hospital of North Bengal, India. *Indian J Public Health*. 2017;61(1):14-8.
168. Kadan-Lottick NS, Vanderwerker LC, Block SD, Zhang B, Prigerson HG. Psychiatric disorders and mental health service use in patients with advanced cancer: a report from the coping with cancer study. *Cancer*. 2005;104(12):2872-81.
169. Aryankhesal A, Ghashghaee A, Sardari E, Mahmoudi S, Alihosseini S, Dehnad A, et al. Prevalence of depression in patients with cancer in Iran: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Support Palliat Care*. 2022;12(e4):e518-e25.
170. Shakeri J, Golshani S, Jalilian E, Farnia V, Nooripour R, Alikhani M, et al. Studying the Amount of Depression and its Role in Predicting the Quality of Life of Women with Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(2):643-6.
171. Xu C, Ganesan K, Liu X, Ye Q, Cheung Y, Liu D, et al. Prognostic Value of Negative Emotions on the Incidence of Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of 129,621 Patients with Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(3).
172. Purkayastha D, Venkateswaran C, Nayar K, Unnikrishnan UG. Prevalence of Depression in Breast Cancer Patients and its Association with their Quality of Life: A Cross-sectional Observational Study. *Indian J Palliat Care*. 2017;23(3):268-73.
173. Bener A, Alsulaiman R, Doodson L, Agathangelou T. Depression, Hopelessness and Social Support among Breast Cancer Patients: in Highly Endogamous Population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(7):1889-96.
174. Broeckel JA, Jacobsen PB, Balducci L, Horton J, Lyman GH. Quality of life after adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2000;62(2):141-50.
175. Speer JJ, Hillenber B, Sugrue DP, Blacker C, Kresge CL, Decker VB, et al. Study of sexual functioning determinants in breast cancer survivors. *Breast J*. 2005;11(6):440-7.
176. Christie KM, Meyerowitz BE, Maly RC. Depression and sexual adjustment following breast cancer in low-income Hispanic and non-Hispanic White women. *Psychooncology*. 2010;19(10):1069-77.
177. Begovic-Juhant A, Chmielewski A, Iwuagwu S, Chapman LA. Impact of body image on depression and quality of life among women with breast cancer. *J Psychosoc Oncol*. 2012;30(4):446-60.
178. Mehnert-Theuerkauf A, Hufeld JM, Esser P, Goerling U, Hermann M, Zimmermann T, et al. Prevalence of mental disorders, psychosocial distress, and perceived need for psychosocial support in cancer patients and their relatives stratified by biopsychosocial factors: rationale, study design, and methods of a prospective multi-center observational cohort study (LUPE study). *Front Psychol*. 2023;14:1125545.
179. Pumo V, Milone G, Iacono M, Giuliano SR, Di Mari A, Lopiano C, et al. Psychological and sexual disorders in long-term breast cancer survivors. *Cancer Manag Res*. 2012;4:61-5.
180. Geng HM, Chuang DM, Yang F, Yang Y, Liu WM, Liu LH, et al. Prevalence and determinants of depression in caregivers of cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(39):e11863.
181. Casavilca-Zambrano S, Custodio N, Liendo-Picoaga R, Cancino-Maldonado K, Esenarro L, Montesinos R, et al. Depression in women with a diagnosis of breast cancer. Prevalence of symptoms of depression in Peruvian women with early breast cancer and related sociodemographic factors. *Semin Oncol*. 2020;47(5):293-301.

182. Osborne RH, Elsworth GR, Hopper JL. Age-specific norms and determinants of anxiety and depression in 731 women with breast cancer recruited through a population-based cancer registry. *Eur J Cancer*. 2003;39(6):755-62.
183. Christensen S, Zachariae R, Jensen AB, Vaeth M, Møller S, Ravnsbaek J, et al. Prevalence and risk of depressive symptoms 3-4 months post-surgery in a nationwide cohort study of Danish women treated for early stage breast-cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113(2):339-55.
184. Burgess C, Cornelius V, Love S, Graham J, Richards M, Ramirez A. Depression and anxiety in women with early breast cancer: five year observational cohort study. *Bmj*. 2005;330(7493):702.
185. Kugbey N. Comorbid anxiety and depression among women receiving care for breast cancer: analysis of prevalence and associated factors. *Afr Health Sci*. 2022;22(3):166-72.
186. Guo X, Xu J, Ying E, Yu Z, Sun T. Correlation between hormone receptor status and depressive symptoms in patients with metastatic breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(31):50774-81.
187. Zhang H, Chen M, Liu Y, Dong X, Zhang C, Jiang H, et al. Paroxetine combined with fluorouracil plays a therapeutic role in mouse models of colorectal cancer with depression through inhibiting IL-22 expression to regulate the MAPK signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2020;20(6):240.
188. Santos JC, Pyter LM. Neuroimmunology of Behavioral Comorbidities Associated With Cancer and Cancer Treatments. *Front Immunol*. 2018;9:1195.
189. Wang J, Chen Y, Dai C, Shang Y, Xie J. Ginsenoside Rh2 alleviates tumor-associated depression in a mouse model of colorectal carcinoma. *Am J Transl Res*. 2016;8(5):2189-95.
190. Hawkins NA, Soman A, Buchanan Lunsford N, Leadbetter S, Rodriguez JL. Use of Medications for Treating Anxiety and Depression in Cancer Survivors in the United States. *J Clin Oncol*. 2017;35(1):78-85.
191. Kim K, Kim G, Kim JY, Yun HJ, Lim SC, Choi HS. Interleukin-22 promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via MAP3K8 activation. *Carcinogenesis*. 2014;35(6):1352-61.
192. Huang L, Liu X, Li L, Wang L, Wu N, Liu Z. Novel immune subtypes identification of HER2-positive breast cancer based on immunogenomic landscape. *Med Oncol*. 2022;39(5):92.
193. Matsuno H, Tsuchimine S, O'Hashi K, Sakai K, Hattori K, Hidese S, et al. Association between vascular endothelial growth factor-mediated blood-brain barrier dysfunction and stress-induced depression. *Mol Psychiatry*. 2022;27(9):3822-32.
194. Steinhoff MS, von Mentzer B, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev*. 2014;94(1):265-301.
195. Degan D, Ornello R, Tiseo C, Carolei A, Sacco S, Pistoia F. The Role of Inflammation in Neurological Disorders. *Curr Pharm Des*. 2018;24(14):1485-501.
196. Degnan AP, Tora GO, Huang H, Conlon DA, Davis CD, Hanumegowda UM, et al. Discovery of Indazoles as Potent, Orally Active Dual Neurokinin 1 Receptor Antagonists and Serotonin Transporter Inhibitors for the Treatment of Depression. *ACS Chem Neurosci*. 2016;7(12):1635-40.
197. Eapen PM, Rao CM, Nampoothiri M. Crosstalk between neurokinin receptor signaling and neuroinflammation in neurological disorders. *Rev Neurosci*. 2019;30(3):233-43.

198. Hui L, Huang T, Lian J, Zhou F, Gao C, Lin Y, et al. Potential prognostic value of clinical characteristics, hormone status and major depressive disorder in breast cancer. *Future Oncol.* 2017;13(17):1493-503.
199. Bortolato B, Hyphantis TN, Valpione S, Perini G, Maes M, Morris G, et al. Depression in cancer: The many biobehavioral pathways driving tumor progression. *Cancer Treat Rev.* 2017;52:58-70.
200. Garcia-Recio S, Fuster G, Fernandez-Nogueira P, Pastor-Arroyo EM, Park SY, Mayordomo C, et al. Substance P autocrine signaling contributes to persistent HER2 activation that drives malignant progression and drug resistance in breast cancer. *Cancer Res.* 2013;73(21):6424-34.
201. Davoodian M, Boroumand N, Mehrabi Bahar M, Jafarian AH, Asadi M, Hashemy SI. Evaluation of serum level of substance P and tissue distribution of NK-1 receptor in breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2019;46(1):1285-93.
202. Huang WQ, Wang JG, Chen L, Wei HJ, Chen H. SR140333 counteracts NK-1 mediated cell proliferation in human breast cancer cell line T47D. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29(1):55.
203. Zhou Y, Zhao L, Xiong T, Chen X, Zhang Y, Yu M, et al. Roles of full-length and truncated neurokinin-1 receptors on tumor progression and distant metastasis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;140(1):49-61.
204. Zhang L, Wang L, Dong D, Wang Z, Ji W, Yu M, et al. MiR-34b/c-5p and the neurokinin-1 receptor regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif.* 2019;52(1):e12527.
205. Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascón P, Maloof PB, et al. Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):388-93.
206. Brener S, González-Moles MA, Tostes D, Esteban F, Gil-Montoya JA, Ruiz-Avila I, et al. A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2009;29(6):2323-9.
207. Otero D, Lourenço SQ, Ruiz-Ávila I, Bravo M, Sousa T, de Faria PA, et al. Expression of proliferative markers in ameloblastomas and malignant odontogenic tumors. *Oral Dis.* 2013;19(4):360-5.
208. Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande SV, Wang L, et al. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest.* 2003;83(5):731-42.
209. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2010;17(2):193-9.
210. Hahn S, Jackstadt R, Siemens H, Hüntten S, Hermeking H. SNAIL and miR-34a feed-forward regulation of ZNF281/ZBP99 promotes epithelial-mesenchymal transition. *Embo j.* 2013;32(23):3079-95.
211. Zhang DG, Zheng JN, Pei DS. P53/microRNA-34-induced metabolic regulation: new opportunities in anticancer therapy. *Mol Cancer.* 2014;13:115.
212. Tahmasebi S, Alimohammadi M, Khorasani S, Rezaei N. Pro-tumorigenic and Anti-tumorigenic Roles of Pro-inflammatory Cytokines in Cancer. In: Rezaei N, editor. *Handbook of Cancer and Immunology.* Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 1-25.
213. Al-Keilani MS, Bdeir R, Elstary RI, Alqudah MA. Expression of substance P, neurokinin 1 receptor, Ki-67 and pyruvate kinase M2 in hormone receptor negative breast cancer and evaluation of impact on overall survival. *BMC Cancer.* 2023;23(1):158.

214. Yang JH, Guo Z, Zhang T, Meng XX, Xie LS. Restoration of endogenous substance P is associated with inhibition of apoptosis of retinal cells in diabetic rats. *Regul Pept.* 2013;187:12-6.
215. Jiang MH, Lim JE, Chi GF, Ahn W, Zhang M, Chung E, et al. Substance P reduces apoptotic cell death possibly by modulating the immune response at the early stage after spinal cord injury. *Neuroreport.* 2013;24(15):846-51.
216. Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista PV, Fernandes AR. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4).
217. Marra A, Viale G, Curigliano G. Recent advances in triple negative breast cancer: the immunotherapy era. *BMC Med.* 2019;17(1):90.
218. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. Triple Negative Breast Cancer: How Neurokinin-1 Receptor Antagonists Could Be Used as a New Therapeutic Approach. *Mini Rev Med Chem.* 2020;20(5):408-17.
219. Muñoz M, Crespo JC, Crespo JP, Coveñas R. Neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant and radiotherapy, a successful combination therapy in a patient with lung cancer: A case report. *Mol Clin Oncol.* 2019;11(1):50-4.
220. Robinson P, Kasembeli M, Bharadwaj U, Engineer N, Eckols KT, Tweardy DJ. Substance P Receptor Signaling Mediates Doxorubicin-Induced Cardiomyocyte Apoptosis and Triple-Negative Breast Cancer Chemoresistance. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1959270.
221. Wang W, Wu J, Zhang P, Fei X, Zong Y, Chen X, et al. Prognostic and predictive value of Ki-67 in triple-negative breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7(21):31079-87.
222. Wu Q, Ma G, Deng Y, Luo W, Zhao Y, Li W, et al. Prognostic Value of Ki-67 in Patients With Resected Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2019;9:1068.
223. Zhu X, Chen L, Huang B, Wang Y, Ji L, Wu J, et al. The prognostic and predictive potential of Ki-67 in triple-negative breast cancer. *Sci Rep.* 2020;10(1):225.
224. Backman LJ, Eriksson DE, Danielson P. Substance P reduces TNF- α -induced apoptosis in human tenocytes through NK-1 receptor stimulation. *Br J Sports Med.* 2014;48(19):1414-20.
225. Akazawa T, Kwatra SG, Goldsmith LE, Richardson MD, Cox EA, Sampson JH, et al. A constitutively active form of neurokinin 1 receptor and neurokinin 1 receptor-mediated apoptosis in glioblastomas. *J Neurochem.* 2009;109(4):1079-86.
226. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res.* 2005;94:29-86.
227. Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer.* 2020;11(3):511-8.
228. Liu HW, Bi WT, Huang HT, Li RX, Xi Q, Feng L, et al. Satb1 promotes Schwann cell viability and migration via activation of PI3K/AKT pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(13):4268-77.
229. Ward SG, Westwick J, Harris S. Sat-Nav for T cells: Role of PI3K isoforms and lipid phosphatases in migration of T lymphocytes. *Immunol Lett.* 2011;138(1):15-8.
230. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999;13(22):2905-27.
231. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, et al. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science.* 1999;284(5412):339-43.

232. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998;282(5392):1318-21.
233. Walsh DT, Weg VB, Williams TJ, Nourshargh S. Substance P-induced inflammatory responses in guinea-pig skin: the effect of specific NK1 receptor antagonists and the role of endogenous mediators. *Br J Pharmacol*. 1995;114(7):1343-50.
234. Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer*. 1995;61(6):786-92.
235. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi CA. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res*. 1990;40(2):264-78.
236. Baluk P, Bowden JJ, Lefevre PM, McDonald DM. Upregulation of substance P receptors in angiogenesis associated with chronic airway inflammation in rats. *Am J Physiol*. 1997;273(3 Pt 1):L565-71.
237. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest*. 1994;94(5):2036-44.
238. Song H, Yin W, Zeng Q, Jia H, Lin L, Liu X, et al. Hemokinins modulate endothelium function and promote angiogenesis through neurokinin-1 receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(9):1410-21.
239. Bellucci F, Carini F, Catalani C, Cucchi P, Lecci A, Meini S, et al. Pharmacological profile of the novel mammalian tachykinin, hemokinin 1. *Br J Pharmacol*. 2002;135(1):266-74.
240. Ma J, Yuan S, Cheng J, Kang S, Zhao W, Zhang J. Substance P Promotes the Progression of Endometrial Adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2016;26(5):845-50.
241. Alsaeed MA, Ebrahimi S, Alalikhani A, Hashemi SF, Hashemy SI. The Potential In Vitro Inhibitory Effects of Neurokinin-1 Receptor (NK-1R) Antagonist, Aprepitant, in Osteosarcoma Cell Migration and Metastasis. *Biomed Res Int*. 2022;2022:8082608.
242. Mohammadi F, Javid H, Afshari AR, Mashkani B, Hashemy SI. Substance P accelerates the progression of human esophageal squamous cell carcinoma via MMP-2, MMP-9, VEGF-A, and VEGFR1 overexpression. *Mol Biol Rep*. 2020;47(6):4263-72.
243. Regoli D, Boudon A, Fauchère JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev*. 1994;46(4):551-99.
244. Benest AV, Stone OA, Miller WH, Glover CP, Uney JB, Baker AH, et al. Arteriolar genesis and angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase overexpression results in a mature vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(8):1462-8.
245. Chung BH, Kim JD, Kim CK, Kim JH, Won MH, Lee HS, et al. Icaritin stimulates angiogenesis by activating the MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376(2):404-8.
246. Mou L, Xing Y, Kong Z, Zhou Y, Chen Z, Wang R. The N-terminal domain of human hemokinin-1 influences functional selectivity property for tachykinin receptor neurokinin-1. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(5):661-8.
247. DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Déry O, Bunnett NW. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(20):11086-91.

248. Rivas MA, Tkach M, Beguelin W, Proietti CJ, Rosemlit C, Charreau EH, et al. Transactivation of ErbB-2 induced by tumor necrosis factor alpha promotes NF-kappaB activation and breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(1):111-24.
249. Cabioglu N, Summy J, Miller C, Parikh NU, Sahin AA, Tuzlali S, et al. CXCL-12/stromal cell-derived factor-1alpha transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation. *Cancer Res.* 2005;65(15):6493-7.
250. Almendro V, García-Recio S, Gascón P. Tyrosine kinase receptor transactivation associated to G protein-coupled receptors. *Curr Drug Targets.* 2010;11(9):1169-80.
251. Belsches-Jablonski AP, Biscardi JS, Peavy DR, Tice DA, Romney DA, Parsons SJ. Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival. *Oncogene.* 2001;20(12):1465-75.
252. Ishizawar RC, Miyake T, Parsons SJ. c-Src modulates ErbB2 and ErbB3 heterocomplex formation and function. *Oncogene.* 2007;26(24):3503-10.
253. Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, Parsons SJ. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem.* 1999;274(12):8335-43.
254. Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene.* 2004;23(48):7957-68.
255. Biscardi JS, Ishizawar RC, Silva CM, Parsons SJ. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2000;2(3):203-10.
256. Garcia-Recio S, Pastor-Arroyo EM, Marín-Aguilera M, Almendro V, Gascón P. The Transmodulation of HER2 and EGFR by Substance P in Breast Cancer Cells Requires c-Src and Metalloproteinase Activation. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129661.

БИОГРАФИЈА

Милена Илић је рођена 05.08.1984. године у Јагодини. Основну школу “Бошко Ђуричић” је завршила у Јагодини и Медицинску школу „Данило Димитријевић“ као ђак генерације је завршила у Ћуприји. Интегрисане академске студије медицине је уписала 2003. године, на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, а завршила 2010. године са просечном оценом 9.59. Током студирања била је члан из реда студената Наставно-научног већа и Сената Факултета. Као студент била је демонстратор на предмету Патолошка анатомија. Све време студирања примала је стипендију Републике Србије, а на завршној години била је Стипендиста Фонда за младе таленте Министарства Омладине и Спорта – стипендија за хиљаду најбољих студената у Србији. Докторске академске студије – смер Онкологија, уписала је 2010. године, на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Након положених свих програмом предвиђених испита, укључујући и усмени докторски испит, пријавила је своју докторску дисертацију која је прихваћена 16.03.2022. год.

Др Милена Илић је запослена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу од 2011. године, сада у звању истраживач сарадник за ужу научну област Патолошка анатомија. Ангажована је као коистраживач на јуниор пројекту Факултета медицинских наука у Крагујевцу: ЈП 01-3907, ЈП 11-14 као и коистраживач на макро пројекту Факултета медицинских наука у Крагујевцу, МП 02-14.

Стручни испит пред комисијом Министарства здравља Републике Србије, положила је 26.10.2010. године. 2012. године је уписала специјалистичке студије из Патологије, а завршила 2017. године са оценом одличан.

Кандидаткиња је као аутор или коаутор до сада публиковала 12 научних радова и то: 1 рад категорије М21, 2 рада категорије М22, 5 радова категорије М23, 2 рада категорије М52 и 2 рада категорије М53.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

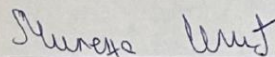
„ПОВЕЗАНОСТ ДЕПРЕСИВНОСТИ И АНКСИОЗНОСТИ СА ЕКСПРЕСИЈОМ
РЕЦЕПТОРА ЗА НЕУРОКИНИНЕ КОД ЖЕНА ОБОЛЕЛИХ ОД КАРЦИНОМА
ДОЈКЕ“

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 10.10.2023. године.



потпис аутора

Образац 2

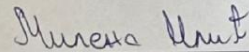
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„ПОВЕЗАНОСТ ДЕПРЕСИВНОСТИ И АНКСИОЗНОСТИ СА ЕКСПРЕСИЈОМ
РЕЦЕПТОРА ЗА НЕУРОКИНИНЕ КОД ЖЕНА ОБОЛЕЛИХ ОД КАРЦИНОМА
ДОЈКЕ“

истоветне.

У Крагујевцу, 10.10.2023. године.



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милена Илић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„ПОВЕЗАНОСТ ДЕПРЕСИВНОСТИ И АНКСИОЗНОСТИ СА ЕКСПРЕСИЈОМ РЕЦЕПТОРА ЗА НЕУРОКИНИНЕ КОД ЖЕНА ОБОЛЕЛИХ ОД КАРЦИНОМА ДОЛКЕ“

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајнодоступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

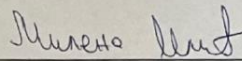
не дозвољавам¹

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

¹Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- ③ Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 10.10.2023. године.



потпис аутора

²Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>